



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

**AMANDA JACOBSON SEBA**

**INVESTIGAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS FENÔMENOS INFLAMATÓRIOS DA  
RESPOSTA IMUNE *IN SITU* NA APRESENTAÇÃO CLÍNICA DA  
ESPOROTRICOSE HUMANA.**

Rio de Janeiro

2019

**INVESTIGAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS FENÔMENOS INFLAMATÓRIOS  
DA RESPOSTA IMUNE *IN SITU* NA APRESENTAÇÃO CLÍNICA DA  
ESPOROTRICOSE HUMANA**

**AMANDA JACOBSON SEBA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, para obtenção do grau de Doutora em Ciências, sob a orientação da Dr.<sup>a</sup> Fátima Conceição-Silva e da Dr.<sup>a</sup> Maria Inês Fernandes Pimentel.

Rio de Janeiro

2019

**AMANDA JACOBSON SEBA**

**INVESTIGAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS FENÔMENOS INFLAMATÓRIOS DA  
RESPOSTA IMUNE *IN SITU* NA APRESENTAÇÃO CLÍNICA DA  
ESPOROTRICOSE HUMANA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, para obtenção do grau de Doutora em Ciências.

Orientadores: Dr.<sup>a</sup> Fátima Conceição-Silva  
Dr.<sup>a</sup> Maria Inês Fernandes Pimentel

**BANCA EXAMINADORA**

---

Fernanda Nazaré Morgado (Presidente/Revisora)

---

Dr. Marcelo Rosandiski Lyra

---

Dr.<sup>a</sup>. Aline Fagundes da Silva

---

Dr.<sup>a</sup> Paula Mello De Luca

---

Dr.<sup>a</sup> Manoel Marques Evangelista de Oliveira

---

(Suplente)

“Para ver muita coisa é preciso despregar os olhos de si mesmo”

(Friedrich Nietzsche)

“Há pessoas que choram por saber que as rosas têm espinho. Há outras que sorriem por saber que os espinhos têm rosas!” (Machado de Assis)

Dedico esta tese:

À Gabriela, minha amada filha, que leu muitas lâminas, enquanto esteve na minha barriga, e que me motiva a produzir conhecimento que engrandeça o mundo que vivemos. A você, filha, o melhor de mim.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, consciência e força maior, que me permitiu viver a realização deste projeto.

À minha orientadora, dra. Fátima Conceição-Silva, que me ensinou muito além de Imunologia, práticas laboratoriais, e pesquisa clínica. Com ela aprendi a viver como pesquisadora, e acreditar que o meio acadêmico e a Medicina só existem juntos. Por isso, são igualmente importantes para ciência. Minha gratidão, e minha admiração, sempre.

À minha coorientadora, dra. Maria Inês Pimentel, com quem tive o prazer de trabalhar por um tempo para coleta de dados clínicos, e que muito aprendizado trouxe para mim, com sua forma paciente de falar, me fez aprender conceitos novos, e entender que a partir deles, poderia continuar. Muito obrigada, sempre.

A Jessica Silva Leite, amiga querida. Solícita, prestativa, alegre, assertiva, e muito, mas muito competente. Obrigada, muito obrigada, pela ajuda neste projeto, e pela nossa amizade.

A Rossina Pereira e Pereira, grande amiga que esteve comigo em boa parte deste projeto. Quantas conversas, que deixaram mais felizes muitos dias de trabalho.

A todos que trabalham no laboratório de Imunoparasitologia, que tornam o ambiente tão agradável e acolhedor. Como é bom encontrar cada um pelos corredores, em suas salas, conversar um pouco, ver os sorrisos, ouvir as histórias, e poder ter compartilhado este tempo com vocês.

A Priscilla Sá, sempre atenciosa, resolutiva, simplifica o mais complexo que possa existir. Muito obrigada por ter construído o formato de tese neste projeto.

A Katia, Rose, Verinha, e todas as funcionárias que trabalham para deixar nosso laboratório sempre limpo e organizado, e que fazem isso com tanta dedicação e tanto amor.

À Fiocruz, instituição que sempre me encantou, por ser referência de pesquisa e ciência, e por transmitir em todo Brasil, e em todo mundo, confiabilidade. Me sinto grata, e honrada por integrar parte dessa história.

Ao Laboratório de Imunoparasitologia, onde realizei meus experimentos, aprendi a trabalhar em laboratório, li lâminas, e vivi dias de fascínio com cada descoberta.

Ao Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmaniose (LaP Clin VigiLeish), onde fui tão bem recebida, e pude desenvolver parte de meu projeto.

Ao Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), pelo excelente corpo docente, com quem muito aprendi, e pela secretaria, que sempre facilitou tantos processos nesse caminho.

Ao meu pai, José Seba, que está ao meu lado em todo tempo, com seu amor e apoio incondicionais, sem isso jamais chegaria até aqui.

À minha mãe, Rosinah, por ser parte essencial da minha rede de apoio, sempre acreditou em mim, e vejo em seu olhar a força que tantas vezes busco para continuar.

Ao meu irmão, Roched, que eu amo e admiro imensamente, e que faz a minha vida muito melhor desde que eu tenho 2 anos e 5 meses.

Ao meu tio Abdo, que tem um bom humor constante, e que tantas vezes me faz dar boas risadas, e traz leveza e sentido para os meus dias.

À Ba, Débora, e Jaci, que cuidaram tão bem da minha filha, para que eu pudesse trabalhar tranquila.

Seba, AJ. **Investigação da influência dos fenômenos inflamatórios da resposta imune *in situ* na apresentação clínica da esporotricose humana.** Rio de Janeiro, 2019. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fundação Oswaldo Cruz.

## RESUMO

Um aumento do número de casos de esporotricose (SP) tem sido relatado em várias regiões do planeta, inclusive no Brasil, especialmente no estado do Rio de Janeiro, área considerada hiperendêmica para esta micose. Neste contexto, o aumento de casos trouxe desafios para o diagnóstico pela semelhança com outras infecções de pele, como a leishmaniose, e também a oportunidade de produzir conhecimento e aprofundar os estudos em casos humanos. Diante disto, o preciso diagnóstico, bem como o entendimento dos fenômenos imunológicos envolvidos nas diferentes apresentações clínicas da esporotricose, fixa (F) e linfocutânea (LC), são de grande interesse. Nosso estudo foi dividido em duas partes: na primeira etapa avaliamos o perfil clínico e a resposta imune *in situ* nos pacientes de SP, formas F e LC. Foram coletados dados clínicos e laboratoriais pela revisão dos prontuários e avaliada a resposta imune *in situ* pela técnica de imunohistoquímica para diversos marcadores celulares e funcionais de 31 pacientes com diagnóstico confirmado de SP. Dezenove pacientes apresentaram forma LC e 12 forma F; houve prevalência do sexo feminino em ambas as formas; e a idade média foi de 35 anos. Houve maior número de linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+, neutrófilos e macrófagos na forma LC, e maior predomínio de mediadores de regulação, FoxP3, CD25, IL-33 e ST2-L na forma F, e de NOS2 na forma LC. A forma LC tem uma apresentação clínica mais exuberante, maior número de lesões, com acometimento linfático, enquanto a forma F apresenta lesão única, limites mais bem definidos, sem acometimento linfático. Na segunda etapa fizemos estudo comparativo de pacientes com leishmaniose cutânea (n=48) e SP (n=48). Os resultados mostraram algumas diferenças e algumas semelhanças no perfil inflamatório das duas doenças. As semelhanças eram evidentes entre as formas linfocutânea de SP e esporotricose de leishmaniose cutânea, que compartilham apresentações clínicas similares, sugerindo que além das particularidades de cada infecção, uma resposta coordenada do sistema imune da pele pode facilitar a organização da resposta inflamatória nesse sítio. É possível que as diferenças dos padrões de resposta imune *in situ* expliquem as variadas apresentações clínicas causadas pelo mesmo patógeno, uma vez que um padrão predominante regulatório sugere um melhor prognóstico. Os dados clínicos e imunológicos avaliados neste estudo, podem ampliar o conhecimento sobre a esporotricose, e auxiliar na maior precisão do diagnóstico diferencial, sempre que necessário. Novos estudos devem ser realizados a fim de se compreender melhor o funcionamento do sistema imune nas doenças granulomatosas da pele como a esporotricose e a leishmaniose, e suas repercussões clínicas.

**Palavras-chaves:** Esporotricose linfocutânea, Esporotricose fixa, Resposta imune *in situ*, Imunohistoquímica

Seba, AJ. **Investigation of the influence of the *in situ* immune response on the clinical presentation of human sporotrichosis**. Rio de Janeiro, 2019. Thesis [PhD Thesis in Clinical Research in Infectious Diseases] – National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas (INI), Oswaldo Cruz Foundation.

### ABSTRACT

An increase in the number of sporotrichosis (SP) cases has been reported in several regions of the planet including Brazil, especially in the state of Rio de Janeiro, considered to be an hyperendemic area for this mycosis. In this context, the increase of cases brought challenges for the diagnosis due to the similarity with other skin infections, such as leishmaniasis, and also the opportunity to produce knowledge and to intensify the studies in human cases. The precise diagnosis, as well as the understanding of the immunological phenomena involved in the different clinical presentations of sporotrichosis, fixed (F) and lymphocutaneous (LC) forms, are of great interest. Our study was divided into two parts: in the first step we evaluated the clinical profile and the *in situ* immune response in patients with SP, F and LC forms. Clinical data were collected by reviewing medical records and evaluating the *in situ* immune response through immunohistochemistry for several cellular and functional markers of 31 patients with confirmed SP diagnosis. Nineteen patients presented LC and 12 presented F forms; there was female prevalence in both forms; and the average age was 35 years. There was a higher number of CD4 + T lymphocytes, CD8+ T lymphocytes, neutrophils and macrophages in the LC form, and a greater predominance of regulatory mediators, FoxP3, CD25, IL-33 and ST2-L in the F form. There was greater expression of NOS2 in LC. The LC form has a more exuberant clinical presentation, a greater number of lesions, with lymphatic involvement, while the F form has a single lesion, better defined limits, without lymphatic involvement. In the second stage we made a comparative study of patients with cutaneous leishmaniasis (n = 48) and SP (n = 48). The results showed some differences and some similarities in the inflammatory profile of the two diseases. Similarities were evident between the lymphocutaneous forms of SP and sporotrichoid forms of cutaneous leishmaniasis, which share resembling clinical presentations. They suggest that in addition to the particularities of each infection, a coordinated response of the skin immune system may facilitate the organization of the inflammatory response at this site. Differences in the *in situ* immune response patterns may explain the varied clinical presentations caused by the same pathogen, as a predominant regulatory pattern suggests a better prognosis.

The clinical and immunological data evaluated in this study can broaden the knowledge about sporotrichosis and help in the accuracy in differential diagnosis, whenever necessary. Further studies should be done to better understand the functioning of the skin immune system in granulomatous diseases like SP and cutaneous leishmaniasis and their clinical repercussions.

**Key words:** sporotrichosis, *in situ* immune response, immunohistochemistry

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATL	American Tegumentery leishmaniasis
Bcl-2	Família de proteínas reguladoras do apoptose
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DC	<i>Dendritic cells</i> , células dendríticas
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> , Ácido desoxirribonucléico
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i> , Ensaio Imunoenzimático
F	Fixa
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
H2O2	Peróxido de hidrogenio
IL	Interleucina
INF gama	Interferon gama
INI	Instituto Nacional de Infectologia
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
ITS	<i>Internal Transcript Spacer</i>
LapClinVigLeish	Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmaniose
LC	Linfocutanea
LCL- ATL	<i>Localized Cutaneous Leishmaniasis – American Tegumentery leishmaniasis</i>
LIP	Laboratório de Imunoparasitologia
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NET	<i>Neutrophil extracellular traps</i> , redes (armadilhas) extracelulares de neutrófilos
NK	<i>Natural killer</i> , Célula matadora natural
NO	Óxido nítrico
NOS2	<i>Nitric oxid synthase</i> , óxido nítrico sintetase 2

PAS	<i>Periodic-acid of Schiff</i> , ácido periódico de Schiff
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , reação em cadeia da polimerase
PCR-RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RCA	<i>Rolling Circle Amplification</i>
ROI	<i>Reacts oxygen intermediate</i> , intermediários reativos de oxigênio
SCL – ATL	<i>Sporotricoid Cutaneous Leishmaniasis - American Tegumentery leishmaniasis</i>
SES	Secretaria Estadual de Saúde
<i>Sporothrix spp</i>	<i>Sporothrix species</i>
SsCBF	<i>Sporothrix schenckii</i> Con A-Binding Fraction
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor</i> , Fator transformador de crescimento- $\beta$
TH	T Helper, Linfócito T auxiliar
TH1	T Helper 1, Linfócito T auxiliar 1
TH2	T Helper 2, Linfócito T auxiliar 2
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF- $\alpha$	T <i>necrosis factor</i> , Fator de necrose tumoral- $\alpha$
Treg	T regulatórias

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO – REVISÃO DE LITERATURA .....	1
1.1. O agente etiológico da esporotricose .....	1
1.2. Transmissão da esporotricose .....	2
1.3. A micose: um breve histórico .....	3
1.4. A doença e suas apresentações clínicas .....	5
1.5. Diagnóstico .....	6
1.6. A resposta imune na esporotricose .....	9
1.7. Justificativa .....	18
2. OBJETIVOS .....	19
2.1. Objetivo geral: .....	19
2.2. Objetivos específico: .....	19
3. ASPECTOS ETICOS .....	20
4. RESULTADOS .....	21
4.1. ARTIGO 1 - Investigação da influência dos fenômenos inflamatórios da resposta imune in situ na apresentação clínica da esporotricose humana .....	22
4.2. ARTIGO 2: Unbalanced inflammatory reaction could increase tissue destruction and worsen skin infectious diseases – a comparative study of leishmaniasis and sporotrichosis .....	53
5. CONCLUSOES GERAIS .....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: .....	66
ANEXO 1: Termo de Compromisso e Responsabilidade .....	77
ANEXO 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	78
Anexo 3: Carta de aprovação enviada pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas/ Fundação Oswaldo Cruz (INI/ FIOCRUZ) .....	83

## 1. INTRODUÇÃO – REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. O agente etiológico da esporotricose

O agente etiológico da esporotricose pertence a um complexo de fungos do gênero *Sporothrix*. *Sporothrix* spp é caracterizado como fungo dimórfico. A forma encontrada no ambiente é a micelial, caracterizando-se por ser um micélio filamentosos septado que produz conídios em forma de flor. É fungo geofílico, distribuído amplamente na natureza, e sapróbio, isto é, que depende de matéria orgânica em decomposição para sobreviver, encontrado principalmente em solo rico em matéria orgânica, em folhas secas, madeira, espinhos (principalmente de roseiras), entre outros (Lopes-Bezerra et al., 2006; Antunes et al., 2009), mas que também é descrito em pelo, unhas e cavidade bucal de animais. No tecido dos hospedeiros infectados (forma parasitária) apresenta-se com aspecto leveduriforme (Howard 1960; Ginn et al., 2007).

Atualmente, está estabelecido por estudos moleculares que o gênero *Sporothrix* é formado por diversas espécies e por isso, o grupo é denominado complexo *Sporothrix* spp., também denominado *Sporothrix schenckii* sensu lato. As espécies até o momento identificadas são: *Sporothrix schenckii* sensu stricto, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. luriei* e *S. pallida*. (Oliveira et al., 2011, Fernandes et al., 2013, Liu et al., 2013, Oliveira et al., 2013, Oliveira et al., 2014, Almeida-Paes et al., 2015).

Evidências sugerem que os fungos do gênero *Sporothrix* são capazes de modificar sua virulência sob diferentes condições ambientais (Tellez et al., 2014; Batista-Duarte et al., 2015). Os principais fatores são: presença de enzimas extracelulares (que causam depressão da resposta imune e têm atividade proteolítica, degradando anticorpos) (Antunes et al., 2009; Barros et al., 2011; Telléz et al., 2014); a termotolerância (capacidade do fungo de crescer a 35° e/ou 37°C); a composição da parede celular (contendo peróxido de ergosterol, integrinas e adesina lectina-símile) (Antunes et al., 2009; Barros et al., 2011) e a presença de melanina (protege contra danos físicos e químicos) (Romero-Martinez et al., 2000; Antunes et al., 2009; Barros et al., 2011; Almeida-Paes et al., 2015; Fernandes et al., 2013, Rodrigues et al., 2014b). Neste contexto, a espécie *S. brasiliensis* tem se mostrado mais virulenta que *S. schenckii* sensu

stricto, mas ambas produzem quadro clínico semelhante. *S. schenckii* sensu stricto, é identificado como responsável pela maior parte dos casos de esporotricose humana em todo o mundo, com exceção do Brasil, onde *S. brasiliensis* está envolvido em uma zoonose em expansão transmitida por gatos (Oliveira et al., 2011; Rodrigues et al., 2013). Estes resultados corroboram dados encontrados por Marimon et al. (2007) em estudo descritivo sobre as novas espécies do complexo *Sporothrix* realizado em 127 cepas coletadas de diversas partes do mundo, em que *Sporothrix brasiliensis* só foi encontrado nas amostras provenientes do Rio de Janeiro. Esta espécie, quando comparada às outras, se mostrou com maior potencial de destruição tecidual, e de maior gravidade clínica, o que nos chama a atenção para a influência da espécie patogênica na evolução da infecção. (Freitas et al., 2015, Lopes-Bezerra et al., 2018).

Estas duas espécies parecem ser as mais relevantes do ponto de vista clínico, como causadoras da doença, e também do ponto de vista imunológico, na compreensão dos mecanismos de balanço entre regulação e inflamação. (Arrillaga-Moncrieff et al., 2009; Castro et al., 2013; Della Terra et al., 2017).

## 1.2. Transmissão da esporotricose

Classicamente a transmissão ocorre pela inoculação traumática de células fúngicas nos tecidos cutâneo e subcutâneo do hospedeiro a partir de acidentes com matéria orgânica vegetal, o que levou a infecção ser conhecida popularmente como “doença do jardineiro” e “doença da roseira” (Bhutia et al, 2011; Silva et al., 2012; Oliveira et al., 2014)

Em razão de sua estreita relação com o solo e matéria orgânica de origem vegetal, a esporotricose é classicamente observada com maior frequência entre indivíduos que mantêm contato constante com plantas, como os agricultores, floristas, jardineiros e demais profissionais de áreas afins, expostos à inoculação traumática, atribuindo caráter ocupacional à doença (Orellana et al., 2009).

Contudo, nos últimos anos, diante da epidemia de esporotricose felina no estado do Rio de Janeiro, Brasil, foi verificada a intensificação da via de transmissão através da arranhadura e mordedura do gato doméstico, e com isso, cuidadores de animais e veterinários também passaram a ser consideradas como profissões de risco (Schubach et al., 2002; Barros et al., 2010; Barros et

al., 2011; Pereira et al., 2014). Agentes de laboratório que manipulam amostras clínicas e culturas de fungos do complexo *Sporothrix schenckii* também possuem risco aumentado para a infecção (Barros et al., 2010)

Apesar da esporotricose ocorrer em outros animais, parece que os gatos são os únicos que apresentam um potencial zoonótico importante em virtude da elevada quantidade de leveduras encontrada nas lesões, pelos unhas e cavidade oral. Esta particularidade facilitaria a transmissão pelo contato, através da arranhadura, mordedura ou até mesmo pelo contato com exsudato das lesões dos animais doentes. O isolamento do fungo proveniente das cavidades nasal e oral, fragmentos de unhas, exsudato de lesões cutâneas e mucosas, órgãos internos e sangue de gatos, associado aos relatos de casos humanos de esporotricose, e a alta equivalência genotípica demonstrada entre isolados felinos e isolados de humanos com os quais os gatos se relacionam demonstram a importância do gato como fonte de infecção (Schubach et al., 2002; Schubach et al., 2008; Reis et al., 2009; Barros et al., 2010; Barros et al., 2011; Miranda et al., 2011, Pereira et al., 2011; Schubach et al., 2012; Silva et al., 2012; Borges et al., 2013, Miranda et al., 2013)

Formas não habituais de transmissão, como a inalatória, têm sido descritas. Embora a inalação de fungos do gênero *Sporothrix* raramente dê início à infecção pulmonar em indivíduos sem comorbidades, o mesmo não se verifica em imunodeprimidos, podendo inclusive evoluir para a forma sistêmica. (Campos et al., 1994; Leme et al., 2007).

### 1.3. A micose: um breve histórico

A esporotricose é uma micose que acomete o tecido cutâneo e subcutâneo, que pode acometer vasos linfáticos, com apresentação clínica subaguda ou crônica. Em condições clínicas não usuais, pode acometer outros órgãos, com a forma disseminada extra-cutânea (Barros et al., 2011; DeBeer et al., 2016). Foi descrita pela primeira vez em 1898, por Benjamin Schenck, no Johns Hopkins Hospital em Baltimore, nos Estados Unidos, onde foi realizado o primeiro isolamento do fungo em um menino que apresentava lesões na mão e no braço. O fungo foi identificado, e classificado pelo micologista Erwin Smith como pertencente ao gênero *Sporothrichum*. (Schenck, 1898). Poucos anos depois, em 1900, Hektoen e Perkins, relataram um caso de um abscesso

subcutâneo, também nos Estados Unidos. A lesão inicial evoluiu para lesão ulcerada e nódulos, além de linfangite secundária. Os autores isolaram o fungo, que foi denominado *Sporothrix schenckii* (Hektoen e Perkins, 1900). Desde então, diversos casos foram descritos envolvendo humanos e animais, e classicamente a esporotricose vem cursando com surtos isolados e limitados em diversas regiões do planeta. Como exemplo podemos citar um trabalho realizado na África na década de 40 do século XX, onde foram descritos mais de 3.000 casos de esporotricose em mineradores, infectados pelo contato com madeira contaminada pelo fungo. Este foi o maior surto epidêmico de esporotricose pulmonar já relatado até hoje. (Morris-Jones, 2002).

No final da década de 90 do século XX começaram a surgir relatos cada vez mais frequentes (Bhutia et al., 2011, Dias et al., 2011, Song et al., 2011, Sivagnanam et al., 2012, Verma et al., 2012, Mata-Essayag et al., 2013, de Oliveira et al., 2014), sendo a esporotricose hoje considerada a micose subcutânea mais relatada e globalmente distribuída (Bonifaz et al., 2017). Nesse contexto, Lupi et al., 2005 ressaltam a importância do correto diagnóstico, sobretudo em pacientes imunodeprimidos, mais suscetíveis a estas infecções. O Peru é considerado um país hiperendêmico para esporotricose. Também há casos descritos na Guatemala, no México, e em outros continentes além das Américas e África, como Ásia e Europa, sendo este último o com menos relatos. (Pappas et al., 2000, Lyon et al., 2003, Chakrabarti et al., 2015). Estes trabalhos confirmam a dispersão geográfica e o aumento do número de casos de esporotricose em várias regiões do planeta.

No Brasil, Lutz e Splendore (1907) descreveram o primeiro caso de esporotricose humana no Brasil. (Barros et al., 2010). Em 1912, Terra e Rabelo descreveram o primeiro caso humano no Rio de Janeiro. Desde então, outros relatos de casos, sempre em pequeno número foram sendo publicados. No entanto, este número vem aumentando relativamente desde o final da década de 90 do século XX. Em 2004, Barros et al. descrevem o primeiro relato de transmissão zoonótica a partir da arranhadura por felino doméstico no Rio de Janeiro (Barros et al., 2004), e desde então tem ocorrido um aumento importante da transmissão por felinos, o que configurou uma mudança no perfil clássico de transmissão por madeiras e vegetais contaminados. Entre 1998-2009 foram relatados mais de 2000 casos de esporotricose humana no município do Rio de

Janeiro, que hoje é considerado por vários grupos como sendo área hiperendêmica da doença, o que configura um problema de saúde pública (Barros et al., 2011).

A partir de 2013, os casos de esporotricose humana foram incluídos como doença de notificação compulsória pelo Ministério da Saúde, (Resolução SES nº 674 de 12 de julho de 2013) e em 2014, também foram assim definidos os casos de esporotricose animal. (Brasil, 2014)

#### 1.4. A doença e suas apresentações clínicas

No ser humano, a esporotricose se caracteriza por ser uma doença que atinge o tegumento, podendo ser evidenciada em diversas apresentações clínicas, sendo as mais comuns a forma linfocutânea, responsável por cerca de 70-75% dos casos. Geralmente está localizada nos membros superiores, inferiores e na face. Caracteriza-se por nódulos ulcerados dolorosos e/ou pruriginosos, linearmente distribuídos ao longo de um cordão de linfangite. A forma fixa atinge 20-25% dos pacientes, costuma também se apresentar em membros superiores e inferiores, mas também em dorso e face, com lesão única, podendo ser ulcerada, placa infiltrada ou lesão verrucosa, com halo eritematoso ou violáceo, e tem crescimento lento. (Barros et al., 2004; Ramos-e-Silva et al., 2007; Schechtman, 2010; Barros et al., 2011).

Outras formas clínicas menos comuns como a forma disseminada, em que pode haver comprometimento dos ossos e articulações, pulmões, sistema nervoso central, pele e membranas mucosas, que são preferencialmente afetadas, uma vez que o fungo entra na corrente sanguínea. As lesões tegumentares podem se mostrar heterogêneas e polimórficas e devem ter atenção especial. As manifestações sistêmicas podem ser graves, com lesões ósseas importantes, além de lesões cutâneas e mucosas disseminadas, envolvimento de pulmão e baço. Esta apresentação clínica parece estar mais relacionada com condições clínicas de imunossupressão, como HIV/AIDS, alcoolismo, desnutrição, neoplasias hematológicas (linfomas e leucemias) e tratamento prolongado com corticosteroides (Freitas et al., 2012; Orofino-Costa et al., 2013). Em gestantes também há relatos desta forma de apresentação clínica mais grave, assim como há casos excepcionais em pacientes

imunocompetentes. Também foram relatadas formas clínicas extracutâneas, com acometimento primário de mucosas (conjuntival e/ou nasal), sendo a mucosa conjuntival mais frequentemente acometida, e outras apresentações clínicas como a forma visceral e a osteoarticular que são consideradas pouco frequentes (Aronowitz et al., 2017, Bonifaz et al., 2017).

Com o aumento do número de casos, manifestações de hipersensibilidade como quadros de eritema nodoso, eritema multiforme e sintomas como artralgia e artrite inflamatória também foram descritas pela primeira vez associadas à esporotricose (Severo et al., 1999; Barros et al., 2004; de Lima Barros et al., 2003; Schubach et al., 2005; Gutierrez-Galhardo et al., 2002; Gutierrez-Galhardo et al., 2005; Schubach et al., 2004, Barros et al., 2005; Bonifaz et al., 2010; Bunce et al., 2012; Ferreira et al., 2012; Freitas et al., 2012; Nassif et al., 2012; Hassan et al., 2016).

### 1.5. Diagnóstico

Diagnóstico clínico da esporotricose muitas vezes representa um desafio, sobretudo no estado do Rio de Janeiro, onde há áreas endêmicas sobrepostas de esporotricose e leishmaniose tegumentar americana, que clinicamente pode se apresentar de forma muito semelhante à esporotricose. A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é um dos mais importantes diagnósticos diferenciais da esporotricose, sendo a forma cutânea-localizada (*localized cutaneous leishmaniasis* -LCL) da LTA a ser diferenciada com a forma fixa (F) da esporotricose, e a forma esporotricóide (*sporotrichoid cutaneous leishmaniasis* - SCL) da LTA, com a forma linfocutânea (LC) da esporotricose. (Morgado et al., 2018).

Também há descrito o aumento do número de casos de esporotricose, em regiões fora do município do Rio de Janeiro, o que pode trazer dificuldade na confirmação diagnóstica, por serem usualmente áreas mais isoladas, com menos disponibilidade de recursos e acesso à informação (Evans et al., 2012, Lauermann et al., 2012, Nakamura et al., 2012, Quintella et al., 2012, Aung et al., 2013, Di Luca et al., 2013, Kawtar et al., 2013, Orofino-Costa et al., 2013, Zhang, Pyla, 2014<sup>a</sup>; Montenegro et al., 2014; Sanchotene et al., 2015).

Culturas de material de lesões exsudativas, biópsia de tecido, escarro e sangue são o padrão ouro para o diagnóstico. Os fungos podem ser isolados entre 5-8 dias em amostras cultivadas a 28°C em ágar Sabouraud dextrose com e sem antibióticos. No entanto, o simples crescimento de fungo nestas condições não conclui o diagnóstico. Este só é possível após o teste de conversão do cultivo das colônias inicialmente isoladas a 28°C em condições específicas a 37°C em meios considerados ricos de nutrientes (ágar sangue, ágar chocolate, ágar BHI – Brain Heart Infusion). Nestas condições o fungo produz colônias leveduriformes, caracterizando os fungos patogênicos do gênero *Sporothrix* spp. (Bonifaz et al., 2010; Barros et al., 2011).

Exames diretos, como a microscopia, e colorações histológicas não são considerados úteis para o diagnóstico de esporotricose linfocutânea ou fixa, pois os elementos leveduriformes são observados em baixa porcentagem (5% a 10%). Quando presentes, leveduras podem ser vistas de forma dispersa, e podem apresentar um halo irradiado como corpos asteroides ou também chamado fenômeno de Splendore-Hoeppli, nas colorações de rotina. Este fenômeno parece estar relacionado à presença de eosinófilos em torno do fungo, e também depósito de imunoglobulinas na parede celular do fungo. Já em formas disseminadas e na forma pulmonar, onde o fungo costuma ser abundante, as colorações específicas podem ser mais sensíveis. Dentre elas podemos citar coloração pelo ácido periódico de Schiff (PAS) e Gomori-Grocott. Neste método o principal diagnóstico diferencial é com a histoplasbose (Quintella et al., 2011). Geralmente, o que predomina no tecido é uma dermatite granulomatosa crônica difusa, com abscesso central na maioria das vezes. Este tipo de descrição é pouco específico, e por isso, nem sempre pode confirmar o diagnóstico (Zhang et al., 2011).

Técnicas de imunofluorescência para elementos fúngicos também podem ser úteis, mas não são usadas na rotina (Bustamante et al., 2001; Bonifaz et al., 2010; Barros et al., 2011; Quintella et al., 2011).

Outros métodos diagnósticos como exames sorológicos e PCR podem ser usados, mas têm seu emprego ainda voltado para fins de pesquisa em sua maioria.

As técnicas de reconhecimento molecular do fungo por meio da PCR, parecem ser bastante promissoras, para fins de estudos epidemiológicos,

permitindo a caracterização das diversas espécies do complexo *S. Schenckii* sensu lato, e também otimizando o diagnóstico e o tratamento. Existem algumas técnicas descritas, como sequenciamento de DNA do fungo por meio da identificação de regiões chamadas de ITS (*Internal Transcript Spacer*), que são comuns a todas as espécies do complexo *Sporothrix*. (Zhou et al., 2014). Também é possível analisar partes do genoma do fungo por meio de enzimas de restrição (PCR-RFLP), técnica que se mostrou rápida, de fácil execução, e com baixo custo. (Rodrigues et al., 2014) O sequenciamento por meio de *primers* do DNA do fungo *Sporothrix* também é uma ferramenta molecular de baixo custo, rápida e robusta, capaz de detectar e identificar o DNA do patógeno com base em espécimes isolados, e em amostras biológicas complexas (biópsia, solo, culturas mistas, etc.), sem a necessidade de isolar o patógeno. (Rodrigues et al., 2015)

Existe ainda a técnica que sequencia o DNA do fungo através da amplificação do círculo de rolamento (RCA), que se mostra método bastante confiável, com boa sensibilidade, apesar de ser pouco usado. (Rodrigues et al., 2015)

Bernardes-Engemann et al., 2005, realizaram um estudo em que o ELISA para SsCBF (*Sporothrix schenckii* con A-Binding fraction), um antígeno de parede celular da fase de levedura do *S. schenckii*, foi feito em 92 pacientes com diagnóstico de esporotricose em variadas apresentações clínicas, sendo a maioria linfocutânea (67%) e os 33% restantes distribuídos entre as formas fixa, cutânea disseminada e extracutânea. Também foi feito ELISA em 77 pacientes com outras micoses: aspergilose (n=6), histoplasmose (n=8), paracoccidiomicose (n=35), cromoblastomicose (n=10) e criptococose (n=18), e em 30 pacientes controle. Os resultados demonstraram que, apesar de ter havido reatividade cruzada entre pacientes com esporotricose e pacientes com cromoblastomicose, a técnica apresentou sensibilidade de 90% e especificidade de 80%, e se mostrou útil para diagnóstico e acompanhamento de melhora laboratorial para esporotricose em todas as formas clínicas estudadas. Recentemente foi publicado outro trabalho com o uso da técnica de ELISA no diagnóstico da esporotricose, comparando possíveis elementos a serem usados para aprimorar a especificidade e a sensibilidade do método, como o metaperiodato de sódio e solução de ureia, comparando o soro de pacientes com esporotricose,

paracoccidiomicose, e pacientes sem doença. A conclusão foi de que o uso da ureia melhora a eficácia do método, e diminui as chances da reatividade cruzada, que é um dos maiores limitadores do uso da técnica para fins diagnósticos, além do alto custo. (Coelho et al., 2019). Entretanto, não há disponibilidade em rede pública, sendo restrito a alguns centros, e para casos específicos, como formas disseminadas ou atípicas, em que outros métodos não são definitivos.

## **1.6. A resposta imune na esportrricose**

Após a inoculação do fungo, vários mecanismos da imunidade inata são ativadas para controlar a infecção diretamente, estimulando a resposta imune específica (Carlos et al., 1994; Gonçalves et al., 2015; Ferreira et al., 2015; Maia et al., 2016; Jellmayer et al., 2017). A importância desses mecanismos imunes para o controle da infecção por *S. schenckii* é evidenciada pela maior colonização e disseminação de fungos em modelos de camundongos imunossuprimidos (Manente et al., 2018; Batista-Duarte et al., 2018a) e pacientes imunocomprometidos, principalmente indivíduos com HIV-AIDS (Moreira et al., 2015).

Dados referentes à resposta imune inata têm surgido indicando sua participação no direcionamento da resposta imune. Negrini et al. (2013), demonstraram que TLR-2 (*toll-like receptor-2*), numa fase inicial, parece ser importante na iniciação da resposta imune por facilitar a fagocitose dos elementos fúngicos, estimulando a produção de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-1 $\beta$  e IL-10, assim como IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-17 e TGF- $\beta$ , além de óxido nítrico. Estas citocinas têm sido implicadas na derivação de resposta Th1 e/ou Th17 e na consequente regulação da diferenciação de CD4 na resposta fungo-específica (Espinosa, Rivera, 2012; Maia et al., 2016). O receptor TLR-4 (*toll-like receptor-4*) presente nas células do hospedeiro também reconhece lipídios da superfície das leveduras do *Sporothrix* spp. ativando o sistema imune que resulta na indução de uma resposta oxidativa contra o fungo (SASSÁ et al., 2012).

Recente trabalho de Ferreira et al., (2018), analisou a participação das células natural killer (NK) em infecção pelo *Sporothrix schenckii* sensu stricto em modelo murino. A depleção de células NK prejudicou drasticamente a eliminação

dos fungos. Houve aumento de mais de oito vezes na carga fúngica esplênica. Também houve resposta inflamatória sistêmica mais intensa nesse grupo, evidenciada pela presença de marcadores como TNF-alfa, IL-6 e INF-gama. Sabe-se da relevante participação das células NK (*natural killer*), por meio da liberação de perforinas e granzimas, em infecções por *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* e *Histoplasma capsulatum*. (Schmidt et al., 2013; Schmidt et al., 2017). Este estudo parece ser, até o momento, o único realizado para demonstrar a ação de células NK na esporotricose, e concluiu que estas células desempenham papel essencial para proteção contra *S. schenckii*. (Ferreira et al., 2018).

Lu et al. (2017), realizaram um estudo para demonstrar a participação de mastócitos na presença de algumas infecções parasitárias. No curso da infecção por *Toxoplasma gondii* por exemplo, houve aumento no número de mastócitos. Na infecção pelo *Trypanosoma cruzi* observaram que o maior número de mastócitos se associava a mais fibrose no cólon, e maior carga parasitária no miocárdio. Romo-Lozano et al. (2012), realizaram um estudo avaliando o papel dos mastócitos em infecção pelo *Sporothrix schenckii* em ratos, a partir do contato de células peritoneais desses animais com os conídeos do fungo. Demonstraram que os mastócitos facilitam a disseminação dos fungos e aumentam a gravidade clínica da infecção. A ação dos mastócitos é importante na resposta imune inata, com base nos estudos feitos até o momento, assim com a participação dos neutrófilos, e demais células da resposta imune inata, como macrófagos e células dendríticas.

Outros componentes da resposta imune *in situ*, notadamente na interface resposta imune inata/adquirida, parecem desempenhar papel importante na diferenciação e derivação da resposta imune T e seus subtipos. Trabalhos realizados também demonstraram a participação da resposta imune humoral, por meio de anticorpos da classe IgG e IgA, desempenhando importante papel na resposta imune específica ao *Sporothrix schenckii*. Também a participação de subclasses de IgG, especialmente IgG1 e IgG 3, foi descrita em murinos, em reação ao antígeno 70DKa expresso por esse fungo. (Nascimento et al., 2005, Almeida-Paes et al., 2013). O sistema complemento, principalmente a via alternativa, atua na fagocitose e lise das leveduras através da deposição de C3b na parede celular do fungo (SCOTT et al., 1986).

Verificou-se que células dendríticas (*dendritic cells* - DC) podem regular o balanço de resposta anti e pro inflamatória a fungos na dependência do reconhecimento de antígenos que sugerem que diferentes estímulos podem induzir variadas resposta imunes (Verdan et al., 2012). Ferreira et al. (2018) observaram importante participação de células *natural killer* no controle da infecção fúngica pelo *Sporothrix schenckii* sensu stricto, bem como na liberação de citocinas pro-inflamatórias, por meio de experimentos com ratos. Em trabalho do nosso grupo verificamos que, mesmo em lesões estabelecidas, a presença de neutrófilos em abundância caracterizava as formas mais exuberantes de lesão. (Morgado et al., 2011). A presença de supuração associada a infiltração de neutrófilos em lesões linfocutâneas também foi descrito (Quintella et al., 2011).

Por outro lado, há muito que se reconhece que a imunidade protetora contra patógenos fúngicos depende da ativação de células ligadas à resposta imune adaptativa, envolvendo subconjuntos Th1 e Th17 de linfócitos T, enquanto uma resposta Th2 elevada promove infecções fúngicas (van de Veerdonk e Netea, 2010). Além disso, foram realizados alguns estudos sobre o papel das células T reguladoras (Tregs), um subconjunto de células T com fenótipo CD3+CD4+CD25+ Foxp3+, que regula as respostas do sistema imunológico. Vale ressaltar que o papel das células Tregs na infecção por fungos ainda é controverso. Alguns estudos mostraram que as Tregs aumentam a proteção contra diferentes fungos como *Candida albicans* (Pandiyan et al., 2011; Netea et al., 2004) e *Cryptococcus neoformans* (Schulze et al., 2014; Wiesner et al., 2016), enquanto em outros modelos, Tregs promoveram infecção fúngica (Felonato et al., 2012; Whibley et al., 2014).

Estudos sobre o mecanismo de infecção e estabelecimento da esporotricose em casos humanos e modelos animais buscam entender a dinâmica da interação fungo-vertebrado (Tachibana et al., 1998, Tachibana et al., 1999, Morgado et al., 2011, Guzman-Beltran et al., 2012, Li et al., 2012, Romo-Lozano et al., 2012, Verdan et al., 2012, Negrini Tde et al., 2013, Rodrigues et al., 2013). Estudos têm sido realizados para entender a maior susceptibilidade de felinos, com a perspectiva de controlar a infecção nesses animais (Barros et al., 2011, Miranda et al., 2013, Miranda et al., 2016); descrição da circulação de novas espécies e a determinação da circulação de complexos

de espécies têm sido indicados em algumas regiões (Oliveira et al., 2011, Fernandes et al., 2013, Liu et al., 2013, Oliveira et al., 2013, Oliveira et al., 2014, Rodrigues et al., 2014<sup>a</sup>).

Um fato considerado importante é a compreensão da interação entre o fungo, enquanto agente causal da esporotricose, e a resposta imune do hospedeiro (tanto em animais quanto em humanos), o que possibilita i) o desenvolvimento de casos típicos e atípicos, ii) leves ou graves, iii) de fácil controle ou difícil evolução para a cura clínica. Neste tópico, estudos realizados em modelo murino de infecção experimental (exemplificado por Carlos et al., 2009), sugerem a importância da imunidade celular na resistência do hospedeiro a esta infecção fúngica. A resposta imune celular bem modulada seria importante para o controle da infecção e em casos de exacerbação da função efetora a lesão tecidual poderia ser agravada. Estes dados são muito semelhantes aos identificados em outras doenças cutâneas, notadamente na leishmaniose (exemplificado por Gaze et al., 2006).

Diferenças na imunogenicidade entre os diversos isolados clínicos de *S. schenckii* sensu lato e o reconhecimento de vários antígenos fúngicos por anticorpos específicos induzidos em humanos, gatos e roedores foram relatados (Fernandes et al., 2013; Della Terra et al., 2017). Além destes, outros estudos também demonstraram como a imunidade celular na esporotricose promove proteção, por meio da resposta imune de linfócitos T auxiliares (Th1, Th2 e Th17) induzida in vitro ou em modelos murinos infectados pelo *S. schenckii* sensu stricto (Uenotsuchi et al., 2006; Maia et al., 2006; Ferreira et al., 2015; Gonçalves et al., 2017). No entanto, o papel das Tregs na esporotricose ainda não foi determinado, e estudos comparativos de resposta imune celular para as diferentes espécies de *S. schenckii* sensu lato não foram realizados. Além da controvérsia sobre o papel de célula T reg no controle das infecções fúngicas, o perfil de células Th17 também é controverso pois pode ser estimulado pelas citocinas de regulação, liberadas neste contexto de células T regulatórias (Osório et al. 2008).

Recentemente, foi relatado que diferenças na composição da parede celular entre *S. schenckii* sensu stricto e *S. brasiliensis* podem modular a interação do fungo com os receptores de células mononucleares humanas durante a infecção. (Martínez-Alvarez et al., 2017). Outros estudos recentes

mostraram que várias proteínas potencialmente envolvidas em estratégias de evasão imune são expressas em *S. brasiliensis*, mas não em *S. schenckii* (Rossato et al., 2018), e que *S. brasiliensis* produz os mais altos níveis de estresse oxidativo em um modelo murino entre as espécies de *S. schenckii* sensu lato (Mario et al., 2017). Esses achados sugerem que também deve haver diferenças na estimulação de respostas específicas das células T entre essas duas espécies. Neste contexto, recente trabalho foi realizado para analisar comparativamente a resposta de linfócitos T CD4+ induzida por *S. schenckii* sensu stricto e *S. brasiliensis* em modelo murino de esporotricose subcutânea. Demonstrou-se que o padrão na infecção por *S. brasiliensis* sugere uma resposta imune celular mediada por Th17, numa tentativa de controlar a infecção fúngica enquanto reduz a resposta inflamatória excessiva e deletéria por meio das células T regulatórias. (Batista-Duarte et al., 2018)

Chen et al. (2015), descreveram uma possível relação entre baixos níveis percentuais de células do perfil Th1 e Th17 com manifestações clínicas mais importantes e maior tempo de duração da doença. Diante disto, é sugerida a combinação terapêutica de antifúngico e imunomoduladores, o que aponta a influência da resposta imune na evolução da esporotricose.

A capacidade do patógeno fúngico de causar doença depende de sua sobrevivência no hospedeiro por evasão do sistema imunológico, principalmente o mecanismo antimicrobiano dos fagócitos. A função das células imunes está intimamente ligada à geração de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* -ROS) e é fortemente influenciada pelo potencial redox do ambiente extracelular. Além disso, o equilíbrio oxidante / antioxidante intracelular é um determinante importante da atividade da célula imune; o nível antioxidante nas células imunológicas desempenha um papel crucial na proteção contra o estresse oxidativo e na preservação da função adequada. A esporotricose causa dano tecidual, o que pode levar a um estado de estresse oxidativo, reduzindo a resposta imune e melhorando a sobrevivência de patógenos no hospedeiro. Os resultados sugerem que um defeito na função da NADPH oxidase causa esporotricose sistêmica letal e, portanto, ânion superóxido e seus metabólitos produzidos por fagócitos desempenham um papel importante na proteção do hospedeiro contra esse fungo. (Kajiwara et al., 2004)

Schaffner et al., (1986), relataram que o *S. schenckii* com maior virulência se mostrou resistente à morte por neutrófilos e também por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A ativação de macrófagos também induz a produção de espécies reativas de oxigênio e intermediários de nitrogênio como óxido nítrico (NO), que parecem exercer papel protetor, facilitando a eliminação de agentes infecciosos, com o *Sporothrix* spp. (Nathan et al., 1991). O estudo das espécies reativas de oxigênio produzidas por neutrófilos e macrófagos é de grande interesse para melhor compreensão do papel da imunidade inata em todo este mecanismo. Neutrófilos secretam metabólitos oxidativos com ação fungicida e fungistática contribuindo com a resposta inata.

Na resposta imune adquirida do tipo Th1, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e outras células apresentadoras de antígeno secretam interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), ativando macrófagos que então, sob ação do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), produzem óxido nítrico que apresenta intensa toxicidade contra o *Sporothrix* spp. Após fagocitar conídios e leveduras, os macrófagos também produzem espécies reativas de oxigênio de ação fungicida e fungistática (Gonçalves et al., 2017; Flores-García et al., 2015; Lee et al., 2017).

Apesar do conhecimento produzido, o modelo murino e os estudos in vitro podem não ser apropriados para a compreensão de fatores relacionados à evolução clínica das diferentes formas de apresentação da esporotricose humana. No entanto, devido à escassez de casos, as informações existentes na literatura sobre a resposta imune específica ao *S. schenckii* em pacientes ainda é inconsistente, principalmente aquelas verificadas em estudos da inflamação *in situ*, campo no qual poucos trabalhos foram publicados (Koga et al., 2001, Koga et al., 2002, Morgado et al., 2011, Quintella et al., 2011; Morgado et al., 2016).

Em duas publicações (Koga et al., 2001, Koga et al., 2002) os autores estudaram 5 casos e verificaram que 0,2 a 0,8% das células do infiltrado inflamatório eram células dendríticas de permeio a um infiltrado misto de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, além de células IFN-gama positivas, semelhantes a células linfóides mononucleares na periferia dos granulomas. Em dois artigos recentes foi estudada a lesão tecidual de SP por histopatologia (Quintella et al., 2011) e a composição/organização do processo inflamatório por imunohistoquímica (Morgado et al., 2011). Neste último, nosso grupo estudou a inflamação *in situ* comparando casos de forma fixa e linfocutânea (LC) da esporotricose e verificou-

se que a maior extensão e potencial de gravidade das lesões na forma linfocutânea (LC) poderiam ser explicadas pela maior intensidade de reação inflamatória *in situ* o que levaria à destruição tecidual. Por outro lado, a resposta imune nas lesões de forma fixa da esporotricose foi mais balanceada levando ao controle da infecção sem destruição do tecido adjacente e propagação do fungo. (Morgado et al., 2008). Observou-se que, ao contrário da forma fixa da esporotricose, as lesões da forma LC apresentaram reação inflamatória mais intensa e difusa associadas a intensa necrose e formação de pus, caracterizando uma resposta imune descontrolada. A maior gravidade destas lesões pôde ser associada ao maior percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, linfócitos B CD22<sup>+</sup>, neutrófilos e expressão de NOS2, que sugere maior atividade inflamatória. Observou-se que a resposta imune do hospedeiro, em especial da pele, mantém um padrão fenotípico e de atividade inflamatória, porém com algumas peculiaridades que poderiam influenciar a progressão da doença.

Em outro trabalho, Morgado et al. avaliaram os níveis de IL-10 e INF- $\gamma$  sistêmicos e nas lesões *in situ* das formas cutâneas fixa e linfocutânea em pacientes com esporotricose, comparando-os com os de indivíduos saudáveis. Demonstraram que os níveis sistêmicos de INF- $\gamma$  eram maiores nos pacientes com esporotricose que nos indivíduos saudáveis, mas não havia diferença significativa nos níveis *in situ* de INF- $\gamma$  entre as duas formas clínicas. Já em relação à IL-10, os níveis *in situ* foram maiores nas lesões da forma linfocutânea do que nas da forma fixa, mas não houve diferença entre os níveis sistêmicos, quando comparados com indivíduos saudáveis. (Morgado et al., 2016).

Em particular, o tegumento cutâneo é descrito como sendo fundamental no desenvolvimento e seleção da resposta imune a vários agentes causais (Conceição-Silva et al. 1990, Pirmez et al. 1990, Conceição-Silva et al. 1994, Ahmed et al. 1994, Conceição-Silva et al. 1998, Khanolkar-Young et al. 1998, Orteu et al. 1998, Bertho et al. 2000). Assim, nos últimos anos uma grande quantidade de conhecimento sobre este órgão tem se acumulado, ajudando a montar um quebra-cabeça bem mais complexo do que se conhecia anteriormente. Neste sentido, o estudo da resposta imune *in situ* dos fenômenos regulatórios nas lesões de esporotricose pode auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos no processo inflamatório localizado. A compreensão destes mecanismos terá um impacto inegável na produção de

imunomoduladores e vacinas para o controle da esporotricose. Isto representa uma área crescente de pesquisa e promete importantes avanços em um futuro imediato (Batista-Duarte et al., 2016; Almeida et al., 2015; Portuondo et al., 2016, 2017; de Almeida et al., 2018).

### **1.7. A importância do diagnóstico diferencial entre esporotricose e leishmaniose**

As leishmanioses tegumentares (LT) são protozooses causadas por parasitas do gênero *Leishmania*. No Brasil, a principal espécie nomeada é a *Leishmania brasiliensis*, que é capaz de produzir tanto lesões cutâneas, quanto lesões mucosas. (Kevric et al., 2015) Em várias regiões do país, e principalmente no Rio de Janeiro, as áreas endêmicas de LT e esporotricose se sobrepõem, e devido a semelhança clínica entre as lesões cutâneas, o diagnóstico pode ser difícil, especialmente nos serviços que não possuem condições de realizar cultivos seletivos, exame histopatológico e diagnósticos moleculares. Muitas vezes o diagnóstico é meramente clínico, baseado na história epidemiológica e na reação de Montenegro (Orofino-Costa et al., 2013). Esta última, indica o contato do paciente com o agente etiológico da LT, mas não é capaz de afirmar que a lesão seja causada por parasitas do gênero *Leishmania*. Já que é um teste que demonstra a presença de memória imunológica celular por meio da reação de hipersensibilidade tipo IV, pela classificação de Gell e Coombs. (Olivier et al., 2016; Sanchez et al., 2017)

Neste sentido, conhecer melhor as características de diferenças entre as duas infecções é fundamental para o correto diagnóstico e tratamento. Por outro lado, reconhecer semelhanças na resposta imunológica das duas infecções pode se mostrar interessante para a elucidação de vias comuns do processo inflamatório, que influenciam na evolução clínica. Este conhecimento poderia ser útil também para definição de tratamentos e condutas que possam atuar nas duas infecções com base nestes achados.

Neste contexto, publicamos recentemente um artigo comparativo da resposta imune nas lesões de forma fixa da esporotricose, em comparação a forma localizada da LT, e da forma LC da esporotricose com a forma

esporotricose da LT. Este trabalho é parte dos resultados deste trabalho, e demonstrou semelhanças e diferenças específicas da resposta inflamatória nas duas infecções. (Morgado et al., 2018)

### 1.7. Justificativa

Além das diferenças inerentes ao tipo de agente infeccioso, outras podem surgir devido a particularidades entre espécies do mesmo patógeno ou mesmo entre variantes de uma mesma espécie. (Oliveira et al., 2011, Rodrigues et al., 2013, Oliveira et al., 2014, Rodrigues et al., 2014b). Neste contexto, nos últimos anos foi demonstrada a presença de várias espécies do gênero *Sporothrix*, antes descritas genericamente como *S. schenckii*. Assim, hoje é consenso que o complexo *Sporothrix schenckii* sensu lato é formado pelas espécies *S. schenckii* sensu stricto, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. luriei*, *S. pallida* e *S. brasiliensis*. Esta última parece ser a mais comum em nosso país (Rodrigues et al., 2013), e parece causar um maior grau de destruição tecidual (Bonifaz et al., 2017). No entanto, o mecanismo que proporciona essas diferenças ainda não é completamente esclarecido e esta informação é importante não só para a correta compreensão da interação entre agente infeccioso e hospedeiro, mas também para facilitar a intervenção de modo a melhorar a evolução clínica de casos atualmente de difícil controle.

Analisar aspectos funcionais da resposta imune como sua ação reguladora também pode assumir papel importante na compreensão da resolução das lesões. Entender este balanço pode indicar como a resposta imune é direcionada e/ou se mantém, levando a um melhor entendimento da evolução da micose. Neste sentido, compreender alguns aspectos da formação do processo inflamatório presente nos diferentes tipos de lesão de esporotricose e de outras infecções clinicamente semelhantes como a leishmaniose tegumentar americana pode descortinar informações que elucidem o entendimento de alguns mecanismos imunes da pele, que ocorrem na presença de patógenos causadores de lesão tecidual. A possibilidade da utilização de marcadores celulares e funcionais, tanto de ativação, quanto de regulação, possibilita o melhor entendimento deste balanço imunológico, que se dá frente a infecção. Com esse conhecimento, far-se-á possível o desenho de novas intervenções que possam minimizar o tempo de tratamento.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral:

Avaliar o envolvimento da resposta imune *in situ* na apresentação clínica de pacientes com esporotricose, nas formas linfocutânea e fixa da doença.

### 2.2. Objetivos específico:

1. Identificar e comparar a expressão *in situ* de diferentes populações celulares entre as formas fixa e linfocutânea de apresentação da esporotricose;
2. Identificar e comparar a expressão *in situ* de diferentes marcadores funcionais (citocinas, marcadores de ativação celular e regulação da resposta imune) entre as formas fixa e linfocutânea de apresentação da esporotricose;
3. Descrever e comparar os resultados da expressão e distribuição das populações celulares e marcadores funcionais dos casos de esporotricose e leishmaniose tegumentar americana que apresentem lesões clinicamente semelhantes, verificando a presença de diferenças e semelhanças no processo inflamatório *in situ*;
4. Comparar os dados do estudo *in situ* com dados clínicos dos pacientes, com ênfase em semelhanças e diferenças entre os grupos com forma linfocutânea e fixa da esporotricose.

### 3. ASPECTOS ETICOS

Os estudos foram realizados com 127 pacientes com diagnóstico confirmado de; A) esporotricose: 1- 43 pacientes com a forma linfocutânea (LC); 2- 36 pacientes com a forma fixa (F) e B) leishmaniose tegumentar americana: 1- 30 pacientes com a forma cutânea localizada (LCL) e 2- 18 pacientes com a forma esporotricóide (SCL), atendidos no ambulatório de Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses (LabClin VigiLeish) do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) - Fiocruz. A coleta de amostras foi realizada sempre antes do início do tratamento específico.

O presente estudo está de acordo com a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. É subprojeto do projeto principal previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INI-Fiocruz em 2001 sob o número 0142001 (SISNEP) e classificado como de prazo indeterminado. Em 2018 foi incluído na Plataforma Brasil, mantendo as características prévias e aprovado nos CEP-IOC-Fiocruz e INI-Fiocruz sob o número CAAE: 88890518.6.0000.5248 e 88890518.6.3001.5262, respectivamente. Devido a condições de obtenção das amostras biológicas, foi convencionada a utilização do TCLE do projeto que regula/organiza o atendimento no ambulatório do LaP Clin Vigileish-INI-Fiocruz, coordenado pelo Dr. Armando Schubach. Os fragmentos de lesão são mantidos no biorrepositório sob a guarda da orientadora no Laboratório de Imunoparasitologia-IOC.

Foi adotado como critério de exclusão: os extremos de idade (pacientes abaixo de 18 anos e com mais de 80 anos), a concomitância de tratamentos imunossupressores, alteração/ausência de níveis de compreensão necessários à assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), presença de fatores complicadores que alterassem a apresentação clínica, tamanho das lesões ativas (prioridade para diagnóstico), não possuir fragmento de lesão depositado no repositório sob a responsabilidade da orientadora.

Os dados clínicos foram obtidos do prontuário de atendimento dos pacientes.

#### 4. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho são apresentados em dois artigos, o primeiro onde se realizou um estudo comparativo do perfil inflamatório *in situ* entre as formas linfocutânea e fixa da esporotricose antes do início do tratamento, e o segundo onde se fez um estudo comparativo entre lesões com apresentação clínica semelhante na leishmaniose tegumentar americana e esporotricose, evidenciando semelhanças e diferenças entre elas e discutindo o perfil de resposta imune na pele

##### ARTIGO 1

“Investigação da influência dos fenômenos inflamatórios da resposta imune *in situ* na apresentação clínica da esporotricose humana”.

Artigo sendo submetido para publicação. Este artigo responde os objetivos 1, 2 e 4

##### ARTIGO 2

“Unbalanced inflammatory reaction could increase tissue destruction and worsen skin infectious diseases – a comparative study of leishmaniasis and sporotrichosis”.

Artigo publicado no periódico Scientific Reports, 2018; 8:2898

Este artigo responde ao objetivo 3

**4.1. ARTIGO 1 - Investigação da influência dos fenômenos inflamatórios da resposta imune *in situ* na apresentação clínica da esporotricose humana**

**ARTIGO 1**

**INVESTIGAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE FENÔMENOS  
INFLAMATÓRIOS DA RESPOSTA IMUNE *IN SITU* NA APRESENTAÇÃO  
CLÍNICA DA ESPOROTRICOSE HUMANA**

**A. J. Seba<sup>1</sup>, J. Leite-Silva<sup>1</sup>, M. I. F. Pimentel<sup>2</sup>, M. R. Lyra<sup>2</sup>, M. M. Oliveira<sup>3</sup>, A. O. Schubach<sup>2</sup> & F. Conceição-Silva<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil,

<sup>3</sup> Laboratório de Pesquisa em Dermatozoonoses em Animais Domésticos, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence and requests for materials should be addressed to F.C.-S. (email: fconcei@ioc.fiocruz.br)

## RESUMO

A esporotricose, doença fúngica transmitida principalmente por traumatismo cutâneo com fontes contaminadas por espécies de fungos do gênero *Sporothrix*, tem aumentado exponencialmente em várias regiões do mundo, com crescente infecção em mulheres e crianças, principalmente devido a casos relacionados a transmissão zoonótica por felinos domésticos. As lesões mais características são: a forma linfocutânea (LC), assim chamada por apresentar várias lesões no trajeto de vaso linfático; e a forma fixa (F), caracterizada por presença de lesão única, normalmente auto-limitada. A exemplo de outras infecções do tegumento cutâneo, é possível identificar a participação da resposta imune na evolução das lesões, mas ainda faltam dados que permitam a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos. No presente estudo analisamos a expressão de marcadores celulares (CD4, CD8, CD68, mastócito, neutrófilos, NK) e funcionais (CD25, FoxP3, IL-33, ST2-L, IL-17, NOS2) do processo inflamatório *in situ* nas lesões LC e F em 31 pacientes antes do início do tratamento específico, através da técnica de imunohistoquímica. Os resultados demonstraram que os pacientes com forma F apresentavam perfil de resposta imune mais equilibrado, o que poderia sugerir um melhor controle da inflamação levando a lesão única, sem acometimento linfático. Nestes pacientes foi identificada maior concentração de IL-33 e seu receptor, ST2L, bem como de células CD25<sup>+</sup> e FoxP3<sup>+</sup>. Por outro lado, em lesões LC verificou-se maior concentração de NOS2, células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, macrófagos e neutrófilos, o que parece compor um infiltrado pró inflamatório ligado a ativação e sugerindo uma explicação para as lesões mais extensas, com acometimento linfático. Em conjunto, os dados sugerem que a apresentação clínica mais exacerbada verificada na forma LC está ligada a processo inflamatório mais exuberante com percentuais mais expressivos de células e aparato funcional ligado da atividade pro-inflamatória e citotoxicidade. Isso se torna mais importante, quando verificamos que, em todos os casos em que foi possível a identificação da espécie fúngica, foi observado o crescimento de *S. brasiliensis*. A melhor compreensão da atividade inflamatória *in situ* envolvida na evolução das lesões cutâneas de esporotricose pode trazer informações que permitam o estabelecimento de padrões prognósticos, assim como dar suporte ao desenvolvimento de drogas e imunoterápicos eficazes no controle da infecção.

Palavras chave – esporotricose, forma linfocutânea, forma fixa, imunohistoquímica, processo inflamatório, *in situ*, resposta imune

## INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea, classicamente vinculada à transmissão em meio rural onde a infecção ocorre por traumatismo cutâneo a partir de espinhos, farpas de madeira, gravetos contaminados com o fungo. No entanto, nos últimos anos ocorreu evidente expansão da infecção para áreas urbanas, principalmente ligada à transmissão por arranhadura e mordedura de felinos domésticos, o que levou à modificação do perfil epidemiológico com aumento do número de casos entre mulheres, crianças e outros animais domésticos como o cão (Miranda et al., 2011, Pereira et al., 2011, Rees, Swartzberg, 2011, Borges et al., 2013, Miranda et al., 2013). É causada por fungos do complexo *Sporothrix* spp definidos por estudos moleculares como sendo composto por diversas espécies, dentre elas *Sporothrix schenckii* sensu stricto, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. luriei* (Oliveira et al., 2011, Fernandes et al., 2013, Liu et al., 2013, Oliveira et al., 2013, Oliveira et al., 2014, Almeida-Paes et al., 2015). A micose tem ampla distribuição geográfica, apresentando-se principalmente como surtos limitados (Guzman-Beltran et al., 2012). No entanto, nos últimos anos vem ocorrendo aumento do número de casos em todo o planeta, ligado a mudanças do perfil epidemiológico (Bhutia et al., 2011, Dias et al., 2011, Song et al., 2011, Sivagnanam et al., 2012, Verma et al., 2012, Mata-Essayag et al., 2013, de Oliveira et al., 2014, Lupi et al., 2005, Morris-Jones, 2002, Pappas et al., 2000, Lyon et al., 2003, Bonifaz et al., 2010; Chakrabarti et al., 2015). Esta micose tem sido diagnosticada em várias regiões do Brasil com número crescente de casos, principalmente no Rio de Janeiro (Barros et al., 2011, Almeida-Paes et al., 2014) onde *S. brasiliensis* parece ser predominante (Rodrigues et al., 2013) como demonstrado por Marimon et al. (2007) que identificaram *S. brasiliensis* apenas em amostras provenientes do Rio de Janeiro. Esta espécie, quando comparada a outras, pareceu ter maior potencial de destruição tecidual, maior gravidade clínica (Freitas et al., 2015, Lopes-Bezerra et al., 2018; Fernandes et al., 2013, Rodrigues et al., 2014b).

No ser humano a infecção pode se apresentar sob formas clínicas variadas, sendo as mais comuns a forma linfocutânea (LC - 70-80% dos casos) e a forma fixa (F - 20-25%) (Barros et al., 2004; Orofino-Costa et al., 2017). Outras apresentações clínicas como forma disseminada e extracutânea (visceral, mucosa e osteoarticular) são consideradas pouco frequentes (Aronowitz et al., 2017, Bonifaz et al., 2017). Mudanças no perfil de virulência do fungo e da resposta imune do hospedeiro têm sido implicados no desenvolvimento de diferentes formas clínicas (Kong et al., 2006, Alegranci et al.,

2013, Morgado et al., 2011, Morgado et al., 2016), mas até o momento não foi possível detectar fatores do hospedeiro que comprovadamente influenciassem a evolução da esporotricose nas suas variadas apresentações (Uenotsuchi et al., 2006, Alegranci et al., 2013, Morgado et al., 2011, Morgado et al., 2016). Neste sentido, apesar da literatura ainda restrita, estudos em modelo experimental e em lesões humanas e felinas têm apontado para a importância da resposta imune na evolução da esporotricose (Kong et al., 2006, Gonçalves et al., 2015, Alba-Fierro et al., 2016, Morgado et al., 2008; Morgado et al., 2011, Miranda et al., 2011; Miranda et al., 2013). Verificou-se que tanto a resposta imune inata quanto a resposta imune específica estão implicadas na regulação da carga fúngica, na lesão tecidual e conseqüentemente no surgimento de formas limitadas ou progressivas da esporotricose. Estudos realizados em modelo murino de infecção experimental sugerem a importância da imunidade celular na resistência do hospedeiro, com a participação de linfócitos T CD4, inclusive na interação com macrófagos. (Tachibana et al., 1999, Carlos et al., 2009, Alegranci et al., 2013). Outros estudos evidenciaram a importância de anticorpos da classe IgA e IgG, especialmente IgG1 e IgG3 (Nascimento et al., 2005, Almeida-Paes et al., 2013), assim como de receptores toll-like tipo 2 (TLR-2) e citocinas como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas tipo IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 e IL-17, assim como interferon gama (IFN- $\gamma$ ), fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), além de óxido nítrico (NO) (Negrini et al., 2013). Estas últimas têm sido implicadas na derivação de resposta Th1 e/ou Th17 na conseqüente regulação da diferenciação de CD4 na resposta fungo-específica (Maia et al., 2016). Neste contexto, foi descrita uma possível relação entre baixos níveis percentuais de células do perfil Th1 e Th17 com manifestações clínicas mais relevantes e maior tempo de duração da doença (Chen et al., 2015). Demonstrou-se em camundongos uma reação inflamatória mais intensa pelo *S. brasiliensis*, com manutenção do padrão Th17, e mais células T regulatórias e suas citocinas de regulação (IL-10, TNF-alfa), em comparação com *Sporothrix schenckii* sensu stricto (Batista-Duarte et al., 2018).

Em pacientes foram realizados poucos estudos visando a detecção da resposta imune. Em duas primeiras publicações (Koga et al., 2001, Koga et al., 2002) os autores estudaram o infiltrado inflamatório de 5 casos e verificaram 0,2 a 0,8% de células dendríticas de permeio a um infiltrado misto de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, além de células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>. A lesão tecidual de esporotricose foi estudada através da histopatologia (Quintella et al., 2011), e a composição/organização do processo inflamatório através da imunohistoquímica (Morgado et al., 2011). Neste último estudo, comparou-se a

inflamação *in situ* de casos de forma fixa (F) e linfocutanea (LC) da esporotricose e verificou-se que a maior extensão e potencial de gravidade das lesões LC poderiam ser explicadas pela maior intensidade de reação inflamatória *in situ*, o que levaria à destruição tecidual. Por outro lado, a resposta imune nas lesões F foi mais balanceada, levando ao controle da infecção sem destruição do tecido adjacente e propagação do fungo (Morgado et al., 2011). Observou-se que, ao contrário das lesões da forma F, as lesões LC apresentaram reação inflamatória mais intensa e difusa associadas a intensa necrose e formação de pus caracterizando uma resposta imune descontrolada. A maior gravidade destas lesões pôde ser associada ao maior percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, linfócitos B CD22<sup>+</sup>, neutrófilos e expressão de NOS2, que sugere maior atividade inflamatória. Posteriormente, demonstrou-se que os níveis sistêmicos de INF- $\gamma$  eram maiores nos pacientes com esporotricose que nos indivíduos controles saudáveis, mas não havia diferença significativa nos níveis sistêmicos e *in situ* de INF- $\gamma$  entre as duas formas clínicas. Já em relação a IL-10, os níveis *in situ* foram maiores nas lesões LC que F, mas não houve diferença entre os níveis sistêmicos, quando comparados com indivíduos saudáveis (Morgado et al., 2016).

Em paralelo a estas informações, nos últimos anos alguns estudos *in vitro* e experimentais têm chamado a atenção para os mecanismos reguladores/moduladores da resposta imune inata como sendo importantes para a continuidade ou controle da infecção. Verificou-se que células dendríticas (DC) podem regular o balanço entre resposta anti e pro inflamatória a fungos, na dependência do reconhecimento de antígenos. Esses dados sugerem que diferentes estímulos podem induzir diferentes resposta imunes (Verdan et al., 2012). O papel dos mastócitos em infecção pelo *Sporothrix schenckii* foi avaliado em ratos, a partir do contato de células peritoniais desses animais com os conídeos do fungo, demonstrando que os mastócitos facilitam a disseminação dos fungos e aumentam a gravidade clínica da infecção (Romo-Lozano et al., 2012).

O tegumento cutâneo é descrito como fundamental no desenvolvimento e seleção da resposta imune a vários agentes causais (Conceição-Silva et al. 1990, Pirmez et al. 1990, Conceição-Silva et al. 1994, Ahmed et al. 1994, Conceição-Silva et al. 1998, Khanolkar-Young et al. 1998, Orteu et al. 1998, Bertho et al. 2000). Apesar dos dados até o momento coletados, e de algumas diferenças importantes já terem sido observadas entre o tipo de patógeno causador de uma doença e a resposta imune da pele, bem como as repercussões clínicas e terapêuticas em cada indivíduo, o mecanismo de controle da

infecção ainda não é totalmente esclarecido. No caso específico da esporotricose, as diferenças entre as formas clínicas de apresentação LC e F parecem ter múltiplos fatores dentro da resposta imune da pele e dentro do perfil de cada paciente, que merecem ser aprofundados. As características imunológicas demonstradas através de marcadores celulares e funcionais possibilitam o aprimoramento desses conhecimentos. Assim, no presente estudo avaliamos marcadores celulares (linfócitos TCD4 e TCD8, macrófagos, mastócitos, neutrófilos e células NK) e funcionais (IL-17, IL-33, ST2-L, FoxP3, CD25, NOS2) em pacientes com esporotricose nas formas LC e F.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS:**

### **CASUÍSTICA**

O estudo foi realizado com 31 pacientes de esporotricose, atendidos no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, divididos em dois grupos: 1- forma linfocutânea (LC, n=19); 2- forma fixa (F, n=12). Todos os pacientes incluídos assinaram termo de consentimento aprovado nos projetos CAAE 88558418.0.0000.5262 (diagnostic and clinical care), CAAE 88890518.6.0000.5248 (IOC- Fiocruz) and CAAE 88890518.6.3001.5262 (INI – Fiocruz). Foram adotados como critérios de exclusão: os extremos de idade (pacientes <18 e > 80 anos), a concomitância de tratamentos imunossupressores, não assinatura do termo de consentimento. Os dados clínicos foram obtidos do prontuário de atendimento dos pacientes no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses, INI, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

### **DADOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS**

Todos os casos tiveram seu diagnóstico confirmado por isolamento do fungo a partir de material de lesão. Nos casos possíveis a espécie do fungo foi identificada como descrito abaixo. Foram coletados dados de sexo, idade, forma clínica, localização das lesões, sintomatologia, fonte provável de contaminação. Estes dados foram comparados entre si e com os resultados de caracterização do processo inflamatório por imunohistoquímica.

### **IMUNOHISTOQUÍMICA**

A análise dos tecidos das lesões foi realizada por imunohistoquímica como previamente descrito (Morgado et al, 2011). Resumidamente foram usados anticorpos monoclonais primários para caracterização fenotípica anti- CD4 (clone 4B12), -CD8 (clone C8/144B), -mastócitos (clone AA1), -CD56 (NK, clone 123C3)), - elastase neutrofílica (clone NP57) e -macrófagos (clone KP1) (todos de DakoCytomation, Dinamarca), e para caracterização funcional anti-NOS2 (Abcam), -CD25 (clone BC96), anti-Foxp3 (clone PCH101), IL-17 (eBio64DEC17) (todos de eBioscience), anti-IL33 (clone 390412 – Pharmingen, USA), -ST2L (clone B4E6, Mdbiosciences, USA). Após incubação com anticorpo primário biotiniado, streptoavidina peroxidase e cromógenos AEC (Vector Lab, USA), os tecidos foram contra-corados com Hematoxilina de Mayer (Dako) e montados com lamínula. Foi utilizado microscópio óptico (NIKON E-200, Japão), e o programa Soft Imaging System (analySIS – Motic Plus) foi usado para captura e armazenamento de imagens. A leitura das lâminas foi feita por contagem percentual das células marcadas, utilizando-se como padrão a contagem de 500 células. Para análise da distribuição de NOS2 foi realizado o cálculo do infiltrado inflamatório por mm<sup>2</sup> de tecido. The staining intensity was scored in ten microscopic fields (200x magnification) as rare (at least 1 positive area / field), discrete (2–3 positive areas / field), moderate (4–5 positive areas / field) and intense (>5 positive areas / field) as previously described (Morgado et al, 2016).

#### CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Sporothrix* spp OBTIDOS DURANTE O PROCEDIMENTO DIAGNÓSTICO DOS PACIENTES.

As amostras obtidas das lesões dos pacientes foram inicialmente caracterizadas fenotipicamente como pertencentes ao gênero *Sporothrix* spp. O DNA genômico purificado destas amostras foi então avaliado por RT-PCR como previamente descrito (Oliveira et al., 2011). As relações filogenéticas das amostras foram analisadas como previamente descrito (Oliveira et al., 2010).

#### STATISCAL ANALYSIS

Os dados foram armazenados e analisados utilizando-se o software R 3.3.2 (*R Foundation for Statistical Computing, Brazil*). A análise dos dados clínicos foi realizada pela descrição de frequências das variáveis qualitativas (sexo, idade, caracterização do fungo, forma clínica, localização das lesões, fonte de contágio e sintomas), e medidas-resumo (mediana, mínimo e máximo) da idade e dos marcadores celulares e funcionais.

A análise das amostras não relacionadas foi realizada através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney para comparação dos dados referentes aos resultados dos marcadores celulares e funcionais evidenciados pela técnica de imunohistoquímica, entre os grupos de forma LC e F. Quando aplicável, foram considerados como significantes p valores <0,05.

### 3. RESULTADOS:

#### POPULAÇÃO DE ESTUDO:

Os resultados estão apresentados no quadro 1. Em ambos os grupos houve prevalência do sexo feminino. A média de idade em LC foi de 37 anos, e em F, 35 anos. A localização das lesões foi mais prevalente em membros superiores (MMSS) em ambos os grupos. Nove pacientes LC e 8 F apresentaram lesões em MMSS. Foram ainda identificadas lesões em MMII (3 LC e 2 F), em tronco (4LC e 2F) na face (3 LC). Não importando a forma clínica da esporotricose, a maioria dos pacientes não relatou espontaneamente a presença de sintomas. Quando presente, os mais comuns eram prurido e dor. Quando relatada, a fonte de contágio descrita foi contato com gato doente. No entanto, em 20 casos não havia relato de provável fonte de contágio. (Tabela 1) Não houve diferença significativa entre as variáveis clínicas e demográficas entre os grupos estudados.

Tabela 1: Distribuição dos dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes com esporotricose, de acordo com a apresentação clínica. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro – (TABELAS ESTÃO EM OUTRO ARQUIVO)

#### IMUNOHISTOQUÍMICA

Os resultados estão demonstrados nas tabelas 1 e 2. A infiltração celular era constituída predominantemente por linfócitos, principalmente CD4+, e macrófagos (tabela 1). Em relação aos marcadores celulares, no grupo de LC, houve maior número percentual de linfócitos T CD4+ (p=0,00002) e linfócitos T CD8+ (p= 0,01), assim como maior número de macrófagos (p=0,0006) e neutrófilos (p=0,0003), em relação ao grupo de forma F (figura 1). Os valores de mediana (mínimo e máximo) estão demonstrados na tabela 1. Não houve diferença estatística significativa entre a porcentagem de mastócitos, e células NK (CD56+), entre os grupos de LC e F, quando comparados. Também foi possível identificar formação de NET nos dois grupos.

Em relação aos marcadores funcionais, houve prevalência de Fox-P3 (p=0,0009),

ST2-L ( $p=0,002$ ), CD-25 ( $p=0,001$ ) e IL-33 ( $p=0,01$ ) na forma F, quando comparados com a forma LC. No entanto, IL-17 não apresentou diferença entre os grupos, provavelmente devido a variação de percentual de células positivas nos pacientes avaliados.

Assim como para os macrófagos, as células NOS2+ eram mais frequentes na forma LC ( $p=0,04$ ). No entanto, é digno de nota que o percentual de macrófagos não era acompanhado de intensidade semelhante de positividade para NOS2. (Tabela 4)

Tabela 2. Marcadores celulares na SP formas LC e F, com porcentagem máxima e mínima, e as respectivas medianas da concentração (TABELAS ESTÃO EM OUTRO ARQUIVO)

SP: *Sporotrichosis* – esporotricose; LC: Linfocutânea; F: Fixa

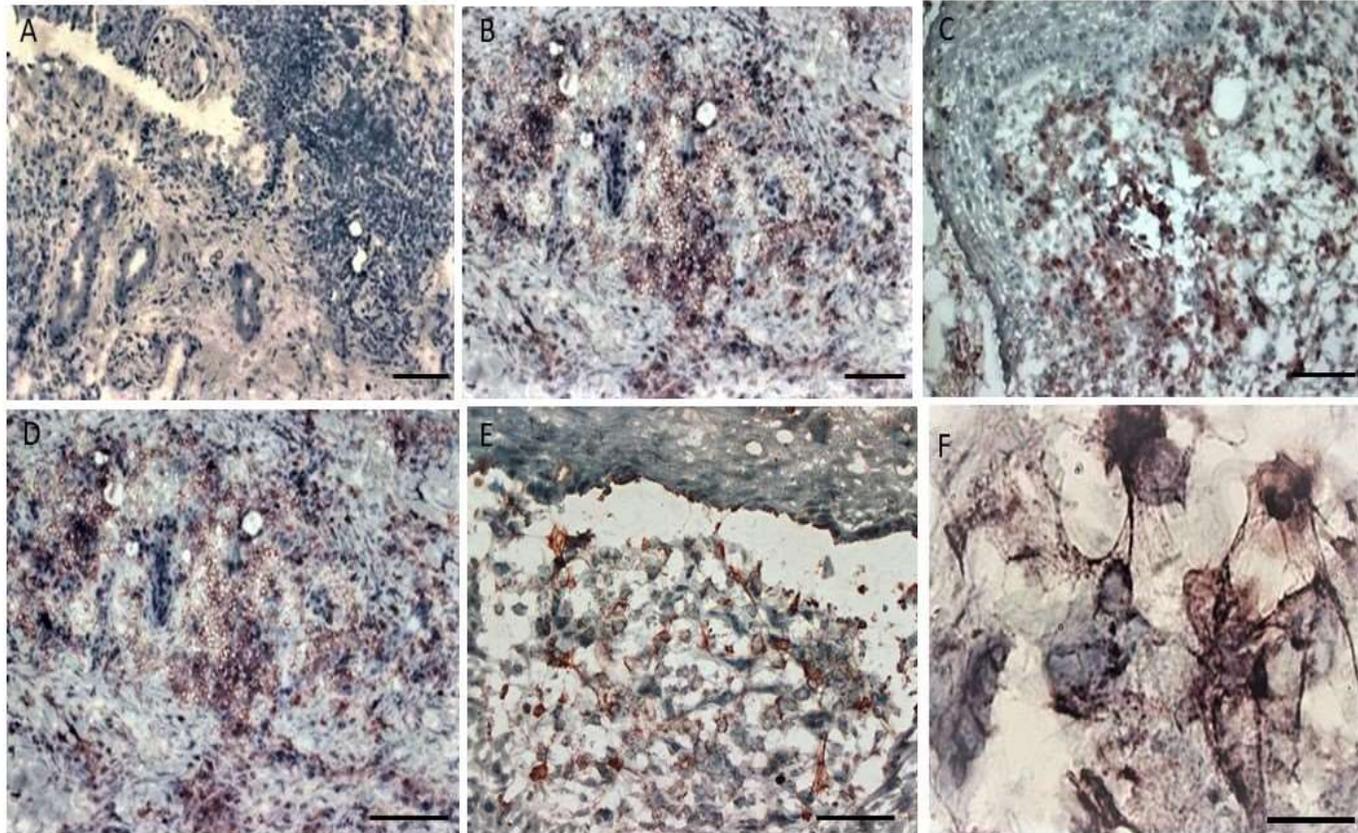
Tabela 3. Marcadores funcionais na SP formas LC e F, com porcentagem máxima e mínima, e as respectivas medianas da concentração (ESSA TABELA EU NÃO CONSEGUI TIRAR, MAS TEM DE SER REVISADO O FORMATO)

Marcadores funcionais	LC%		pvalor
	Mediana (mín-máx)	F% Mediana (mín-máx)	
<b>IL-17</b>	13,11 (4,23 – 24,89)	12,55 (8,00 – 38,90)	>0,7186
<b>IL- 33</b>	10,34 (4,09 – 15,16)	14,11 (8,23 – 23,12)	<b>0,01</b>
<b>Anti foxP3</b>	8,67 (5,00 – 13,74)	14,78 (7,00 - 23,89)	<b>0,0009</b>
<b>CD25</b>	10,07 (4,33 – 13,13)	14,68 (7,40 – 25,00)	<b>0,001</b>
<b>ST2L</b>	9,43 (4 – 18,78)	15,67 (8,33 – 24,22)	<b>0,002</b>

SP:*Sporotrichosis* – esporotricose; LC: Linfocutânea; F: Fixa

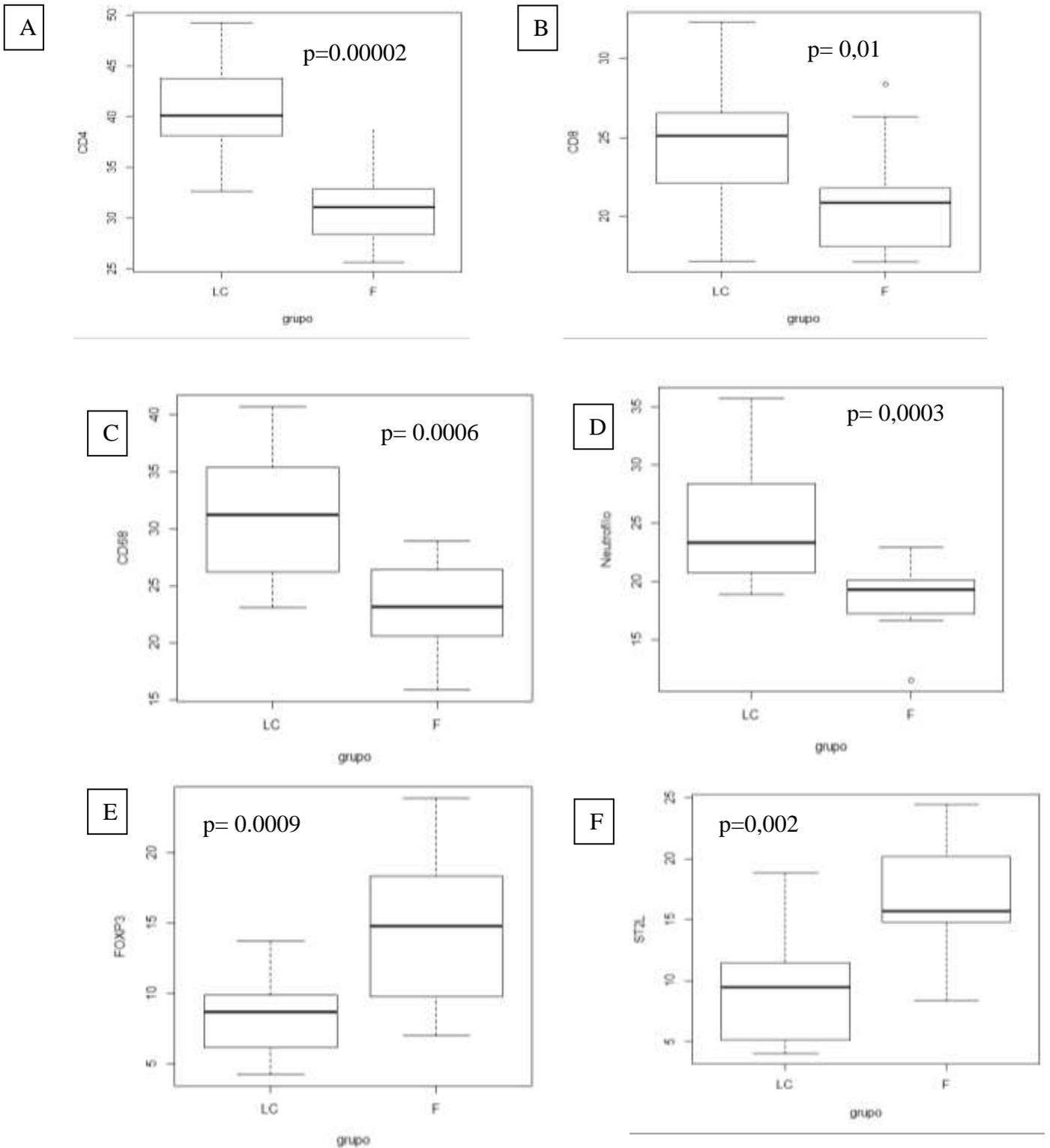
Tabela 4: Intensidade expressão NOS2 forma linfocutânea (LC) e fixa (F) da esporotricose.

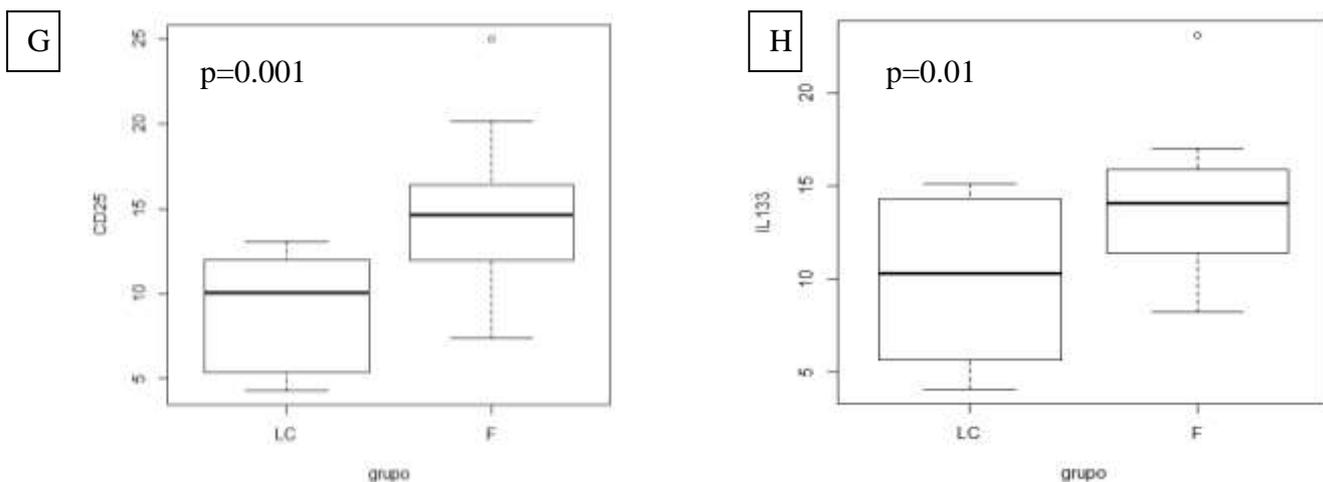
Forma clínica	Intensidade expressão de NOS2			
	Raro	Discreto	Moderado	Intenso
LC	2 (10,5%)	4 (21%)	9 (47,3%)	2 (10,5%)
F	4 (33,3%)	5 (41,7%)	2 (16,7%)	0



**Figura 1-** Avaliação in situ de lesões de pacientes com esporotricose na forma linfocutânea. Imunohistoquímica com revelação por peroxidase + AEC. (A) Controle negativo (sem adição de anticorpo primário) (B) Linfócitos TCD4+ (C) Linfócitos TD8+ (D) Macrófagos CD68 (E) Neutrófilos e (F) Formação de Nets. (A), (B), (C) - aumento de 100X a barra de escala; (D) e (E) – aumento de 200X a barra de escala; (F) – aumento de 1000X a barra de escala

Figura2. Porcentagem de linfócitos T CD4+ (A); linfócitos T CD8+ (B); macrófagos (CD68+) (C); células positivas para elastase neutrofílica (neutrófilos) (D); FoxP3+ (E); ST2L (F); CD25+ (G); IL-33 (H).





### IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Sprothrix* spp

Em todos os 14 casos em que foi possível a identificação da espécie do fungo causador da infecção, o isolado foi caracterizado como *S. brasiliensis*. Destes, sete pacientes apresentaram a forma linfocutânea, e sete apresentaram a forma fixa. Nos demais casos não foi possível a identificação por falta de manutenção dos espécimes isolados.

### DISCUSSÃO

Neste estudo analisamos a expressão de marcadores celulares e funcionais do processo inflamatório *in situ* nas lesões da forma linfocutânea (LC) e fixa (F) da esporotricose em 31 pacientes antes do início do tratamento específico, através da técnica de imunohistoquímica. Os resultados demonstraram um perfil de resposta imune mais equilibrado nos casos F, o que poderia sugerir um melhor controle da inflamação levando a evolução de quadro benigno com lesão única e auto-limitada. Nestes pacientes foi identificada maior concentração de IL-33 e seu receptor, ST2L, bem como de células T CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>, cujo perfil está ligado a células com função regulatória da resposta imune. Por outro lado, neste estudo, a avaliação da resposta imune *in situ* em lesões LC revelou maior concentração de NOS2, células T CD4<sup>+</sup>, células T CD8<sup>+</sup>, macrófagos e neutrófilos, o que parece compor um infiltrado pró inflamatório ligado a ativação que pode levar a desorganização tecidual, sugerindo uma explicação para as lesões mais extensas, com acometimento linfático, com apresentação clínica mais exuberante, quando comparada à

forma F. Esses resultados estão em acordo com aqueles previamente publicados demonstrando que, em relação às lesões F, em lesões LC havia predominância de perfil de atividade inflamatória (Morgado et al, 2011). Algumas observações clínicas sugerem que o tempo de evolução poderia exercer papel determinante no acúmulo de elementos que compõem o processo inflamatório e com isso modificar o perfil de resposta imune (VigiLeish- comunicação pessoal). No entanto, os pacientes de nossa casuística apresentavam tempo de evolução semelhante. Isto se torna ainda mais relevante no sentido de que o levantamento dos dados clínicos não demonstrou diferença significativa em outros parâmetros clínicos, com exceção do número de lesões, quando os pacientes de forma fixa e linfocutânea foram comparados, o que está de acordo com outros registros de estudos em pacientes do Rio de Janeiro (Schubach et al., 2008; Barros et al., 2004; Lopes-Bezerra et al., 2006; Barros et al., 2008; Barros et al., 2011; Barros et al., 2015; Chakrabarti et al., 2015; Gremião et al., 2017).

Os macrófagos e neutrófilos desempenham papel chave durante a resposta imunológica a elementos fúngicos, sendo responsáveis pela fagocitose, que é uma importante ferramenta de eliminação de agentes patogênicos (Liu, 2002; Nadal, Garcia-Pedrajas e Ouro 2008; Karkowska-Kulet, Rapala-Kozik e Kozik 2009). Além de fungos, outras doenças infecciosas que atingem o tegumento cutâneo, como a hanseníase e leishmaniose, podem apresentar mecanismos semelhantes, apesar de serem causadas por agentes infecciosos distintos. Na hanseníase, doença causada pelo *Mycobacterium leprae*, há uma fraca resposta imune celular, com proliferação descontrolada de bacilos, numerosas lesões e extensa infiltração de pele e nervos nas formas lepromatosas multibacilares (Scollard et al., 2006) e, recentemente foi sugerido que a presença de NETs parece estar envolvida em lesões mais graves, e de pior prognóstico clínico na hanseníase multibacilar (Lima et al., 2019). No entanto, nossos resultados evidenciaram uma maior concentração de neutrófilos mas não de formação de NET nos casos de esporotricose na forma LC. A formação de NET pode estar ligada a diversos fatores, inclusive ao tempo de infecção e concentração do agente infeccioso no local.

É também interessante verificar que a esporotricose é uma micose de acometimento predominantemente cutâneo, e que a organização do processo inflamatório localizado leva em conta a capacidade de resposta do sistema imune da pele. Neste sentido seria interessante comparar diferentes lesões do tegumento cutâneo em relação a organização da inflamação predominante para identificar o papel do padrão de resposta imune da pele na organização da inflamação localizada. Neste contexto, recentemente

relatamos a comparação do infiltrado inflamatório *in situ* de lesões clinicamente semelhantes de esporotricose e leishmaniose tegumentar americana (Morgado et al, 2018). Neste estudo foi possível identificar algumas diferenças entre os dois tipos de infecção, mas principalmente foi possível verificar semelhanças de organização do processo inflamatório em lesões clinicamente semelhantes, mesmo sendo produzidas por agentes etiológicos distintos. Este dado sugere que, além da resposta imune individual de cada paciente e da influência do agente etiológico envolvido, particularidades da organização e capacidade de resposta do sistema imune da pele podem gerar padrões inflamatórios distintos. Se por um lado isto pode dificultar o diagnóstico, por outro lado pode indicar caminhos comuns para no futuro podermos compreender melhor a evolução destas infecções para sermos capazes de intervir terapêuticamente no seu controle.

Além da resposta imune individual, mecanismos de adaptação do fungo podem influenciar o dano tecidual como nas formas com manifestações clínicas mais exuberantes na esporotricose. É sabido que os fungos do gênero *Sporothrix* apresentam dimorfismo com diferentes formas fúngicas no meio ambiente (micélio filamentosos septado) e nas lesões (estruturas leveduriformes). Essa particularidade pode atuar em mecanismos de evasão da resposta imune facilitando a sobrevivência do fungo (Fernandes et al., 1999) como já foi demonstrado para outros fungos como *Blastomyces dermatitidis* (teleomorfo *Ajellomyces dermatitidis*), *Histoplasma capsulatum* (teleomorfo *Ajellomyces capsulatum*), espécie *Paracoccidioides* (Boyce et al, 2015). Diversos mecanismos genéticos foram apresentados para explicar os meios pelos quais é possível que o fungo realize este movimento, e os dados sugerem que esses mecanismos fúngicos possam aumentar a patogenicidade, e fazer com que os neutrófilos e macrófagos tenham maior dificuldade em eliminar o patógeno por meio de seus elementos de destruição, como espécies reativas de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*) e NO (óxido nítrico) (Gantner et al. 2003 ; Bellocchio et al. 2004 ; Roeder et al. 2004; Boyce et al., 2015). Estes mecanismos podem envolver reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs - *pathogen-associated molecular pattern*) e seus receptores (PRRs - *pattern recognition receptors*) nas membranas de macrófagos, induzindo uma variedade de respostas celulares (Gantner et al. 2003 ; Bellocchio et al. 2004 ; Roeder et al. 2004; Lopes-Bezerra et al., 2011). O reconhecimento destes padrões age durante a iniciação da resposta imune e conseqüentemente na ativação de macrófagos, neutrófilos e células NK. A presença de células NK se mostrou semelhante, mas identificamos um maior número de neutrófilos e macrófagos, assim com maior

intensidade de expressão da enzima NOS2 (óxido nítrico sintetase), ligada a atividade parasiticida de macrófagos nas lesões LC. Esta organização da inflamação poderia estar ligada a maior destruição tecidual com conseqüente exacerbação das lesões. Sabe-se que existem outros fatores de virulência que podem aumentar a patogenicidade por facilitar a maior penetração/implantação do fungo na pele. Entre eles podemos citar fatores como termotolerância; presença de melanina; capacidade de adesão às células endoteliais, epiteliais, e à matriz extracelular. Com isso, as células fagocíticas não conseguem eliminar o patógeno, e o processo infeccioso mantido pode explicar o dano tecidual conseqüente em lesões mais exuberantes da doença, como na forma LC ou disseminada (Casadevall et al., 2006; Jacobson, 2000; Romero-Martinez et al., 2000; Lima et al., 2004; Ruiz-Baca et al., 2009; Barros et al., 2011). Na esporotricose, alguns relatos têm indicado uma possível relação entre a origem clínica do isolado do fungo e seu grau de virulência (Brito et al, 2007; Arrillaga-Moncrieff et al, 2009; Almeida-Paes et al, 2014; Almeida-Paes et al, 2015; Almeida Paes et al, 2015; Della Terra et al, 2017; Ikeda et al, 2018; Oliveira et al, 2019). No entanto, esses trabalhos têm sido realizados *in vitro* ou em modelos animais e existe uma carência de confirmação de relatos com casos humanos. Neste sentido, Gutierrez-Galhardo et al (2008) não certificou correlação direta entre a forma clínica dos pacientes e as características do isolado relacionado. Assim, não pode ser negligenciada a ação da resposta imune do hospedeiro. Neste contexto, vários trabalhos têm demonstrado a correlação entre gravidade da esporotricose e quadros de imunossupressão (Kajiwara et al, 2004; Bunce et al, 2012; Bonifaz & Tirado-sanchez, 2017; Queiroz-Telles et al, 2019). Também já foi demonstrado que felinos domésticos infectados com *S. brasiliensis* semelhantes aos identificados no ser humano tendem a desenvolver lesões mais graves e ricas em elementos fúngicos, o que não é normalmente observado na espécie humana, mesmo em casos em que fungo com as mesmas características foi isolado do paciente e de seu gato (Marion et al., 2007; Almeida-Paes et al., 2014).

Além do maior percentual de CD4<sup>+</sup>, neutrófilos e células NOS2<sup>+</sup> identificado em nossos resultado e em estudos anteriores (Morgado et al, 2011), já foi descrito na literatura que, apesar de não haver diferença na presença de IFN- $\gamma$  e IL-10 no sangue periférico dos pacientes LC e F, a presença de IL-10 era predominante nos casos de lesões LC (Morgado et al, 2016). Isso mais uma vez aponta para um maior controle e modulação da resposta imune principalmente no sítio das lesões. Neste contexto, o presente estudo identificou a expressão de outros marcadores funcionais ligados a atividade inflamatória ou a seu

controle. Nós verificamos a expressão de marcadores funcionais ligados a maior atividade inflamatória (IL-17 e NOS2) e outros mais relacionados a atividade reguladora da resposta imune como IL-33 e seu ligante ST2L, além de FoxP3 e CD25, que em associação ou isoladamente atuam na modulação da resposta imune. Quando os dois grupos de pacientes foram comparados, ficou nítido que os casos de LC apresentavam maiores concentrações de marcadores celulares e funcionais de atividade inflamatória (NOS2, macrófagos, neutrófilos, TCD8<sup>+</sup> e TCD4<sup>+</sup>) e os pacientes de forma F apresentavam maior expressão de marcadores ligados a atividade de modulação da intensidade de resposta imune como CD25, FoxP3, IL-33 e ST2L. Curiosamente, não detectamos diferenças em relação ao perfil de expressão de TH17, citocina implicada na literatura como ligada a casos de evolução clínica mais exacerbada (Batista Duharte et al., 2018). Também não foi possível observar diferenças na concentração de células NK e mastócitos entre os grupos. Romo-Lozano et al (2012), realizaram um estudo avaliando o papel dos mastócitos em infecção pelo *Sporothrix schenckii* em ratos, a partir do contato de células peritoneais desses animais com os conídios do fungo. Demonstraram que os mastócitos facilitam a disseminação dos fungos e aumentam a gravidade clínica da infecção. Já em relação às células NK, não é bem definido o papel das células NK nas infecções fúngicas, embora esteja bem estabelecido seu papel essencial nas infecções causadas por vírus, pois recente trabalho demonstrou a importante ação das células NK para defesa do organismo frente a infecções virais. Além de características individuais, o tempo de lesão poderia estar influenciando a semelhança da distribuição desses dois elementos celulares em nossa casuística, já que em pacientes, é pouco comum identificarmos os primeiros momentos da infecção, já que a grande maioria dos pacientes procura o médico depois do estabelecimento clínico da infecção. Por outro lado, diferenças intrínsecas de capacidade de resposta imune e tempo de evolução da infecção poderiam influenciar estes fatores. Mais estudos poderão esclarecer melhor este complexo repertório (Romo-Lozano et al., 2012, Carlos et al., 2019).

É amplamente relatado que o óxido nítrico (NO) produzido por macrófagos ativados é um mecanismo de defesa primário contra muitos patógenos fúngicos como: *Penicillium marneffei*, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* e sua ação fungicida e fungistática são incontestáveis (Hibbs et al., 1987; Kajiwara et al., 2004). Contudo, também há maior dano tecidual associado a maior concentração de NO. Neste sentido, já foi demonstrado que componentes da parede de *S. schenckii* inibem a fagocitose *in vitro* e induzem liberação acentuada de NO e TNF- $\alpha$  por

macrófagos em culturas (Carlos et al., 2003). Fernandes et al., (2008) descreveram em modelo murino um mecanismo de inibição da resposta imune adaptativa, mediada por linfócitos T, uma vez que níveis elevados de TNF- $\alpha$  e NO quando liberados em resposta à presença de leveduras nos tecidos, conduziria à síntese de mediadores de regulação da resposta imune, como IL-10, Fas-L e CTLA-4. Em fases iniciais da infecção já seria possível identificar o papel imunossupressor do NO, que se intensifica ao longo da infecção. Apesar da ação de NO na regulação de resposta imune ser ainda objeto de investigação, foi demonstrado significativa queda dos níveis de TNF- $\alpha$  entre 4 e 6 semanas após o início da esporotricose, o que permitiu que o fungo se reproduzisse e infectasse ainda mais as células hospedeiras. Depois de 2 meses, houve novo aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1, o que promove ativação do sistema imune, com eliminação do fungo (Fernandes et al., 2008).

Os fungos do gênero *Sporothrix* formam um complexo de espécies, que tem sido amplamente caracterizada na atualidade (Oliveira et al., 2011, Fernandes et al., 2013). Dentre elas, a espécie *S. brasiliensis* é demonstrada como predominante na infecção identificada na região de proveniência dos pacientes estudados e, nossos resultados de identificação de espécies demonstraram a presença de *S. brasiliensis* nos casos em que isto foi possível. A predominância de *S. brasiliensis* tem sido evidenciada ao longo dos anos em casos no Rio de Janeiro, Brasil (Rodrigues et al., 2013, Marimon et al. 2007). Estudos de virulência e patogenicidade têm sugerido que *S. brasiliensis* possui maior potencial de destruição tecidual, maior gravidade clínica e crescente resistência a medicações (Freitas et al., 2015, Lopes-Bezerra et al., 2018; Fernandes et al., 2013, Rodrigues et al., 2014b). Cabe ressaltar que a literatura tem demonstrado que diferentes espécies de *Sporothrix* podem induzir diferentes intensidades de organização do processo inflamatório local na esporotricose. Neste contexto, recente trabalho foi realizado para analisar comparativamente a resposta de linfócitos T CD4+ induzida por *S. schenckii* sensu stricto e *S. brasiliensis* em modelo murino de esporotricose. Numa fase inicial, houve uma resposta bem mais ampla ao *S. schenckii* que ao *S. brasiliensis*, com presença de mediadores pró-inflamatórios como IL-6 e TNF- $\alpha$ . Em fase mais tardia, foi observada redução nas respostas Th1 e Th1-Th17 na resposta à infecção pelo *S. schenckii*, e uma redução semelhante, no perfil Th1 observado na resposta ao *S. brasiliensis*. Possivelmente este fato ocorre pelo efeito modulador das células Tregs nesta fase da infecção. Demonstrou-se que o padrão na infecção por *S. brasiliensis* sugere uma resposta imune celular mediada por Th17, numa tentativa de controlar a infecção fúngica enquanto reduz

a resposta inflamatória excessiva e deletéria por meio das células T regulatórias (Batista-Duarte, 2018). Nossos resultados não identificaram diferenças nas concentrações de células TH17<sup>+</sup> entre os dois grupos de pacientes, mas o perfil inflamatório dos pacientes LC demonstrou uma expressão de marcadores inflamatórios mais exuberante. Mais uma vez esse dado pode estar ligado a períodos de evolução da infecção que não apresentavam ainda o perfil que permitirá o controle da infecção. É preciso ressaltar no entanto, que a espécie amplamente predominante no Rio de Janeiro é o *S. brasiliensis* (Marimon et al, 2007; Reis et al, 2009, entre outros) e que, nos 14 casos do presente trabalho em que foi possível a caracterização do fungo, havia um equilíbrio de casos entre os dois grupos (7 casos em cada um), o que mais uma vez sugere que a resposta imune do hospedeiro exerça ação fundamental na organização da inflamação local nas lesões de esporotricose.

O equilíbrio adequado entre as vias de ativação e regulação do sistema imune permite respostas pró-inflamatórias mais eficazes, capazes de resolver as infecções preservando os tecidos de possíveis danos, por meio de resposta anti-inflamatória/moduladora adequada, ou seja, que fosse suficiente para controlar a resposta imune evitando dano tecidual, sem contudo produzir imunossupressão. Em nosso estudo, encontramos maior concentração de células TCD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> nas lesões de forma fixa. Estas células são células T com perfil de regulação (Tregs) e sua atuação na esporotricose ainda não foi verificada, não havendo dados na literatura. No entanto, em relação a outros fungos existem dados divergentes, onde alguns trabalhos demonstram benefício para resolução da doença com maior presença de células T reguladoras, enquanto outros demonstraram o contrário. Recente estudo avaliou mediadores imunológicos em 30 crianças com coccidioidomicose (Davini et al. 2018), demonstrando que os pacientes com perfil mais marcado por células T reguladoras tiveram pior desfecho, evoluindo para persistência da infecção. Isso sugere que células Tregs possam suprimir respostas imunológicas eficazes durante a infecção aguda por *Coccidioides*. Como células T regs (modulação) e Th17 (ativação) parecem se diferenciar por vias recíprocas, se há maior formação de células T regs por estímulo de IL-6 e TGF-beta, haverá menos células Th17 pelas mesmas vias. Dados semelhantes haviam sido descritos em modelo murino, onde a expansão de células Tregs nos pulmões dos camundongos infectados por *Coccidioides posadasii* pode ter diminuído a sobrevivência dos animais (Gonzalez et al., 2011). Por outro lado, estudos com outros microorganismos fúngicos, como *Cryptococcus neoformans* demonstraram ação bastante significativa das células Tregs em suprimir os efeitos deletérios das células Th2 no curso da infecção em modelo experimental de criptococose

pulmonar (Wiesner et al., 2016). Pandiyan et al. (2011) estudaram infecção por *Candida albicans* na mucosa oral de camundongos, para avaliar a resposta Th17 e de células Tregs. Os autores concluíram que células Tregs podem promover respostas agudas das células Th17 para suprimir a infecção. Assim, as células Treg teriam um papel de controle e supressão de carga fúngica (Busse et al., 2010; Pandiyan et al., 2011). Em nossos resultados, a maior concentração de Tregs na forma fixa da esporotricose sugere um perfil mais equilibrado, onde o curso das lesões costuma ser mais benigno, quando comprada à forma linfocutânea.

Vale ressaltar que pacientes com deficiência de FoxP3 apresentam uma síndrome conhecida por IPEX (*Immunodeficiency, Poliendocrinopathy and enteropathy X-linked syndrome*- síndrome de desregulação imune, poliendocrinopatia e enteropatia ligada ao X), que é classificada como uma imunodeficiência primária rara, de herança recessiva ligada ao X, que afeta meninos. Há diversas manifestações clínicas sendo as infecções de extrema relevância, levando a quadros de sepse, inclusive por fungos, como *Candida spp* (Bin Dhuban et al., 2015; Moreira et al., 2017) Isto reforça a hipótese protetora e de bom prognóstico em relação ao perfil de células Tregs.

IL-33/ST2L também apresentam relevante participação na resposta imune, e são constitutivamente expressos pelos linfócitos Th2 e T regs (Garlanda et al., 2013), além de basófilos, eosinófilos, células dendríticas, macrófagos e mastócitos (Oboki et al., 2010). Assim como demonstrado em modelos murinos, também em humanos, a IL-33 parece ter papel relevante na produção de citocinas e quimiocinas que prolongam a sobrevivência, e facilita a adesão de mastócitos (Allakhverdi et al., 2007; Iikura et al., 2007). O bloqueio do receptor ST2L de macrófagos em modelo experimental demonstrou pior prognóstico em infecções bacterianas, com progressão para sepse (Sweet et al., 2001). Foi demonstrado em infecção viral por citomegalovírus, que o ST2-L poderia ser expresso de forma transiente em células Th1, o que poderia estar ligada a diferenciação celular (Baumann et al., 2015). Este achado carece de confirmação em outros sistemas de infecção e maior detalhamento sobre a importância da presença temporária de células com perfil Th1 expressando receptor para IL-33, em relação à expressão já bem estabelecida desse receptor em células Tregs e com perfil do tipo 2. A IL33 funciona também como um alarme (alarmina), sendo sinalizadora da presença de danos teciduais (DAMPs- *damage-associated molecular patterns*). Isso se reflete no grande número de células-alvo para IL-33 e na sinalização de seu receptor, que gera a ativação de inúmeros reguladores transcricionais bastante amplos (Palmer et al., 2011; Garlanda et al., 2013).

Em nosso estudo, observamos maior concentração de IL33 e ST2-L na forma F da esporotricose. Não há relatos na literatura sobre o papel destes mediadores na esporotricose. No entanto, junto com outros resultados observados em nosso estudo, este achado é interessante no sentido de sugerir um padrão mais balanceado entre inflamação e regulação da resposta imune, o que pode sugerir um papel regulatório de IL-33/ST2-L na resposta imune frente ao *Sporothrix* spp, e a aparência clínica mais auto-limitada da lesão de forma fixa.

## CONCLUSÕES

Em conjunto os dados revelados pela análise do processo inflamatório presente nas lesões de esporotricose sugerem que a apresentação clínica mais exuberante, com comprometimento de sistema linfático e maior número de lesões, verificada na forma linfocutânea, pode estar ligada a resposta imune com características pró-inflamatória *in situ*. Essa hipótese pode ser explicada pelos percentuais mais expressivos de marcadores celulares possivelmente ligados à atividade pró-inflamatória e citotoxicidade. Já a forma fixa, que clinicamente se apresenta como lesão única, sem comprometimento do sistema linfático, revelou percentuais maiores de marcadores funcionais ligados a regulação/modulação do sistema imune. Isto pode justificar a apresentação clínica aparentemente mais simples da doença. Em todos os casos em que foi possível caracterizar as amostras, o fungo caracterizado foi o *S. brasiliensis*. Isso já era esperado, pois é sabido que esta espécie é a mais prevalente no Rio de Janeiro, de onde os pacientes são provenientes (Marimon et al., 2007; Oliveira et al., 2011). Há diversos trabalhos que descrevem esta espécie com a mais virulenta dentro do complexo *Sporothrix* spp, quando comparada a *S. schenckii* sensu stricto, o que pode também se relacionar com quadros clínicos mais graves, com apresentações clínicas mais complexas (Almeida Paes et al, 2014; Batista-Duharte et al., 2018; Arrilaga-Moncrief et al., 2009; Montenegro et al., 2014; Sanchotene et al., 2015; Brandolt et al., 2018). No entanto, nossa casuística não permitiu tal observação. A melhor compreensão entre as possíveis interações entre o fungo, o hospedeiro e o sistema imune da pele demonstra ser de grande importância no entendimento das variadas formas clínicas apresentadas na esporotricose, ainda que causadas pelo mesmo agente etiológico.

## REFERENCIAS

- AHMED AA, NORDLIND K, SCHULTZBERG M, LIDÉN S. Interleukin-1 alpha-and beta-, interleulin-6 and tumor necrosis factor-alpha-like immunoreactivities in chronic granulomatous skin conditions. **Acta Dermatol. Venerol.** 1994; 74: 435-440.
- ALBA-FIERRO CA, PÉREZ-TORRES A, TORIELLO C, et al. Immune Response Induced by an Immunodominant 60 kDa Glycoprotein of the Cell Wall of *Sporothrix schenckii* in Two Mice Strains with Experimental Sporotrichosis. **J Immunol Res.** 2016; 2016:6525831.
- ALEGRANCI P, DE ABREU RIBEIRO LC, FERREIRA LS, NEGRINI TDE C, MAIA DC, TANSINI A, et al. The predominance of alternatively activated macrophages following challenge with cell wall peptide-polysaccharide after prior infection with *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia.** 2013; 176:57–65.
- ALLAKHVERDI Z, SMITH DE, COMEAU MR, DELESPESE G. Cutting edge: The ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells. **J Immunol** 2007; 179:2051-4.
- ALMEIDA-PAES R, DE OLIVEIRA LC, OLIVEIRA MM, GUTIERREZ GALHARDO MC, NOSANCHUK JD, ZANCOPE-OLIVEIRA RM. Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from the *Sporothrix* complex. **Biomed Res Int.** 2015; 2015:212308.
- ALMEIDA-PAES R, DE OLIVEIRA MM, FREITAS DF, DO VALLE AC, ZANCOPE-OLIVEIRA RM, GUTIERREZ-GALHARDO MC. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* is associated with atypical clinical presentations. **PLoS Negl Trop Dis.** 2014; 8:e3094.
- ARONOWITZ, P.B., GILROY, M. & CHRISTIANSEN, K.N. Disseminated Sporotrichosis with Osteolytic Bone Involvement. **J. of General Internal Medicine** 2017; 32: 1063.
- ARRILLAGA- MONCRIEFF I, et al. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. **Clinical Microbiology and Infection.** 2009; 15:651–655.
- BARROS MB, SCHUBACH ADE O, DO VALLE AC, GUTIERREZ GALHARDO MC, CONCEIÇÃO-SILVA F, SCHUBACH TM, REIS RS, WANKE B, MARZOCHI KB, CONCEIÇÃO MJ. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in

- Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. **Clin. Infect. Dis.** 2004; 38:529–535.
- BARROS MB, DE ALMEIDA PAES R, SCHUBACH AO. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Clin. Microbiol Rev.**, 2011; 24:633-54.
- BARROS MB, SCHUBACH AO, SCHUBACH TM, WANKE B, LAMBERT-PASSOS SR. An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological aspects of a series of cases. **Epidemiol Infect.** 2008; 136:1192–1196.
- BATISTA-DUHARTE A, TÉLLEZ-MARTÍNEZ D, ROBERTO DE ANDRADE C, PORTUONDO DL, JELLMAYER JA, POLESİ MC, CARLOS IZ. *Sporothrix brasiliensis* induces a more severe disease associated with sustained Th17 and regulatory T cells responses than *Sporothrix schenckii sensu stricto* in mice. **Fungal Biol.** 2018; 122:1163-1170.
- BAUMANN C, BONILLA WV, FRÖHLICH A, et al. T-bet- and STAT4-dependent IL-33 receptor expression directly promotes antiviral Th1 cell responses. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2015; 112:4056–4061.
- BELLOCCHIO S, MONTAGNOLI C, BOZZA S, GAZIANO R, ROSSI G, MAMBULA SS, VECCHI A, MANTOVANI A, LEVITZ SM, ROMANI L. "The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. **Journal Immunol** 2004; 172: 3059-3069.
- BHUTIA PY, GURUNG S, YEGNESWARAN PP, PRADHAN J, PRADHAN U, PEGGY T, et al. A case series and review of sporotrichosis in Sikkim. **J Infect Dev Ctries.** 2011; 5:603-8.
- BIN DHUBAN ET AL., 2015; - DHUBAN, KHALID BIN, et al. Coexpression of TIGIT and FCRL3 identifies Helios+ human memory regulatory T cells. **Journal Immunol** 2015; 194: 3687-3696.
- BONIFAZ A, TIRADO-SÁNCHEZ A. Cutaneous disseminated and extracutaneous sporotrichosis: current status of a complex disease. **J Fungi.** 2017 Mar; 3(1):6.
- BONIFAZ, A; VAZQUEZ-GONZALEZ, D. Esporotricose: uma atualização. **g Ital. Dermatol. Venereol.** 2010; 145: 659–673.

- BORGES TS, ROSSI CN, FEDULLO JD, TABORDA CP, LARSSON CE. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the claws of domestic cats (indoor and outdoor) and in captivity in Sao Paulo (Brazil). **Mycopathologia**. 2013; 176:129-37.
- BOYCE K.J., ANDRIANOPOULOS A. Fungal dimorphism: The switch from hyphae to yeast is a specialized morphogenetic adaptation allowing colonization of a host. **FEMS Microbiol. Rev.** 2015; 39:797–811.
- BRITO MM, CONCEICAO-SILVA F, MORGADO FN, RAIBOLT PS, SCHUBACH A, SCHUBACH TP, ET AL. Comparison of virulence of different *Sporothrix schenckii* clinical isolates using experimental murine model. **Med Mycol.** 2007; 45:721-9.
- BUNCE, PE; YANG, L; CHUN, S; ZHANG, SX; TRINKAUS, MA; MATUKAS, Im Disseminated sporotrichosis in a patient with hairy cell leukemia treated with amphotericin B and posaconazole, **Medical Mycology**, 2012; 50:197–201.
- CARLOS IZ, SASSA MF, DA GRACA SGARBI DB, PLACERES MC, MAIA DC. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. **Mycopathologia**. 2009; 168:1-10.
- CARLOS IZ, SGARBI DBG, SANTOS GC, PLACERES MCP. *Sporothrix schenckii* lipid inhibits macrophage phagocytosis: involvement of nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$ . **Scand J Immunol.** 2003; 57:214–20.
- CASADEVALL A. Cards of virulence and the global virulome for humans. **Microbe**. 2006; 1:359–364
- CHAKRABARTI A, BONIFAZ A, GUTIERREZ-GALHARDO MC, MOCHIZUKI T, LI S. Global epidemiology of sporotrichosis. **Med Mycol.** 2015; 53:3–14.
- CHEN F., JIANG R., WANG Y., ZHU M., ZHANG X., DONG S., SHI H., WANG L. Recombinant phage elicits protective immune response against Systemic *S. globosa* infection in mouse model. **Sci. Rep.** 2017; 7:42024.
- CONCEIÇÃO-SILVA F, HAHNE M, SCHÖTER M, LOUIS JA, AND TSCHOPP J. The resolution of lesions induced by *Leishmania major* in mice requires a functional fas (apo-1, CD95), pathway of cytotoxicity. **Eur. J. Immunol.** 1998; 28: 237-245.

- CONCEIÇÃO-SILVA F, PERLAZA BL, LOUIS JA, AND ROMERO P. *Leishmania major* infection in mice primes for specific major histocompatibility complex class I in restricted CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cell responses. **Eur. J. Immunol.** 1994; 24: 2813-2817.
- CONCEIÇÃO-SILVA, F.; DOREA, R.C.C.; PIRMEZ, C.; SCHUBACH, A. & COUTINHO, S.G. Quantitative study of *Leishmania braziliensis braziliensis* reactive T cells in peripheral blood and in the lesions of patients with American mucocutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.** 1990; 79: 221.
- DAVINI D, NAEEM F, PHONG A, AL-KUHLANI M, VALENTINE KM, MCCARTY J, OJCIUS DM, GRAVANO DM, HOYER KK: Elevated regulatory T cells at diagnosis of *Coccidioides* infection associates with chronicity in pediatric patients. **J Allergy Clin Immunol.** 2018;142:1971-1974.e7.
- DE ALMEIDA J. R. F., KAIHAMI G. H., JANNUZZI G. P., DE ALMEIDA S. R. Therapeutic vaccine using a monoclonal antibody against a 70-kDa glycoprotein in mice infected with highly virulent *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. **Medical Mycology.** 2014; 53:42–50
- DELLA TERRA PP, RODRIGUES AM, FERNANDES GF, NISHIKAKU AS, BURGER E, DE CAMARGO ZP. Exploring virulence and immunogenicity in the emerging pathogen *Sporothrix brasiliensis*. **PLoS Negl Trop Dis.** 2017; 11:e0005903.
- DIAS NM, OLIVEIRA MM, SANTOS C, ZANCOPE-OLIVEIRA RM, LIMA N. Sporotrichosis caused by *Sporothrix mexicana*, Portugal. **Emerg Infect Dis.** 2011; 17:1975-6.
- FERNANDES GF, et al. Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. **Virulence.** 2013; 4:241–249.
- FERNANDES KSS, HELAL NETO E, BRITO MMS, SILVA JS, CUNHA FQ, BARJA-FIDALGO C. Detrimental role of endogenous nitric oxide in host defense against *Sporothrix schenckii*. **Immunology.** 2008; 123:469–79.
- GANTNER, B. N., SIMMONS, R. M., CANAVERA, S. J., AKIRA, S., AND UNDERHILL, D. M. Collaborative induction of inflammatory responses by Dectin-1 and Toll-like receptor 2. **J. Exp. Med.** 2003; 197, 1107–1117.

- GREMIÃO I.D.F., MIRANDA L.H.M., REIS E.G., RODRIGUES A.M., PEREIRA S.A. Zoonotic epidemic of sporotrichosis: cat to human transmission. **PLoS Pathog.** 2017; 13:e1006077.
- GUTIERREZ-GALHARDO MC, DE OLIVEIRA RM, VALLE AC, PAES RDE A, SILVATAVARES PM, MONZON A, ET AL. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility patterns of *Sporothrix schenckii* isolates from a cat-transmitted epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Med Mycol.** 2008; 46:141-51.
- GUZMAN-BELTRAN S.L., PEREZ-TORRES A., CORONEL-CRUZ C., TORRES-GUERRERO H. Phagocytic receptors on macrophages distinguish between different *Sporothrix schenckii* morphotypes. **Microbes Infect.** 2012; 14:1093–1101.
- IIKURA M, SUTO H, KAJIWARA N et al. IL-33 can promote survival, adhesion and cytokine production in human mast cells. **Lab Invest** 2007; 87:971-8. 36.
- IKEDA MAK, ALMEIDA JRF, JANNUZZI GP, CRONEMBERGER-ANDRADE A, TORRECILHAS ACT, MORETTI NS, CUNHA JPC, ALMEIDA SR, FERREIRA KS. Extracellular Vesicles From *Sporothrix brasiliensis* Are an Important Virulence Factor That Induce an Increase in Fungal Burden in Experimental Sporotrichosis. **Front Microbiol.** 2018; 9: 2286.
- JACOBSON E. S. Pathogenic roles for fungal melanins. **Clin. Microbiol. Rev.** 2000; 13:708-717.
- KAJIWARA H, SAITO M, OHGA S, UENOTSUCHI T, YOSHIDA S. Impaired Host Defense against *Sporothrix schenckii* in mice with chronic granulomatous disease. **Infect Immun.** 2004; 72: 5073–5079.
- KARKOWSKA-KULET, RAPALA-KOZIK E KOZIK. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochim Pol.** 2009; 56:211-24.
- Kevric I, Cappel MA, Keeling JH. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. **Dermatol Clin.** 2015;33(3):579-593. doi:10.1016/j.det.2015.03.018
- KHANOLKAR-YOUNG, S.; SNOWDON, D. & LOCKWOOD, D.N.J. Immunocytochemical localization of inducible nitric oxide synthase and

- transforming growth factor-beta in leprosy lesions. **Clin. Exp. Immunol.** 1998; 113: 438.
- KOGA T, DUAN H, FURUE M. Immunohistochemical detection of interferon-gamma-producing cells in granuloma formation of sporotrichosis. **Med Mycol.** 2002; 40:111-4.
- KOGA T, DUAN H, URABE K, FURUE M. immunohistochemical localization of activated and mature cd83+ dendritic cells in granulomas of sporotrichosis. **Eur J Dermatol.** 2001; 11:527-9.
- KONG, X., XIAO, T., LIN, J., WANG, Y., & CHEN, H. D. Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection. **Clinical microbiology and infection**, 2006; 12: 1077-1081.
- LIMA, R. F. D., SANTOS BRITO, M. M. D., SCHÄFFER, G. M. V., LIMA, O. C. D., & BORBA, C. D. M. Evaluation of the in vitro and in vivo dimorphism of *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, and *Paracoccidioides brasiliensis* isolates after preservation in mineral oil. **Canadian J. Microbiol**, 2004; 50, 445-449.
- LIU X, ZHANG Z, HOU B, WANG D, SUN T, LI F, et al. Rapid identification of *Sporothrix Schenckii* in biopsy tissue by PCR. **J Eur Acad Dermatol Venereol.** 2013; 27:1491-7.
- LOPES-BEZERRA, LEILA M.; SCHUBACH, ARMANDO; COSTA, ROSANE O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **An. Acad. Bras. Ciênc.** 2006; 78: 293-308.
- MARIMON R, CANO J, GENÉ J, SUTTON DA, KAWASAKI M, GUARRO J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **J Clin Microbiol.** 2007; 45:3198–3206.
- MATA-ESSAYAG S., DELGADO A., COLELLA M.T., LANDAETA-NEZER M.E., ROSELLO A., PEREZ DE SALAZAR C., OLAIZOLA C., HARTUNG C., MAGALDI S., VELASQUEZ E. Epidemiology of sporotrichosis in Venezuela. **Int. J. Dermatol.** 2013; 52:974–980.
- MIRANDA L.H.M., QUINTELLA L.P., MENEZES R.C., DOS SANTOS I.B., OLIVEIRA R.V.C., FIGUEIREDO F.B., LOPES-BEZERRA L.M., SCHUBACH

T.M. Evaluation of immunohistochemistry for the diagnosis of sporotrichosis in dogs. **Vet. J.** 2011; 190:408–411.

MIRANDA LH, CONCEICAO-SILVA F, QUINTELLA LP, KURAIEM BP, PEREIRA SA, SCHUBACH TM. Feline sporotrichosis: histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.** 2013; 36:425-32.

MORGADO FN, DE CARVALHO LMV, LEITE-SILVA J, et al. Unbalanced inflammatory reaction could increase tissue destruction and worsen skin infectious diseases - a comparative study of leishmaniasis and sporotrichosis. **Sci Rep.** 2018; 8:2898.

MORGADO FN, et al. Is the *in situ* inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? **Br J Dermatol.** 2008; 158:50–8

MORGADO FN, SCHUBACH AO, BARROS MB, CONCEICAO-SILVA F. The *in situ* inflammatory profile of lymphocutaneous and fixed forms of human sporotrichosis. **Med Mycol.** 2011; 49:612-20.

MORGADO FN, SCHUBACH AO, PIMENTEL MI, LYRA MR, VASCONCELLOS ÉC, VALETE-ROSALINO CM, CONCEIÇÃO-SILVA F. Is There any difference between the *in situ* and systemic IL-10 and IFN- $\gamma$  production when clinical forms of cutaneous sporotrichosis are compared? **PLoS One.** 2016; 11:e0162764.

OBOKI K, OHNO T, KAJIWARA N, SAITO H, NAKAE S. IL-33 and IL-33 receptors in host defense and diseases. **Allergol Int.** 2010; 59 : 143-60.

OLIVEIRA MM, ALMEIDA-PAES R, GUTIERREZ-GALHARDO MC, ZANCOPE-OLIVEIRA RM. Molecular identification of the *Sporothrix schenckii* complex. **Rev Iberoam Micol.** 2014; 31:2-6

OLIVEIRA MM, ALMEIDA-PAES R, MUNIZ MM, GUTIERREZ-GALHARDO MC, ZANCOPE-OLIVEIRA RM. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in brazil. **Mycopathologia.** 2011; 172:257-67.

OLIVEIRA MM, DE ALMEIDA-PAES R, DE MEDEIROS MUNIZ M, DE LIMA BARROS MB, GALHARDO MC, ZANCOPE-OLIVEIRA RM. Sporotrichosis

caused by *Sporothrix globosa* in Rio De Janeiro, Brazil: case report. **Mycopathologia**. 2010; 169:359-63.

OLIVEIRA MM, MAIFREDE SB, RIBEIRO MA, ZANCOPE-OLIVEIRA RM. Molecular identification of *Sporothrix* species involved in the first familial outbreak of sporotrichosis in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2013; 108:936-8.

OLIVEIRA MME, ALMEIDA-PAES R, CORRÊA-MOREIRA D, BORBA CM, MENEZES RC, FREITAS DFS, DO VALLE ACF, SCHUBACH AO, BARROS MBL, NOSANCHUK JD, GUTIERREZ-GALHARDO MC, ZANCOPE-OLIVEIRA RM. A case of sporotrichosis caused by different *Sporothrix brasiliensis* strains: mycological, molecular, and virulence analyses. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2019; 114:e190260.

Séguin O, Descoteaux A. Leishmania, the phagosome, and host responses: The journey of a parasite. *Cell Immunol*. 2016;309:1-6. doi:10.1016/j.cellimm.2016.08.004

OROFINO-COSTA R, MACEDO PM, RODRIGUES AM, BERNARDES-ENGEMANN AR. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. **An Bras Dermatol**. 2017; 92:606–620.

ORTEU CH, POULTER LW, RUSTIN MHA, SABIN CA, SALMON M, AKBAR AN. The role of apoptosis in the resolution of T cell-mediated cutaneous inflammation. **J. immunol**. 1998; 161: 1619-1629.

PANDIYAN P, ZHENG L, LENARDO MJ. The molecular mechanisms of regulatory T cell immunosuppression. **Front Immunol**. 2011; 2:60.

PETER G. PAPPAS, ILDEFONSO TELLEZ, ALEXANDRIA E. DEEP, DELIA NOLASCO, WALTER HOLGADO, BEATRIZ BUSTAMANTE. Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity, *Clinical Infectious Diseases*, 2000; 30: 65–70.

PIRMEZ C, COOPER C, PAES-OLIVEIRA M, SCHUBACH A, TORIGIAN VK, MODLIN RL. Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. **J. immunol**. 1990; 145: 3100- 3104.

- QUEIROZ-TELLES F, BUCCHERI R, BENARD G. Sporotrichosis In immunocompromised hosts. *J Fungi*. 2019; 5:8.
- QUINTELLA LP, PASSOS SR, DO VALE AC, GALHARDO MC, BARROS MB, CUZZI T, et al. Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: a series of 119 consecutive cases. *J cutan pathol*. 2011; 38:25-32
- REES RK, SWARTZBERG JE. Feline-transmitted sporotrichosis: a case study from California. *Dermatol online J*. 2011;17:2.
- REIS RS, ALMEIDA-PAES R, MUNIZ MM, TAVARES PMS, MONTEIRO PCF, PACHECO SCHUBACH TM, GUTIERREZ-GALHARDO MC, ZANCOPE-OLIVEIRA RM. Molecular characterization of *Sporothrix schenckii* isolates from humans and cats involved in the sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2009; 104: 769-774.
- RODRIGUES AM, DE HOOG S, DE CAMARGO ZP. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Med Mycol*. 2013; 51:405–412
- ROEDER, A., KIRSCHNING, C. J., RUPEC, R. A., SCHALLER, M., & KORTING, H. C. Toll-like receptors and innate antifungal responses. *Trends in Microbiology*, 2004; 12, 44-49.
- ROMO-LOZANO Y, HERNANDEZ-HERNANDEZ F, SALINAS E. Mast cell activation by conidia of *Sporothrix schenckii*: role in the severity of infection. *Scand J Immunol*. 2012;76 :11-20.
- RUIZ-BACA E, TORIELLO C, PEREZ-TORRES A, SABANERO-LOPEZ M, VILLAGOMEZ-CASTRO JC, LOPEZ-ROMERO E. Isolation and some properties of a glycoprotein of 70 kDa (Gp70) from the cell wall of *Sporothrix schenckii* involved in fungal adherence to dermal extracellular matrix. *Med Mycol*. 2009; 47:185–196.
- Sanchez MV, Eliçabe RJ, Di Genaro MS, et al. Total Leishmania antigens with Poly(I:C) induce Th1 protective response. *Parasite Immunol*. 2017;39(11):10.1111/pim.12491. doi:10.1111/pim.12491
- SCHUBACH A, BARROS MB, WANKE B. Epidemic sporotrichosis. *Current pinio in infectious diseases*. 2008; 21:129-133.

- SCHUBACH A, SCHUBACH TM, BARROS MB, WANKE B. Cat-transmitted sporotrichosis, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerg Infect Dis.** 2005; 11:1952–1954.
- SIVAGNANAM S, BANNAN AM, CHEN SC, RALPH AP. Sporotrichosis (*Sporothrix schenckii* infection) in the New South Wales mid-north coast, 2000-2010. **Med J Aust.** 2012;196:588-90.
- SONG Y, YAO L, ZHONG SX, TIAN YP, LIU YY, LI SS. Infant sporotrichosis in northeast china: a report of 15 cases. **Int J Dermatol.** 2011; 50:522-9.
- SWEET MJ, LEUNG BP, KANG D et al. A novel pathway regulating lipopolysaccharide-induced shock by ST2/T1 via inhibition of Toll-like receptor 4 expression. **J Immunol** 2001; 166:6633-9.
- TACHIBANA T, MATSUYAMA T, MITSUYAMA M. Involvement of cd4+ t cells and macrophages in acquired protection against infection with *Sporothrix schenckii* in mice. **Med Mycol.** 1999; 37:397-404.
- VERDAN FF, FALEIROS JC, FERREIRA LS, MONNAZZI LG, MAIA DC, TANSINE A, et al. Dendritic cell are able to differentially recognize *Sporothrix schenckii* antigens and promote Th1/Th17 response in vitro. **Immunobiology.** 2012; 217:788-94.
- VERMA S, VERMA GK, SINGH G, KANGA A, SHANKER V, SINGH D, et al. Sporotrichosis in sub-himalayan India. **Plos Negl Trop Dis.** 2012; 6:e1673.

#### **4.2. ARTIGO 2: Unbalanced inflammatory reaction could increase tissue destruction and worsen skin infectious diseases – a comparative study of leishmaniasis and sporotrichosis**

Artigo publicado no periódico Scientific Reports, 2018; 8:2898

Neste artigo foi realizado estudo comparativo entre o infiltrado inflamatório in situ em lesões de leishmaniose tegumentar americana (ATL) nas formas (A) - localizada (LCL-ATL; n=30) e (B) - forma esporotricóide (SCL-ATL; n=18), com lesões de esporotricose (SP), formas fixa (F-SP; n=24) e linfocutânea (LC-SP; n=24), e destes quatro grupos com indivíduos de pele saudável (n=9). O objetivo foi analisar características da resposta inflamatória produzida pelo sistema imune da pele, principalmente em relação a diferentes patógenos (*Leishmania* spp intracelular obrigatório e *Sporothrix* spp extracelular) capazes de produzir apresentações clínicas (lesões) similares. Foram selecionados 96 pacientes acompanhados no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses (LaPClinVigiLeish) do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil. Foi feita imunohistoquímica nas amostras obtidas a partir das lesões iniciais (pré-tratamento) de LTA e SP e de indivíduos controle (pele obtida em procedimentos estéticos). Os resultados demonstraram semelhanças e diferenças entre lesões de mesma etiologia e de etiologias diferentes. Particularmente foram evidenciadas semelhanças entre lesões de apresentação clínica similar, mesmo que produzida por agentes infecciosos diferentes, o que sugere um papel do sistema imune da pele na organização de respostas ótimas, na dependência do estímulo recebido. Assim, verificamos que o padrão inflamatório in situ pode ser distinto nos diferentes tipos de infecção, possivelmente pelas diferenças entre os patógenos, mas que também podem apresentar semelhanças entre si. Essa organização poderia apontar para um balanço na combinação entre estímulo patogênico e capacidade de resposta do sistema imune da pele na produção de tipos de lesão clinicamente semelhantes.

# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Unbalanced inflammatory reaction could increase tissue destruction and worsen skin infectious diseases – a comparative study of leishmaniasis and sporotrichosis

Received: 2 October 2017

Accepted: 29 January 2018

Published online: 13 February 2018

F. N. Morgado<sup>1,3</sup>, L. M. V. de Carvalho<sup>1</sup>, J. Leite-Silva<sup>1</sup>, A. J. Seba<sup>1</sup>, M. I. F. Pimentel<sup>2</sup>, A. Fagundes<sup>2</sup>, M. F. Madeira<sup>2</sup>, M. R. Lyra<sup>2</sup>, M. M. Oliveira<sup>4</sup>, A. O. Schubach<sup>2</sup> & F. Conceição-Silva<sup>1</sup>

The clinical presentations of skin diseases produced by different pathogens, as American tegumentary leishmaniasis (ATL) and sporotrichosis can be similar and possibly influenced by the skin immune system (SIS). The aim of the study was to understand the underlying mechanisms of skin inflammation produced by different pathogens. We used immunohistochemistry to analyze 96 patients: a- localized cutaneous leishmaniasis (LCL-ATL); b- sporotrichoid cutaneous leishmaniasis (SCL-ATL); c-lymphocutaneous (LC-SP); d- fixed (F-SP) sporotrichosis. LCL-ATL and SCL-ATL had a significantly higher percentage of CD8, FasL and NOS2 than sporotrichosis. In contrast, LC-SP had a substantially higher percentage of CD4, BCL2 and neutrophils than ATL lesions. These results indicated some differences in the profile of the *in situ* immune response suggesting that SIS is a complex, adaptable system capable of different responses to intracellular or extracellular pathogens. However, regardless of the etiological agents, the inflammatory reaction and clinical manifestations can be similar. SCL-ATL and LC-SP presented similarities in both clinical presentation and *in situ* inflammatory profile (CD3, CD22, neutrophils, macrophages). The clinical presentation of ATL and sporotrichosis could be explained by a combination of factors both of the host SIS and the etiological agent. The unbalanced host parasite relationship could result in atypical manifestations of skin disease.

Immunologists have recently paid more attention to the importance of the skin for immune surveillance. In humans, the skin, which covers approximately 2 m<sup>2</sup> and accounts for 16% of the body weight, is the largest organ of the body<sup>1</sup>. This organ has several immune systems, such as the skin immune system (SIS), skin-associated lymphoid tissue (SALT), and hair follicle immune system (HFIS)<sup>1–6</sup>. Consequently, the skin is now deemed essential for the development and selection of the immune response to several agents<sup>7–14</sup>.

As an immune surveillance organ, the skin continuously interacts with various infectious agents. Not surprisingly, some infectious and parasitic diseases primarily or secondarily target the skin<sup>15–22</sup>. For example, *Leishmania* spp. and *Sporothrix* spp cause two granulomatous skin diseases: American tegumentary leishmaniasis (ATL) and sporotrichosis (SP), respectively. Although these diseases share clinical similarities as ulcerated lesions that arise frequently in the limbs<sup>23</sup>, they differ in their duration and the number of lesions as well as the degree to which the skin is involved<sup>20,23–25</sup>. Since SP is caused by an extracellular fungus that occasionally enters phagocytic cells whereas ATL is caused by an obligatory intracellular parasite of mononuclear phagocytes, we hypothesized that these differences could elicit different SIS responses and, therefore, cause different clinical symptoms and signs.

<sup>1</sup>Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>2</sup>LaP Clin VigilLeish, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>3</sup>Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>4</sup>Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. F. N. Morgado and L. M. V. de Carvalho contributed equally in this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to F. C.-S. (email: fconcei@ioc.fiocruz.br)



**Figure 1.** Comparison of the clinical presentations of patients with (A) a fixed form of sporotrichosis (F-SP), (B) localized cutaneous leishmaniasis (LCL-ATL), (C) lymphocutaneous (LC-SP) form of sporotrichosis and (D) sporotrichoid cutaneous leishmaniasis (SCL-ATL). Note the similarities between the different clinical forms of sporotrichosis and ATL.

Clinical data	LCL-ATL n = 30 Median (Range)	SCL-ATL n = 18 Median (Range)	F-SP n = 24 Median (Range)	LC-SP n = 24 Median (Range)	Kruskal-Wallis test
Age (Years)	39.5 (14–71)	40 (13–71)	29.5 (18–73)	40 (16–68)	p = 0.100
Duration of infection* (months)	2.0 (1–17)	2.0 (1–12)	1.1 (0.25–4.0)	1.0 (0.25–4.5)	p = 0.002

**Table 1.** Distribution of age and duration of infection in American tegumentary leishmaniasis and sporotrichosis patients. LCL-ATL: localized cutaneous leishmaniasis; SCL-ATL: sporotrichoid cutaneous leishmaniasis; F-SP: fixed sporotrichosis; LC-SP: Lymphocutaneous sporotrichosis. \*Elapsed Time between the beginning of the cutaneous lesions and the attendance of the patient at the Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – (INI) and the diagnostic procedures in INI-FIOCRUZ. Bonferroni post hoc test: F-SP vs. LCL-ATL: p = 0.045. Mann-Whitney test LCL-ATL vs. LC-SP: p = 0.002; LCL-ATL vs. F-SP: p = 0.003.

To test this hypothesis, we used immunohistochemistry to compare the *in situ* inflammatory reaction of active lesions in ATL and SP patients presenting a dissimilar clinical presentation in order to elucidate some aspects underlying the mechanisms of localized inflammation of the skin by different infectious agents.

## Results

**Sporotrichosis and American tegumentary leishmaniasis patients only partially differ in the aspect of lesions and duration of infection before diagnosis.** LCL-ATL and F-SP commonly presented single and localized lesions without lymphatic involvement (Fig. 1A,B). SCL-ATL and LC-SP presented multiple lesions frequently associated with lymphangitis and more extensive lesions (Fig. 1C,D). All 4 groups of patients had similar age distributions ( $p > 0.05$ ; Table 1). The duration of infection, time elapsed between the beginning of the cutaneous lesions and the attendance of the patient at the Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – (INI) and the diagnostic procedures, was different among the groups. Sporotrichosis patients showed more acute development since their evolution was shorter than that of the LCL-ATL patients (Table 1). However, SCL-ATL presented similar duration as LC-SP ( $p > 0.05$ ). F-SP showed the shorter time of evolution (Table 1).

**Sporotrichosis and American tegumentary leishmaniasis lesions can differ in the distribution of their inflammatory reactions.** The inflammatory infiltrate in sporotrichosis lesions strongly predominated in the reticular dermis, near sweat glands and ducts, and around blood vessels, while that in ATL lesions it prevailed in the papillary dermis and was diffusely distributed throughout the lesion. However, since the inflammatory cells were heterogeneously distributed, there were no apparent differences in the cell density per  $\text{mm}^2$  of tissue in any of the four groups of patients with ATL or SP. Moreover, they were different from healthy skin that showed reduced cellularity organized as cell nests around cutaneous adnexa more concentrated in the papillary dermis (data not shown).

Cell types or inflammatory markers	LCL-ATL N=18	SCL-ATL N=18	F-SP N=24	LC-SP N=24	Healthy N=9
CD3 % and range	51.8 31.7–70.0	46.8 39.3–65.5	41.9 27.5–65.8	47.6 27.5–62.1	32.8 26.1–36.2
CD4 % and range	35.0 16.3–59.9	24.7 8.9–50.5	29.8 17.8–44.6	39.6 22.3–54.4	24.1 19.7–50.5
CD8 % and range	32.14 15.3–48–5	39.2 14.0–49.3	19.4 15.6–31.2	21.8 12.0–42.9	21.1 13.2–32.4
CD22 mm <sup>-2</sup> and range	11.2 0–46.0	13.1 1.8–30.0	2.9 0–9.4	7.5 1.0–25.0	0 0–4.3
Macrophages % and range	45.2 14.2–53.8	43.7 29.0–57.2	30.2 9.3–62.2	36.0 16.3–64.7	43.2 28.8–54.7
Neutrophils % and range	12.2 0.9–37.7	17.7 9.9–43.2	16.9 1.9–26.5	21.5 4.3–49.6	1.3 0–5.2
CD1a mm <sup>-2</sup> and range	8.5 0.5–56.0	15.5 3.0–38.0	4.0 0–8.0	2.0 0–11.0	ND
Bcl-2 % and range	35.9 6.7–68.4	25.0 2.3–40.9	28.6 12.0–48.0	37.4 22.6–48.0	13.9 10.1–16.3
Ki-67 % and range	9.7 4.9–24.0	8.3 3.2–19.9	5.7 1.8–15.5	7.3 1.7–16.9	2.1 0–4.2
CD95 % and range	39.7 1.4–78.4	36.9 15.1–50.5	39.0 17.2–50.4	40.4 9.5–75.0	40.1 39.5–43.0
CD95L % and range	23.7 9.9–36.2	24.8 1.8–36.6	10.7 3.4–25.5	13.6 4.2–29.0	7.2 0–23.9

**Table 2.** Cell types and inflammatory markers in American tegumentary leishmaniasis and sporotrichosis lesions. Data shown as median and range. LCL-ATL<sup>a</sup>: localized cutaneous leishmaniasis; SCL-ATL<sup>b</sup>: sporotrichoid cutaneous leishmaniasis; F-SP<sup>c</sup>: fixed sporotrichosis; LC-SP<sup>d</sup>: Lymphocutaneous sporotrichosis.

Clinical presentation	Intensity of NOS2 expression				
	Negative	Discrete	Moderate	Intense	Very intense
LCL-ATL	0	6 (20%)	9 (30%)	11 (36.7%)	4 (13.3%)
SCL-ATL	0	0	3 (20%)	6 (40%)	6 (40%)
F-SP	3 (27.2%)	4 (36.4%)	4 (36.4%)	0	0
LC-SP	1 (5.6%)	3 (16.7%)	8 (44.4%)	6 (33.3%)	0
Healthy	0	6 (75%)	2 (25%)	0	0

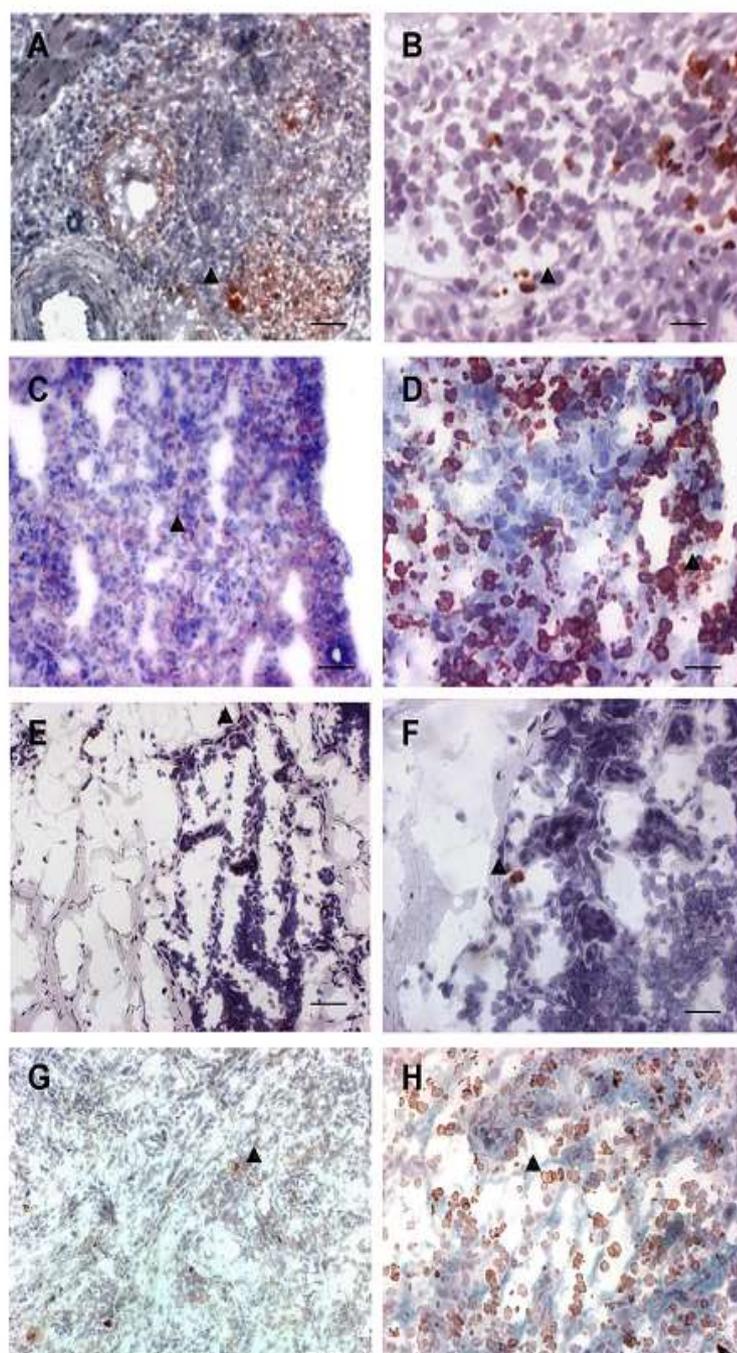
**Table 3.** Intensity of NOS2 expression in American tegumentary leishmaniasis and sporotrichosis lesions. Data shown as number of cases. LCL-ATL: localized cutaneous leishmaniasis; SCL-ATL: sporotrichoid cutaneous leishmaniasis; F-SP: fixed sporotrichosis; LC-SP: Lymphocutaneous sporotrichosis Chi-square  $p = 0.0001$ ; Pearson Chi-square: 79.131. For six patients from LC-SP, thirteen patients from F-SP and one patient from healthy group, NOS2 expression was not performed.

**The percentage composition of cell types and markers of *in situ* inflammatory reactions only partially differ when ATL and SP lesions are compared.** We observed significant differences as well as similarities in the percentage composition of cell types and markers between LCL-ATL, SCL-ATL, F-SP and LC-SP lesions (Tables 2–3 and Supplementary Table S1) (Figs 2–4). All four patient groups presented a higher percentage of CD3<sup>+</sup> cells than healthy skin ( $p < 0.05$ ). LCL-ATL patients had the highest percentage of CD3<sup>+</sup> cells and it was significantly different from F-SP patients ( $p = 0.012$ ; Mann-Whitney test) (Fig. 3A and Table 2). Finally, CD3<sup>+</sup> cells were similar in SCL-ATL and LC-SP.

The highest percentage of CD4<sup>+</sup> cells was found in LC-SP lesions (Fig. 3B and Table 2). CD4<sup>+</sup> cells were similar in LCL-ATL and F-SP. SCL-ATL lesions showed the lowest percentage of CD4<sup>+</sup> cells in lesions of ATL or SP patients, similar to that of healthy skin. On the other hand, SCL-ATL had more CD8<sup>+</sup> than CD4<sup>+</sup> cells, and more CD8<sup>+</sup> cells than the other groups (Fig. 3C and Table 2). In general, the percentage of CD8<sup>+</sup> cells was higher in the leishmaniasis than in the sporotrichosis lesions. Moreover, the number of CD8<sup>+</sup> cells in the sporotrichosis lesions was similar to that of the healthy skin.

B lymphocytes concentration was more intense in LCL-ATL lesions (Fig. 3D and Table 2). It was similar in SCL-ATL and LC-SP, and higher than that in F-SP and in healthy skin. These last two were comparable regarding B lymphocytes concentration.

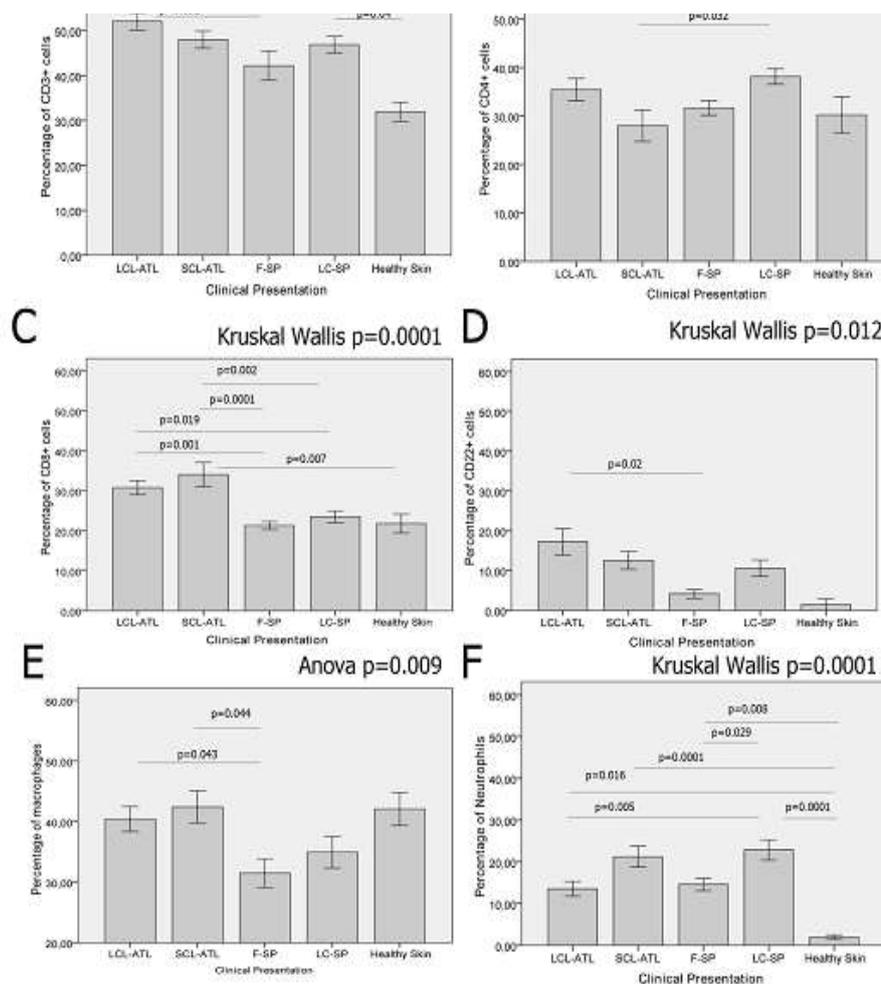
Excepting F-SP, there were no differences in the percentage of macrophages among the groups including healthy skin (Fig. 3E and Table 2). However, it is noteworthy emphasizing that cellularity per tissue area in healthy skin was markedly reduced when compared to the lesion groups, producing a difference when the absolute number of cells were counted. On the other hand, the percentage of neutrophils was higher in SCL-ATL and LC-SP



**Figure 2.** NOS2 expression (A,C,E,G) and neutrophils (B,D,F,H) in active lesions of LCL-ATL (A,B), SCL-ATL (C,D), F-SP (E,F) and LC-SP (G,H) patients. Magnification (A,C,E,G) 200× scale bar = 50 μm and (B,D,F,H) 400× scale bar = 25 μm. LCL-ATL: localized cutaneous leishmaniasis; SCL-ATL: sporotrichoid cutaneous leishmaniasis; F-SP: fixed sporotrichosis; LC-SP: Lymphocutaneous sporotrichosis. Arrows demonstrate examples of positive cells.

than in the other groups (Fig. 2B,D,F,H and F and Table 2). It was lower and similar in LCL-ATL and F-SP groups. Finally, all lesions groups showed a higher percentage of neutrophils than healthy skin.

NOS2 expression was higher in leishmaniasis than in sporotrichosis lesions (Table 3 and Fig. 2A,C,E,G). The highest expression was found in SCL-ATL lesions and 80% were classified as intense or very intense expression,



**Figure 3.** Percentage of (A) CD3<sup>+</sup>, (B) CD4<sup>+</sup>, (C) CD8<sup>+</sup>, (D) CD22<sup>+</sup> cells, (E) macrophages (CD68<sup>+</sup> cells) and (F) neutrophilic elastase-positive cells (neutrophils) Data represented as mean and SEM. P-value < 0.05 was considered statistically significant. LCL-ATL: localized cutaneous leishmaniasis; SCL-ATL: sporotrichoid cutaneous leishmaniasis; F-SP: fixed sporotrichosis; LC-SP: Lymphocutaneous sporotrichosis. Anova test was used for variables with normal distribution, otherwise Kruskal-Wallis test was applied. Bonferroni test was used as post hoc test. *Pis modi aliquatam ad magnate erupis nulpari busam, nimus aut aut odi conmiatur sita.*

followed by LCL-ATL (50%) and LC-SP (33.3%). F-SP lesions showed a similar expression of NOS2 when compared to healthy skin.<sup>0</sup>

All lesion groups showed more BCL-2<sup>+</sup> and Ki67<sup>+</sup> cells than healthy skin (Fig. 4A,B and Table 2). BCL-2<sup>+</sup> cells were more common in LC-SP and less frequent in SCL-ATL. Although Fas expression was similar among the groups (Fig. 4C), FasL was more expressed in leishmaniasis lesions than sporotrichosis or healthy skin (Fig. 4D). There were no differences between sporotrichosis lesions and healthy skin, regarding FasL.

## Discussion

In this study, we compared the *in situ* inflammatory response of ATL and SP, cutaneous lesions in order to evaluate how the skin immune system reacts to pathogens with different natures and in patients with diverse or similar clinical aspects. Our results have pointed to a general and similar inflammatory skin reaction with some differences according to the infection/clinical presentation. Although both infections primarily target the skin, they can present different degrees of *in situ* granulomatous reactions and different courses of disease. SP is often a subacute infection, which is characterized by an exudative reaction, whereas ATL is a chronic disease, which is characterized by a long duration of infection and the presence of non-exudative ulcers<sup>26–28</sup>. Furthermore, their infectious agents mainly affect different cellular compartments (extracellular and intracellular). As a result, we

various cells, such as mast cells, neutrophils, and eosinophils, are responsible for reducing the microorganism burden<sup>42</sup>. However, there are few studies on the immune response in sporotrichosis. In a murine model of sporotrichosis infection, thymus-derived cells are involved in resistance to this infection, which suggests that cellular immunity plays an important role in host resistance to this pathogen<sup>43–45</sup>. Interestingly, SCL-ATL showed similar quantities of neutrophil elastase expression to LC-SP, and in both they were more intense than in the other groups. Neutrophil elastase can cause tissue liquefaction (pus)<sup>25</sup>. Although tissue damage is usually harmful, small amounts of neutrophil-mediated tissue damage are beneficial because they destabilize collagen fibers leading to the collapse of capillaries and lymphatic vessels and confine the infectious agent to a local, toxic environment where can be destroyed<sup>46</sup>. In addition, neutrophils also secrete chemotactic factors for T cells and can induce T cell activation via interferon  $\gamma$ <sup>47</sup>. The cooperation of macrophages and neutrophils in order to eliminate parasites or fungal cells respectively in leishmaniasis or sporotrichosis, has also been suggested<sup>25,48–52</sup>. However, our results showed that the highest concentration of neutrophils occurred in LC-SP and SCL-ATL lesions, which are both characterized by a regional lymphatic spread. It is worth note that neutrophil enzymatic contents are able to degrade the extracellular matrix, leading to an easier migration of immune cells<sup>53</sup>. However, this function also could facilitate fungus spread, through lymphatic vessels<sup>54,55</sup>. As a result, even in the presence of the correct stimulus, an unbalanced inflammatory reaction could increase tissue destruction and facilitate fungal or parasite spread.

Interestingly, despite the low number of B-lymphocytes their concentration was higher in LCL-ATL lesions, followed by SCL-ATL and LC-SP both in a similar degree. B lymphocytes and their secreted antibodies could play a role in parasite burden control in leishmaniasis opsonizing occasional extracellular amastigotes, inducing phagocytosis, complement activation or NK cells stimulation and interaction with T cells<sup>56–59</sup>. In sporotrichosis, the role of B cells and immunoglobulins were verified. The expression of specific immunoglobulins increases as the fungal load decreases in mice, which suggests that the humoral immune response could be related to pathogen elimination or to secondary protective mechanisms<sup>60</sup>.

Collectively, our results suggested that the SIS is a complex, adaptable structure that is capable of optimizing the response to intracellular or extracellular pathogens. However, an unbalanced inflammatory reaction could increase tissue destruction and worsen the disease.

Although these response models can account for the classical clinical presentation of LCL-ATL and LC-SP, some patients have atypical forms<sup>25,43–45</sup> with different degrees of inflammation when compared with the typical clinical presentation. In this regard, F-SP lesions have an intermediate severity and development time when compared to LC-SP and ATL lesions. Consistent with these characteristics, the *in situ* inflammatory reaction in F-SP lesions exhibited fewer macrophages, CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and FasL<sup>+</sup> cells as well as lower NOS2 expression than ATL lesions and fewer neutrophils and B cells than LC-SP lesions. In addition, our previous study<sup>34</sup> showed that F-SP lesions have lower fungal burden than LC-SP lesions as well as clinical similarities (localized lesions without lymphatic alterations) with LCL-ATL lesions. On the other hand, when compared to F-SP, LC-SP lesions presented higher fungal burden and are clinically characterized by numerous skin nodules or plaques, following regional lymphatic dissemination, with an elevated degree of necrosis. On the basis of these findings, we hypothesize that the SIS response in patients with the F-SP rapidly controls the fungal burden, which reduces the severity of lesions and the exudative reaction, thereby promoting a more balanced immune response. Although this model of the immune response might not be completely applicable to the sporotrichoid form of ATL, it should be noted that even in SCL-ATL, the lesions are less exudative and develop more chronically than LC-SP lesions.

We cannot eliminate the possibility that different pathogen isolates could affect the SIS response to infection. However, at Rio de Janeiro State, *Leishmania braziliensis* is the causative agent of almost all cases and all isolates from ATL lesions included in our study were characterized as *Leishmania braziliensis*. Although the suggestion that different human *Sporothrix* spp isolates can affect both, the immune response and the development of infection in experimental sporotrichosis<sup>29</sup>, there is no clear relationship between human isolates and clinical presentation when genotype, protein expression, or antifungal susceptibility patterns are considered<sup>33,61</sup>. Moreover, in epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro previous studies identified *S. brasiliensis* as most frequent species (up to 93.5% of the cases) by molecular analyses<sup>62,63</sup>. These results corroborate with data from Marimon and coworkers (2007) in a study that described the new species of complex *Sporothrix* being of 127 *Sporothrix* strains collected from several parts of the world reported only *S. brasiliensis* among the tested isolates from Rio de Janeiro<sup>64</sup>.

In addition, we cannot exclude the possibility that, during infection, *Leishmania* amastigotes and *Sporothrix* spp yeasts can be transiently localized in the extracellular and intracellular milieu, respectively. This possibility could be important to control the parasite and fungal burden. However, the duration of the transience and the effects on the skin immune response are not known. Though, our results suggested that the clinical presentation of infectious skin diseases could be due to a combination of factors from both, the host SIS and the etiological agent.

Therefore, we could draw two conclusions. First, the SIS is a complex, adaptable structure that is capable of responding with plasticity to intracellular or extracellular pathogens in order to control microorganism burden. Second, the clinical presentation of infectious skin diseases could result from a combination of factors from both, the host SIS and the etiological agent. Since more severe lesions from both SP and ATL presented an important concentration of neutrophils, or CD8<sup>+</sup> T cells and NOS2 expression, respectively, our results also suggest that, unbalanced host SIS - parasite relationship can lead to more severe manifestations of skin infectious diseases.

## Material and Methods

**Patients.** Patients were diagnosed and followed up in the outpatient clinic of the Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses (LaP Clin VigiLeish), Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil. A total of 105 individuals were divided into

5 groups: (1) Localized cutaneous leishmaniasis (LCL-ATL n = 30); (2) Sporotrichoid cutaneous leishmaniasis (SCL-ATL n = 18); (3) Fixed cutaneous sporotrichosis (F-SP n = 24); (4) Lymphocutaneous sporotrichosis (LC-SP n = 24); (5) Healthy skin (n = 9) from esthetical surgery. The study was approved by the Ethics Committee of INI-FIOCRUZ (04/2001) and all patients provided informed written consent. All methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations related to researches using humans.

**Tissue samples.** Samples were obtained from the primary lesion from patients at the time of their investigative procedures for diagnosis. Normal skin was obtained from healthy individuals during esthetical surgery procedures. These samples were prepared for the following analyses: (1) histopathology (stored in 10% formalin buffer), (2) immunohistochemistry (stored at  $-196^{\circ}\text{C}$  in OCT medium (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Torrance, CA, USA), and (3) collected in sterile saline and cultured to isolate fungal cells and *Leishmania* spp. In order to isolate fungal cells, the samples were cultured at  $28^{\circ}\text{C}$  in Sabouraud Dextrose Agar supplemented with  $20\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  penicillin and  $40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  streptomycin (Sigma, St. Louis, MI, USA) during the hyphal phase. Then followed by growth at  $37^{\circ}\text{C}$  in Brain Heart Infusion medium (Sigma) until the yeast like phase. The fungal strains obtained of six patients used in this study were characterized at species level according to Oliveira and collaborators<sup>62</sup> using polyfasic taxonomy. Briefly, fungi were sub-cultured on Potato dextrose agar and Mycobiotic agar (both from Difco™ BD/Sparks MD, USA), and then identified by phenotypic and genotypic characteristics (macro and micromorphology, thermotolerance, carbohydrate assimilation and molecular assay). All of them were characterized as *S. brasiliensis*. To isolate *Leishmania* spp., the samples were cultured in biphasic medium Novy-MacNeal-Nicolle (NNN)/Schneider's insect medium (Sigma) at  $28^{\circ}\text{C}$ . Twenty-five isolates were typing through multilocus enzyme electrophoresis as *L. braziliensis*.

**Histopathology.** Formalin-fixed samples were stained with hematoxylin-eosin, and examined with a light microscope (Carl Zeiss Axioskop, Jena, Germany).

**Immunohistochemistry.** Immunohistochemistry was performed as described previously<sup>24</sup>. Three-micrometer-thick sections were mounted on silanized slides (Dakocytomation, Carpinteria, CA, USA), fixed in acetone, and hydrated in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4). After blocking endogenous peroxidase with peroxidase blocking reagent (Dakocytomation) and nonspecific staining with normal goat serum (Zymed, San Francisco, CA, USA), the slides were incubated with the following antibodies: CD3<sup>+</sup> (clone UCHT1), CD4<sup>+</sup> (clone MT310) and CD8<sup>+</sup> (clone DK25) T lymphocytes, CD22<sup>+</sup> (clone 4KB128) B lymphocytes, CD68<sup>+</sup> (clone KP1) macrophages, Bcl-2<sup>+</sup> (clone 124), Ki67<sup>+</sup> (clone Ki-S5) and neutrophil elastase (clone NP57 - neutrophils) (Dakocytomation); nitric oxide synthase 2 (NOS2) (clone 6) (BD Transduction Laboratories, KY, USA); Fas (clone DX2), and FasL (clone G247-4) (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA, USA). After that, the specimens were incubated with a biotinylated secondary antibody (goat anti-mouse IgG or goat anti-rabbit IgG – both from Zymed) followed by a streptavidin-biotin-peroxidase complex (ABC kit, Dakocytomation) and aminoethyl-carbazole (AEC kit, Zymed). Subsequently, the slides were counterstained with Mayer's hematoxylin (Dako) and examined under a light microscope (Zeiss). The percentage of stained cells was determined among 500 mononuclear cells. The intensity of NOS2 staining was measured in 10 microscope fields ( $200\times$  magnification) and scored as discrete (1 positive), moderate (2 or 3 positive areas), intense (4 or 5 positive areas), or very intense (>5 positive areas), as described previously<sup>24</sup>. All experiments were replicated at least twice and the suppression of the primary antibody served as a negative control.

**Statistical analysis.** Statistical analyses were calculated with SPSS24 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Kolmogorov Smirnov test was used to evaluate the distribution of variables. The Mann-Whitney or t-Student tests and Kruskal Wallis or Anova tests and Bonferroni post hoc test were used to compare the groups. Data are reported as median, SEM and range. The p-value cutoff for statistical significance was 0.05.

## References

1. Spellberg, B. The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. *Life Sci.* **67**, 477–502 (2000).
2. Streilein, J. W. Lymphocyte traffic, T-cell malignancies and the skin. *J Invest Dermatol.* **71**, 167–71 (1978).
3. Bos, J. D. & Kapsenberg, M. L. The skin immune system: progress in cutaneous biology. *Immunol Today* **14**, 5–8 (1993).
4. Christoph, T. *et al.* The human hair follicle immune system: cellular composition and immune privilege. *Br J Dermatol.* **142**, 862–73 (2000).
5. Paus, R., Nickoloff, B. J. & Ito, T. A "hairy" privilege. *Trends Immunol.* **26**, 32–40 (2005).
6. Ito, T. *et al.* Immunology of the human nail apparatus: the nail matrix is a site of relative immune privilege. *J Invest Dermatol.* **125**, 1139–48 (2005).
7. Conceição-Silva, F., Dórea, R. C., Pirmez, C., Schubach, A. & Coutinho, S. G. Quantitative study of *Leishmania braziliensis* reactive T cells in peripheral blood and in the lesions of patients with American mucocutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* **79**, 221–6 (1990).
8. da Conceição-Silva, F., Perlaza, B. L., Louis, J. A. & Romero, P. *Leishmania major* infection in mice primes for specific major histocompatibility complex class I-restricted CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cell responses. *Eur J Immunol.* **24**, 2813–7 (1994).
9. Conceição-Silva, F., Hahne, M., Schröter, M., Louis, J. & Tschopp, J. The resolution of lesions induced by *Leishmania major* in mice requires a functional Fas (APO-1, CD95) pathway of cytotoxicity. *Eur J Immunol.* **28**, 237–45 (1998).
10. Pirmez, C. *et al.* Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. *J Immunol Baltim Md 1950.* **145**, 3100–4 (1990).
11. Ahmed, A. A., Nordlind, K., Schultzberg, M. & Lidén, S. Interleukin-1 alpha- and beta-, interleukin-6- and tumour necrosis factor-alpha-like immunoreactivities in chronic granulomatous skin conditions. *Acta Derm Venereol.* **74**, 435–40 (1994).
12. Khanolkar-Young, S., Snowdon, D. & Lockwood, D. N. Immunocytochemical localization of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta (TGF-beta) in leprosy lesions. *Clin Exp Immunol.* **113**, 438–42 (1998).
13. Orteu, C. H. *et al.* The role of apoptosis in the resolution of T cell-mediated cutaneous inflammation. *J Immunol Baltim Md 1950.* **161**, 1619–29 (1998).

14. Bertho, A. L., Santiago, M. A., Da-Cruz, A. M. & Coutinho, S. G. Detection of early apoptosis and cell death in T CD4+ and CD8+ cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol.* 33, 317–25 (2000).
15. Bravo, F. G. & Gotuzzo, E. Cutaneous tuberculosis. *Clin Dermatol.* 25, 173–80 (2007).
16. Narang, T., Dogra, S. & Kaur, I. Localized lepromatous leprosy in household contact of multibacillary disease. *J Cutan Med Surg.* 12, 139–41 (2008).
17. Araújo, M. G. Leprosy in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 36, 373–82 (2003).
18. Marques, A. F. *et al.* Additive effect of P10 immunization and chemotherapy in anergic mice challenged intratracheally with virulent yeasts of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.* 10, 1251–8 (2008).
19. Restrepo, A., Benard, G., de Castro, C. C., Agudelo, C. A. & Tobón, A. M. Pulmonary paracoccidioidomycosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 29, 182–97 (2008).
20. Schubach, A., Barros, M. B., de, L. & Wanke, B. Epidemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis.* 21, 129–33 (2008).
21. Lindoso, J. A. L. & Lindoso, A. A. B. P. Neglected tropical diseases in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 51, 247–53 (2009).
22. Gomes, A. H. S., Armelin, I. M., Menon, S. Z. & Pereira-Chioccola, V. L. Leishmania (V.) braziliensis: detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol.* 119, 319–24 (2008).
23. Barros, M. B. *et al.* Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 38, 529–35 (2004).
24. Morgado, F. N. *et al.* Is the *in situ* inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? *Br J Dermatol.* 158, 50–8 (2008).
25. Morgado, F. N., Schubach, A. O., Barros, M. B. L. & Conceição-Silva, F. The *in situ* inflammatory profile of lymphocutaneous and fixed forms of human sporotrichosis. *Med Mycol.* 49, 612–20 (2011).
26. Schubach, A. *et al.* Retrospective study of 151 patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate. *Rev Soc Bras Med Trop.* 38, 213–7 (2005).
27. Schubach, A. O., Schubach, T. M. P. & Barros, M. B. L. Epidemic cat-transmitted sporotrichosis. *N Engl J Med.* 353, 1185–6 (2005).
28. Barros, M. B. L., Schubach, A. O., Schubach, T. M. P., Wanke, B. & Lambert-Passos, S. R. An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological aspects of a series of cases. *Epidemiol Infect.* 136, 1192–6 (2008).
29. Brito, M. M. S. *et al.* Comparison of virulence of different *Sporothrix schenckii* clinical isolates using experimental murine model. *Med Mycol.* 45, 721–9 (2007).
30. de Oliveira, F. S. *et al.* Genetic polymorphism in *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* detected in mucosal leishmaniasis of HIV-infected and non-HIV-infected patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 106, 683–7 (2012).
31. Cantanhêde, L. M. *et al.* Further Evidence of an Association between the Presence of *Leishmania* RNA Virus 1 and the Mucosal Manifestations in Tegumentary Leishmaniasis Patients. *PLoS Negl Trop Dis.* e0004079 (2015).
32. Reithinger, R. *et al.* Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis.* 7, 581–96 (2007).
33. Galhardo, M. C. G. *et al.* Molecular epidemiology and antifungal susceptibility patterns of *Sporothrix schenckii* isolates from a cat-transmitted epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Med Mycol.* 46, 141–51 (2008).
34. Remadi, L. *et al.* Clinical Presentation of Cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania major*. *Dermatol Basel Switz.* 232, 752–9 (2016).
35. Gonçalves, A. C. *et al.* The NLRP3 inflammasome contributes to host protection during *Sporothrix schenckii* infection. *Immunology.* 151, 154–66 (2017).
36. Da-Cruz, A. M. *et al.* T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9, 251–6 (2002).
37. Louis, J. A., Conceição-Silva, F., Himmelrich, H., Tacchini-Cottier, F. & Launois, P. Anti-leishmania effector functions of CD4+ Th1 cells and early events instructing Th2 cell development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Adv Exp Med Biol.* 452, 53–60 (1998).
38. Martinez, P. *et al.* Macrophage polarization alters the expression and sulfation pattern of glycosaminoglycans. *Glycobiology.* 25, 502–13 (2015).
39. Ferrante, C. J. & Leibovich, S. J. Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing. *Adv Wound Care.* 1, 10–6 (2012).
40. Mukhopadhyay, D. *et al.* M2 Polarization of Monocytes-Macrophages Is a Hallmark of Indian Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 9, e0004145 (2015).
41. Siewe, N., Yakubu, A. A., Satoskar, A. R. & Friedman, A. Immune response to infection by *Leishmania*: A mathematical model. *Math Biosci.* 276, 28–43 (2016).
42. Fietta, P. & Delsante, G. The effector T helper cell triade. *Riv Biol.* 102, 61–74 (2009).
43. Ifikhar, N., Bari, I. & Ejaz, A. Rare variants of Cutaneous Leishmaniasis: whitlow, paronychia, and sporotrichoid. *Int J Dermatol.* 42, 807–9 (2003).
44. López-Escobar, M., Drake-Monfort, M., Salesa-Gutiérrez, de, R. R. & Hermans-Ramirez, S. Sporotrichoid cutaneous leishmaniasis. *Actas Dermosifiliogr.* 98, 444–5 (2007).
45. Bari, A. U. & Rahman, S. B. Many faces of cutaneous leishmaniasis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 74, 23–7 (2008).
46. Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 6, 173–82 (2006).
47. Venuprasad, K., Chattopadhyay, S. & Saha, B. CD28 signaling in neutrophil induces T-cell chemotactic factor(s) modulating T-cell response. *Hum Immunol.* 64, 38–43 (2003).
48. Guimarães-Costa, A. B. *et al.* *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106, 6748–53 (2009).
49. Morgado, F. N. *et al.* Are Neutrophil Extracellular Traps Playing a Role in the Parasite Control in Active American Tegumentary Leishmaniasis Lesions? *PLoS One.* 10, e0133063 (2015).
50. Braian, C., Hoge, V. & Stendahl, O. Mycobacterium tuberculosis-induced neutrophil extracellular traps activate human macrophages. *J Innate Immun.* 5, 591–602 (2013).
51. Novais, F. O. *et al.* Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. *J Immunol Baltim Md 1950.* 183, 8088–98 (2009).
52. Ribeiro-Gomes, F. L. *et al.* Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. *J Immunol Baltim Md 1950.* 179, 3988–94 (2007).
53. Boaventura, V. S. *et al.* Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur J Immunol.* 40, 2830–6 (2010).
54. Nishikaku, A. S. *et al.* Burger, E. Matrix metalloproteinases with gelatinolytic activity induced by *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Int J Exp Pathol.* 90, 527–37 (2009).
55. de Araújo, M. S. *et al.* Evaluation of *in situ* expression of effector and regulatory cytokines, TLR, galectins and matrix metalloproteinases in oral manifestations of paracoccidioidomycosis. *Immunobiology.* 220, 154–63 (2015).
56. Cunha, C. F. *et al.* Cytotoxic cell involvement in human cutaneous leishmaniasis: assessments in active disease, under therapy and after clinical cure. *Parasite Immunol.* 38, 244–54 (2016).
57. Gibson-Corley, K. N. *et al.* Promotion of a functional B cell germinal center response after *Leishmania* species co-infection is associated with lesion resolution. *Am J Pathol.* 180, 2009–17 (2012).
58. Gibson-Corley, K. N., Boggiano, P. M., Mukbel, R. M., Petersen, C. A. & Jones, D. E. A deficiency in the B cell response of C57BL/6 mice correlates with loss of macrophage-mediated killing of *Leishmania amazonensis*. *Int J Parasitol.* 40, 157–61 (2010).

59. Moore, J. W. J. *et al.* B cell: T cell interactions occur within hepatic granulomas during experimental visceral leishmaniasis. *PLoS One*. 7, e34143 (2012).
60. Nascimento, R. C. & Almeida, S. R. Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 43, 241–7 (2005).
61. Fernandes, G. F., Do Amaral, C. C., Sasaki, A., Godoy, P. M. & De Camargo, Z. P. Heterogeneity of proteins expressed by Brazilian *Sporothrix schenckii* isolates. *Med Mycol.* 47, 855–61 (2009).
62. Oliveira, M. M. E., Almeida-Paes, R., Muniz, M. M., Gutierrez-Galhardo, M. C. & Zancoppe-Oliveira, R. M. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. *Mycopathologia.* 172, 257–67 (2011).
63. Almeida-Paes, R. *et al.* Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* is associated with atypical clinical presentations. *PLoS Negl Trop Dis.* 8, e3094 (2014).
64. Marimon, R. *et al.* *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol.* 45, 3198–206 (2007).

### Acknowledgements

This study was funded by IOC and INI-FIOCRUZ, PAEF-IOC-Fiocruz (IOC-008-FIO-15), FAPERJ (E26/111.230/2014), and CNPq, Brasil. A.O.S. is a fellowship beneficiary from CNPq and FAPERJ.

### Author Contributions

F.N.M., L.M.V.C. and F.C.S. conceived and designed the research; F.N.M., L.M.V.C., J.L.S., A.J.S., M.I.F.P., M.L.R., M.M.O., A.F., M.F.M., and A.O.S. performed experiments; F.N.M., L.M.V.C., J.L.S., and F.C.S. prepared figures and wrote the manuscript; F.N.M., L.M.V.C. and F.C.S. analyzed data; F.N.M., L.M.V.C. and F.C.S. edited the manuscript and F.N.M., L.M.V.C., M.I.F.P., M.L.R., A.F., M.F.M., J.L.S., A.O.S. and F.C.S. revised and approved the final manuscript version.

### Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21277-1>.

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

## 5. CONCLUSOES GERAIS

1. Os resultados demonstraram um perfil de resposta imune mais equilibrado nos casos de esporotricose na forma fixa, o que poderia explicar a apresentação clínica com lesão única, menos extensa, sem acometimento linfático. Nestes pacientes foi identificada maior concentração de IL-33 e seu receptor, ST2L, bem como de células T CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>, cujo perfil está ligado a células com provável perfil mais modulador da resposta imune. Por outro lado, a avaliação da resposta imune *in situ* em lesões LC revelou maior concentração de NOS2, células T CD4<sup>+</sup>, células T CD8<sup>+</sup>, macrófagos e neutrófilos, o que parece compor um infiltrado pró inflamatório ligado a ativação, sugerindo uma explicação para as lesões mais exuberantes, com acometimento linfático.
2. Os resultados de comparação da resposta imune *in situ* entre lesões cutâneas de Leishmaniose Tegumentar Americana e esporotricose indicaram algumas diferenças no perfil da resposta imune *in situ*, sugerindo que o sistema imune da pele é complexo e adaptável sendo capaz de respostas diferentes a patógenos intracelulares ou extracelulares. No entanto, independentemente dos agentes etiológicos, a reação inflamatória e as manifestações clínicas podem ser semelhantes. Isto pode ser verificado por algumas semelhanças entre o perfil da inflamação encontrado em lesões da forma esporotricóide da LTA e da forma linfocutânea da esporotricose, clinicamente muito semelhantes. Nestes pacientes foi verificado predominância de CD3, CD22, neutrófilos e macrófagos. Assim, a apresentação clínica de LTA e esporotricose pode ser explicado por uma combinação de fatores, tanto do SIS hospedeiro quanto do agente etiológico. O desequilibrado relação parasita hospedeiro pode resultar em manifestações atípicas de doença de pele.
3. A ausência de evidencias epidemiológicas de diferenças na distribuição de sexo, idade, localização das lesões entre outros parâmetros enfatiza que as maiores diferenças clinicas encontram-se no tipo de lesão em cada forma clínica da esporotricose e que essas diferenças podem ser

causadas por fatores relacionados ao tipo e intensidade da resposta inflamatória organizada. Não se pode descartar a participação do agente etiológico nessa determinação, mas a homogeneidade de achados referentes a espécie de *Sporothrix* circulante no rio de Janeiro, fala a favor de uma participação importante na resposta imune do hospedeiro na evolução da esporotricose.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

AHMED AA, NORDLIND K, SCHULTZBERG M, LIDÉN S. Interleukin-1 alpha and beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha-like immunoreactivities in chronic granulomatous skin conditions. 1994. **Acta Dermatol. Venerol.** 74: 435-440.

AUNG AK, TEH BM, MCGRATH C, THOMPSON PJ. Pulmonary sporotrichosis: case series and systematic analysis of literature on clinico-radiological patterns and management outcomes. **Med Mycol.** 2013;51(5):534-44.

BARROS MBL, SCHUBACH A, FRANCESCONI-DO-VALLE AC, GUTIERREZ-GALHARDO MC, SCHUBACH TMP, CONCEIÇÃO-SILVA F, et al. Positive montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio de Janeiro. **Acta Trop.** 2005 jan;93(1):41-47.

BARROS MB, DE ALMEIDA PAES R, SCHUBACH AO. Sporothrix schenckii and sporotrichosis. **Clin Microbiol Rev.** 2011;24(4):633-54.

BERTHO AL, SANTIAGO MA, DA-CRUZ AM, COUTINHO SG. Detection of early apoptosis and cell death in cd4+ and cd8+ cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis. **J. Med. Biol. Res.** 33: 317-325, 2000.

BHUTIA PY, GURUNG S, YEGNESWARAN PP, PRADHAN J, PRADHAN U, PEGGY T, et al. A case series and review of sporotrichosis in sikkim. **J Infect Dev Ctries.** 2011;5(8):603-8.

BONIFAZ, A.; VAZQUEZ-GONZALEZ, D. Esporotricose: uma atualização. **G Ital. Dermatol. Venereol.** 2010, 145, 659–673.

BONIFAZ A, TIRADO-SÁNCHEZ A. Cutaneous disseminated and extracutaneous sporotrichosis: current status of a complex disease. **J Fungi (Basel).** 2017 feb 10;3(1).

BORGES TS, ROSSI CN, FEDULLO JD, TABORDA CP, LARSSON CE. Isolation of sporothrix schenckii from the claws of domestic cats (Indoor and

outdoor) and in captivity in Sao Paulo (Brazil). **Mycopathologia**. 2013; 176(1-2):129-37.

BRITO MM, CONCEICAO-SILVA F, MORGADO FN, RAIBOLT PS, SCHUBACH A, SCHUBACH TP, et al. Comparison of virulence of different sporothrix schenckii clinical isolates using experimental murine model. **Med Mycol**. 2007;45(8):721-9.

BUNCE, PE; YANG, L; CHUN, S; ZHANG, SX; TRINKAUS, MA; MATUKAS, LM. Esporotricose disseminada em paciente com leucemia de células ciliadas tratada com anfotericina b e posaconazol. **Med. Mycol**. 2012 , 50 , 197–201.

BUSTAMANTE, B; CAMPOS, PE. Esporotricose endêmica. **Curr. Opin. Infectar. Dis**. 2001, 14 , 145-149.

CAMPOS, P.; ARENAS, R.; CORONADO, H. Epidemic cutaneous sporotrichosis. **Int J Dermatol**, v. 33, p. 38-41, 1994.

CARLOS IZ, SASSA MF, DA GRACA SGARBI DB, PLACERES MC, MAIA DC. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. **Mycopathologia**. 2009;168(1):1-10.

CHANG S, HERSH AM, NAUGHTON G, MULLINS K, FUNG MA, SHARON VR. Disseminated cutaneous sporotrichosis. **Dermatol Online J**. 2013;19(11): 20401.

CONCEIÇÃO-SILVA, F; DOREA, RCC; PIRMEZ, C; SCHUBACH, A & COUTINHO, SG. Quantitative study of leishmania braziliensis braziliensis reactive t cells in peripheral blood and in the lesions of patients with american mucocutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol**. 79: 221, 1990.

CONCEIÇÃO-SILVA F, PERLAZA BL, LOUIS JA, AND ROMERO P. Leishmania major infection in mice primes for specific major histocompatibility complex class i in restricted cd8+ cytotoxic t cell responses. **Eur. J. Immunol**. 24: 2813-2817, 1994.

CONCEIÇÃO-SILVA F, HAHNE M, SCHÖTER M, LOUIS JA, AND TSCHOPP J. The resolution of lesions induced by leishmania major in mice requires a functional fas (apo-1, cd95), pathway of cytotoxicity. **Eur. J. Immunol.** 28: 237-245, 1998.

COSTA RO, BERNARDES-ENGEMANN AR, AZULAY-ABULAFIA L, BENVENUTO F, NEVES MDE L, LOPES-BEZERRA LM. Sporotrichosis in pregnancy: case reports of 5 patients in a zoonotic epidemic in rio de janeiro, brazil. **An Bras Dermatol.** 2011;86(5):995-8.

DE CARVALHO AGUINAGA F, TROPE BM, FERNANDES NC, ENGEL DC, RAMOS ESM. Sporotrichosis with bone involvement: an alert to an occupational disease. **Case Rep Dermatol.** 2014;6(1):114-8.

DE LIMA BARROS MB, SCHUBACH A, FRANCESCONI-DO-VALLE AC, GUTIERREZ-GALHARDO MC, SCHUBACH TM, CONCEIÇÃO-SILVA F, et al. positive montenegro skin test among patients with sporotrichosis in rio de janeiro. **Acta Tropical.** 2005;93(1):41-7.

DE LIMA BARROS MB, SCHUBACH AO, DE VASCONCELLOS CARVALHAES DE OLIVEIRA R, MARTINS EB, TEIXEIRA JL, WANKE B. Treatment of cutaneous sporotrichosis with itraconazole--study of 645 patients. **Clin Infect Dis.** 2011;52(12):e200-6.

DE OLIVEIRA MM, VERISSIMO C, SABINO R, ARANHA J, ZANCOPE-OLIVEIRA RM, SAMPAIO P, et al. first autochthone case of sporotrichosis by sporothrix globosa in portugal. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 2014;78(4):388-90.

DI LUCA DG, DE ANDRADE PJ, SALES AM, DE MENEZES VM, GALHARDO MC, PIMENTEL MI, et al. Superposition of leprosy and other neglected tropical diseases in the state of rio de janeiro: a case series report. **Lepr Rev.** 2013;84(4):302-7.

DIAS NM, OLIVEIRA MM, SANTOS C, ZANCOPE-OLIVEIRA RM, LIMA N. Sporotrichosis caused by sporothrix Mexicana, Portugal. **Emerg Infect Dis.** 2011;17(10):1975-6.

ESPINOSA V, RIVERA A. Cytokines and the regulation of fungus-specific cd4 t cell differentiation. **Cytokine**. 2012;58(1):100-6.

EVANS KG, ABRAHAM RM, MIHOVA D, XU X, FRANK DM, ROSENBAACH M, et al. Acute onset of leg nodules in a sporotrichoid pattern--quiz case. Diagnosis: primary cutaneous diffuse large b-cell lymphoma, leg type (pclbcl-lt). **Arch Dermatol**. 2012;148(10):1199-200.

FERNANDES GF, DOS SANTOS PO, RODRIGUES AM, SASAKI AA, BURGER E, DE CAMARGO ZP. Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different sporothrix schenckii sensu stricto isolates compared with s. globosa and s. brasiliensis species. **Virulence**. 2013;4(3):241-9.

FERNANDEZ-SILVA F, CAPILLA J, MAYAYO E, GUARRO J. Modest efficacy of voriconazole against murine infections by sporothrix schenckii and lack of efficacy against sporothrix brasiliensis. **Mycoses**. 2014;57(2):121-4.

FERREIRA CP, DO VALLE AC, FREITAS DF, REIS R, GALHARDO MC. Pregnancy during a sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Int J Gynaecol Obstet**. 2012;117(3):294-5.

FERREIRA LS, PORTUONDO DL, POLESI MC, CARLOS IZ. Natural killer cells are pivotal for in vivo protection following systemic infection by sporothrix schenckii. **Immunology**. 2018 dec;155(4):467-476.

FREITAS DF, DE SIQUEIRA HOAGLAND B, DO VALLE AC, FRAGA BB, DE BARROS MB, DE OLIVEIRA SCHUBACH A, et al. Sporotrichosis in hiv-infected patients: report of 21 cases of endemic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Med Mycol**. 2012;50(2):170-8.

FREITAS, DF; SANTOS, SS; ALMEIDA-PAES, R; DE OLIVEIRA, MM; VALLE, CA; GUTIERREZ-GALHARDO, MC; ZANCOPE-OLIVEIRA, RM; NOSANCHUK, JD. Aumento da virulência de *sporothrix brasiliensis* ao longo de cinco anos em um paciente com esporotricose disseminada crônica. **Virulence** 2015, 6 , 112–120.

GALHARDO MC, DE OLIVEIRA RM, VALLE AC, PAES RDE A, SILVATAVARES PM, MONZON A, et al. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility patterns of *sporothrix schenckii* isolates from a cat-transmitted epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Med Mycol.** 2008;46(2):141-51.

GEWEHR P, JUNG B, AQUINO V, MANFRO RC, SPULDARO F, ROSA RG, et al. Sporotrichosis in renal transplant patients. **Can J Infect Dis Med Microbiol.** 2013;24(2):e47-9.

GUTIERREZ-GALHARDO MC, BARROS MB, SCHUBACH AO et al. Erythema multiforme associated with sporotrichosis. **J Eur Acad Dermatol Venereol** 2005; 9:507-9.

GUTIERREZ-GALHARDO MC, SHUBACH AO, BARROS MBL et al. Erythema nodosum associated with sporotrichosis. **Int J Dermatol** 2002;41: 114-16.

GUZMAN-BELTRAN S, PEREZ-TORRES A, CORONEL-CRUZ C, TORRES-GUERRERO H. Phagocytic receptors on macrophages distinguish between different *sporothrix schenckii* morphotypes. **Microbes infect.** 2012;14(12):1093-101.

HASSAN, K; TURKER, T; ZANGENEH, T. Esporotricose disseminada em um paciente imunocompetente. Rep. Processo plast surg. **Hand surg.** 2016 , 3 , 44-47.

KAJIWARA H, SAITO M, OHGA S, UENOTSUCHI T, YOSHIDA S. Defesa do hospedeiro prejudicada contra *sporothrix schenckii* em camundongos com doença granulomatosa crônica. **Infect Immun.** 2004; 72 (9): 5073-9.

KAWTAR I, SALIM G, MARIAME M, FATIMAZAHRA M, IMANE T, SALMA B, et al. sporotrichoid chromomycosis. **Dermatol online J.** 2013;19(11):20394.

KHANOLKAR-YOUNG, S; SNOWDON, D. & LOCKWOOD, DNJ. Immunocytochemical localization of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta in leprosy lesions. **Clin. Exp. Immunol.** 113: 438, 1998

KOGA T, DUAN H, FURUE M. Immunohistochemical detection of interferon-gamma-producing cells in granuloma formation of sporotrichosis. **Med Mycol.** 2002;40(2):111-4.

KOGA T, DUAN H, URABE K, FURUE M. Immunohistochemical localization of activated and mature cd83+ dendritic cells in granulomas of sporotrichosis. **Eur J Dermatol.** 2001;11 (6):527-9.

LAUERMANN F, LYRA M, GAUDIO R. Sporotrichosis mimicking keratoacanthoma. **Am J Trop Med Hyg.** 2012;86 (5):741.

LEME, LRP et al. Mycological evaluation of bronchoalveolar lavage in cats with respiratory signs from Rio de Janeiro, Brazil. **Mycoses**, v. 50, n. 3, p. 210–214, 2007.

LI M, CHEN Q, SUN J, SHEN Y, LIU W. Inflammatory response of human keratinocytes triggered by sporothrix schenckii via toll-like receptor 2 and 4. **J Dermatol Sci.** 2012;66(1):80-2.

LIU X, ZHANG Z, HOU B, WANG D, SUN T, LI F, et al. Rapid identification of sporothrix schenckii in biopsy tissue by PCR. **J Eur Acad Dermatol Venereol.** 2013;27(12):1491-7.

MATA-ESSAYAG S, DELGADO A, COLELLA MT, LANDAETA-NEZER ME, ROSELLO A, PEREZ DE SALAZAR C, et al. Epidemiology of sporotrichosis in venezuela. **Int J Dermatol.** 2013;52(8):974-80.

MIRANDA LH, SANTIAGO MA, SCHUBACH TM, MORGADO FN, PEREIRA SA, OLIVEIRA RV, CONCEIÇÃO-SILVA F. Severe feline sporotrichosis associated with an increased population of cd8low cells and a decrease in cd4+ cells. **Med Mycol.** 2016 jan 1;54(1):29-39.

MIRANDA LH, CONCEICAO-SILVA F, QUINTELLA LP, KURAIEM BP, PEREIRA SA, SCHUBACH TM. Feline sporotrichosis: histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.** 2013;36(4):425-32.

MIRANDA LH, QUINTELLA LP, MENEZES RC, DOS SANTOS IB, OLIVEIRA RV, FIGUEIREDO FB, et al. Evaluation of immunohistochemistry for the diagnosis of sporotrichosis in dogs. **Vet J.** 2011;190 (3):408-11.

MOREIRA JA, FREITAS DF, LAMAS CC. The impact of sporotrichosis in HIV-infected patients: a systematic review. **Infection.** 2015 jun;43 (3):267-76.

MORGADO FN, SCHUBACH AO, BARROS MB, CONCEICAO-SILVA F. The in situ inflammatory profile of lymphocutaneous and fixed forms of human sporotrichosis. **Med Mycol.** 2011;49 (6):612-20.

NASSIF, PW; GRANADO, IR; FERRAZ, JS; SOUZA, R; NASSIF, AE. Apresentação atípica de esporotricose cutânea em paciente alcoolizado. **Dermatol. Online J.** 2012, 18, 12.

NAKAMURA S, HASHIMOTO Y, NISHI K, TAKAHASHI H, TAKEDA K, MIZUMOTO T, et al. Cutaneous tuberculosis simulating lymphocutaneous sporotrichosis. **Australas J Dermatol.** 2012;53 (4):316-7.

NATHAN, CF, AND J B. HIBBS, JR. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. **Curr. Opin. Immunol.** 1991.3:65–70.

NEGRINI TDE C, FERREIRA LS, ALEGRANCI P, ARTHUR RA, SUNDFELD PP, MAIA DC, et al. Role of tlr-2 and fungal surface antigens on innate immune response against sporothrix schenckii. **Immunol Invest.** 2013;42(1):36-48.

OLIVEIRA MM, ALMEIDA-PAES R, GUTIERREZ-GALHARDO MC, ZANCOPE-OLIVEIRA RM. Molecular identification of the sporothrix schenckii complex. **Rev Iberoam Micol.** 2014;31(1):2-6.

OLIVEIRA MM, ALMEIDA-PAES R, MUNIZ MM, GUTIERREZ-GALHARDO MC, ZANCOPE-OLIVEIRA RM. Phenotypic and molecular identification of sporothrix isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. **Mycopathologia.** 2011;172(4):257-67.

OLIVEIRA MM, MAIFREDE SB, RIBEIRO MA, ZANCOPE-OLIVEIRA RM. Molecular identification of sporothrix species involved in the first familial outbreak

of sporotrichosis in the state of espirito santo, southeastern brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2013;108(7):936-8.

OLIVEIRA MM, ALMEIDA-PAES R, GUTIERREZ-GALHARDO MC, ZANCOPE-OLIVEIRA RM. Molecular identification of the *sporothrix schenckii* complex, **Rev Iberoam Micol** , 2014, vol. 31 (pg. 2-6)

OROFINO-COSTA R, UNTERSTELL N, CARLOS GRIPP A, DE MACEDO PM, BROTA A, DIAS E, et al. Pulmonary cavitation and skin lesions mimicking tuberculosis in a hiv negative patient caused by sporothrix brasiliensis. **Med Mycol Case Rep.** 2013;2:65-71.

ORELLANA, a. et al. Esporotricosis fija con cuerpo asteroide junto al fragmento vegetal. **Rev. Iberoamericana de Micologia**, v. 26, n. 4, p. 250–251, 2009.

ORTEU CH, POULTER LW, RUSTIN MHA, SABIN CA, SALMON M, AKBAR AN. The role of apoptosis in the resolution of t cell-mediated cutaneous inflammation. **J. Immunol.** 161: 1619-1629, 1998.

OTTONELLI STOPIGLIA CD, MAGAGNIN CM, CASTRILLON MR, MENDES SD, HEIDRICH D, VALENTE P, et al. Antifungal susceptibilities and identification of species of the sporothrix schenckii complex isolated in Brazil. **Med Mycol.** 2014;52(1):56-64.

PEREIRA SA, MENEZES RC, GREMIAO ID, SILVA JN, HONSE CDE O, FIGUEIREDO FB, et al. Sensitivity of cytopathological examination in the diagnosis of feline sporotrichosis. **J Feline Med Surg.** 2011;13(4):220-3.

PEREIRA SA, GREMIAO ID, KITADA AA, BOECHAT JS, VIANA PG, SCHUBACH TM. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio De Janeiro, State Of Rio De Janeiro, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2014; 47(3):392-393.

PIRMEZ C, COOPER C, PAES-OLIVEIRA M, SCHUBACH A, TORIGIAN VK, MODLIN RL. Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. **J. Immunol.** 145: 3100- 3104, 1990.

QUINTELLA LP, PASSOS SR, DE MIRANDA LH, CUZZI T, BARROS MB, FRANCESCONI-DO-VALE AC, et al. Proposal of a histopathological predictive rule for the differential diagnosis between american tegumentary leishmaniasis and sporotrichosis skin lesions. **Br J Dermatol**. 2012;167(4):837-46.

QUINTELLA LP, PASSOS SR, DO VALE AC, GALHARDO MC, BARROS MB, CUZZI T, et al. Histopathology of cutaneous sporotrichosis in rio de janeiro: a series of 119 consecutive cases. **J Cutan Pathol**. 2011;38(1):25-32.

RAMOS-E-SILVA, M; VASCONCELOS, C; CARNEIRO, S; CESTARI, T. Esporotricose. **Clin. Dermatol**. 2007 , 25 , 181-187.

REES RK, SWARTZBERG JE. Feline-transmitted sporotrichosis: a case study from california. **Dermatol Online J**. 2011;17(6):2.

RODRIGUES AM, DE HOOG GS, DE CAMARGO ZP. Genotyping species of the sporothrix schenckii complex by pcr-rflp of calmodulin. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 2014a;78(4):383-7.

RODRIGUES AM, DE HOOG GS, DE CASSIA PIRES D, BRIHANTE RS, SIDRIM JJ, GADELHA MF, et al. Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. **BMC Infect Dis**. 2014b;14:219.

RODRIGUES AM, DE HOOG S, DE CAMARGO ZP. Emergence of pathogenicity in the sporothrix schenckii complex. **Med Mycol**. 2013;51(4):405-12.

RODRIGUES AM, DE HOOG GS, DE CAMARGO ZP. Genotyping species of the sporothrix schenckii complex by pcr-rflp of calmodulin. **Diagn Microbiol Infect Dis** 2014;78:383–387.

RODRIGUES AM, DE HOOG GS, DE CAMARGO ZP. Molecular diagnosis of pathogenic sporothrix species. **Plos Negl Trop Dis**. 2015;9:e0004190.

ROMO-LOZANO Y, HERNANDEZ-HERNANDEZ F, SALINAS E. Mast cell activation by conidia of sporothrix schenckii: role in the severity of infection. **Scand J Immunol**. 2012;76(1):11-20.

SCOTT, EN; MUCHMORE, HG; FINE, DP. Activation of the alternative complement pathway by *sporothrix schenckii*. **Infec. Immun.**, v. 51, n.1, p. 6-9, 1986.

SHARON VR, KIM J, SUDHAKAR S, FUNG MA, MANIAR A. Disseminated cutaneous sporotrichosis. **Lancet Infect Dis**. 2013;13(1):95.

SCHECHTMAN, RC. Sporotrichosis: part i. **skinmed** 2010 , 8 , 216-220.

SCHAFFNER, A., C. E. DAVIS, T. SCHAFFNER, M. MARKERT, H. DOUGLAS, AND A. I. BRAUDE. *in vitro* susceptibility of fungi to killing by neutrophil granulocytes discriminates between primary pathogenicity and opportunism. **J. Clin. Investig.** 1986, 78:511–524.

SCHENCK B. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to the sporotricha. **Johns Hopkins Hospital Bulletin**. 1898; 240(93):286-290.

SCHUBACH A, DE LIMA BARROS MB, SCHUBACH TM, et al. Primary conjunctival sporotrichosis: two cases from a zoonotic epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Cornea** 2005;24:491-493.

SCHUBACH TM, SCHUBACH AO, OKAMOTO T *et al*. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). **J Am Vet Med Assoc** 2004; 224:1623-9.

SCHUBACH A, BARROS MB, WANKE B. Epidemic sporotrichosis. Current opinion in infectious diseases. 2008; 21(2):129-133.

SCHUBACH TM, MENEZES RC, WANKE B. Sporotrichosis. In: GREENE EC. Infectious diseases of the dog and cats. 4th ed. Missouri: **Elsevier**; 2012; 645-650.

SEVERO, LC; FESTUGATO, M.; BERNARDI, C; LONDERO, AT. Lesões cutâneas generalizadas devido a *sporothrix schenckii* em um paciente sob terapia prolongada com esteróides. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, 1999 , 41 , 59–62.

SIVAGNANAM S, BANNAN AM, CHEN SC, RALPH AP. Sporotrichosis (sporothrix schenckii infection) in the New South Wales mid-north coast, 2000-2010. **Med J Aust.** 2012;196(9):588-90.

SONG Y, YAO L, ZHONG SX, TIAN YP, LIU YY, LI SS. Infant sporotrichosis in northeast china: a report of 15 cases. **Int J Dermatol.** 2011;50(5):522-9.

TACHIBANA T, MATSUYAMA T, MITSUYAMA M. Characteristic infectivity of sporothrix schenckii to mice depending on routes of infection and inherent fungal pathogenicity. **Med Mycol.** 1998;36(1):21-7.

TACHIBANA T, MATSUYAMA T, MITSUYAMA M. Involvement of cd4+ t cells and macrophages in acquired protection against infection with sporothrix schenckii in mice. **Med Mycol.** 1999;37(6):397-404.

VERDAN FF, FALEIROS JC, FERREIRA LS, MONNAZZI LG, MAIA DC, TANSINE A, et al. Dendritic cell are able to differentially recognize sporothrix schenckii antigens and promote th1/th17 response *in vitro*. **Immunobiology.** 2012;217(8):788-94.

VERMA S, VERMA GK, SINGH G, KANGA A, SHANKER V, SINGH D, et al. Sporotrichosis in sub-himalayan India. **Plos Negl Trop Dis.** 2012;6(6):e1673.

XAVIER MO, BITTENCOURT LR, SILVA CM, VIEIRA RS, PEREIRA HC. Atypical presentation of sporotrichosis: report of three cases. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2013;46(1):116-8.

ZHANG Z; LIU X; LV X; LIN, J. Variação no genótipo e maior virulência de uma cepa de *sporothrix schenckii* causando esporotricose cutânea disseminada. **Mycopathologia**, 2011, 172 , 439-446.

ZHANG YQ, XU XG, ZHANG M, JIANG P, ZHOU XY, LI ZZ, ZHANG MF, et al. Sporotrichosis: clinical and histopathological manifestations. **Am J Dermatopathol.** 2011;33:296–302.

ZHANG Y, PYLA V. Cancer-like lesions in a patient with sporotrichosis. **Int J Dermatol.** 2014a;53(4):e311-2.

**ANEXO 1: Termo de Compromisso e Responsabilidade****TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE**

Nós, Amanda Jacobson Seba (doutoranda) e Fátima da Conceição Silva, orientadora do projeto de pesquisa intitulado “INVESTIGAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS FENÔMENOS DE REGULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE *IN SITU* NA APRESENTAÇÃO CLÍNICA E EVOLUÇÃO DA ESPOROTRICOSE”, nos comprometemos manter a confidencialidade assim como a privacidade dos participantes do projeto.

As identidades dos participantes, assim como os resultados obtidos com este projeto, serão mantidas em um banco de dados sob a responsabilidade das orientadoras.

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, 02 de agosto de 2017.

---

Amanda Jacobson Seba

---

Fátima da Conceição Silva

**ANEXO 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido****Termo de Consentimento Livre e Esclarecido****INSTITUIÇÃO: INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS – FIOCRUZ****COORDENADOR DA PESQUISA: ARMANDO DE OLIVEIRA SCHUBACH****ENDEREÇO:** Av. Brasil 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - CEP 21040-900**TELEFONES** (0xx21) 3865-9525 / 3865-9609 / FAX (0xx21) 3865-9541**NOME DO PROJETO DE PESQUISA:** ESTUDO PARA A SISTEMATIZAÇÃO DO ATENDIMENTO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO CENTRO DE REFERÊNCIA EM LTA - INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS - FIOCRUZ**NOME DO VOLUNTÁRIO:** \_\_\_\_\_

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença que atinge seres humanos e animais, incluindo o cão, causada por parasitos chamados Leishmanias. A doença é transmitida pelo "mosquito palha", que vive em regiões de mata, plantações de banana, manga etc. localizadas próximas às moradias humanas, onde costuma entrar para se alimentar de sangue de pessoas e animais domésticos. A LTA se apresenta como feridas na pele de difícil cicatrização. Algumas vezes, a LTA pode se tornar mais grave, envolvendo as mucosas de revestimento interno do nariz e da garganta, mesmo vários anos após a cicatrização da ferida na pele. Atualmente, não temos como saber qual paciente adoecerá de novo e qual permanecerá curado definitivamente.

Outras doenças como infecções por bactérias, tuberculose, sífilis, esporotricose, outras micoses, tumores etc. podem se manifestar de forma parecida com a leishmaniose e precisam ser diferenciadas para que se possa iniciar o tratamento correto. Entretanto, com os exames existentes atualmente, nem sempre se consegue ter certeza absoluta sobre qual a doença em questão.

No momento, várias perguntas precisam ser respondidas como: de que outras maneiras a LTA pode se manifestar? Como se comportam os exames de laboratório antes, durante e após o tratamento? Quais pacientes, mesmo após o tratamento, irão reabrir suas cicatrizes ou irão desenvolver doença dentro do nariz ou na garganta? Que outras doenças parecidas estão sendo confundidas com a LTA e quais exames devem ser utilizados para esclarecimento? Qual o papel dos seres humanos como reservatórios da doença? Quais as melhores formas de tratamento? Que medidas devem ser tomadas para controlar o problema?

Pelo presente documento, você está sendo convidado (a) a participar de uma investigação clínica a ser realizada no IPEC-Fiocruz, com os seguintes objetivos: Descrever aspectos da LTA: manifestações clínicas e exames de laboratório, tentando estabelecer padrões de apresentação da doença e seu modo de evolução, comparando com outras doenças.

Avaliar o uso dos antimoniais e outras drogas utilizadas no tratamento da LTA levando em consideração o tempo de tratamento, toxicidade, facilidade de administração, custo e ausência de envolvimento das mucosas do nariz e da garganta.

Isolar, identificar e comparar as leishmanias causadoras da LTA provenientes de diversas localidades.

Este documento procura esclarecê-lo sobre o problema de saúde em estudo e sobre a pesquisa que será realizada, prestando informações, detalhando os procedimentos e exames, benefícios, inconvenientes e riscos potenciais.

A sua participação neste estudo é voluntária. Você poderá recusar-se a participar de uma ou todas as etapas da pesquisa ou, mesmo, se retirar dela a qualquer momento, sem que este fato lhe venha causar qualquer constrangimento ou penalidade por parte da Instituição. O seu atendimento médico não será prejudicado caso você decida não participar ou caso decida sair do estudo já iniciado. Os seus médicos poderão também interromper a sua participação a qualquer momento, se julgarem conveniente para a sua saúde.

A sua participação com relação ao Projeto consiste em autorizar a realização de uma série de exames para o diagnóstico da sua doença, e que parte deste material, assim como os resultados destes exames de rotina, sejam utilizados neste estudo. Também será necessária a sua autorização: 1) para a utilização de documentação fotográfica ou filmagem de suas lesões para estudo 2) para que parte do material coletado periodicamente para a realização de exames para acompanhamento da evolução da sua doença, assim como os resultados destes exames de rotina e do seu tratamento sejam utilizados neste estudo 3) para que parte das amostras coletadas seja estocada a fim de servir para outros estudos que tenham como finalidade a melhor compreensão da doença, o desenvolvimento e avaliação de novos métodos diagnósticos; avaliação da resposta ao tratamento etc., desde que tal estudo seja previamente analisado e autorizado por um Comitê de Ética em Pesquisa.

Os exames e procedimentos aplicados lhe serão gratuitos. Você receberá todos os cuidados médicos adequados para a sua doença.

Participando deste estudo você terá algumas responsabilidades: seguir as instruções do seu médico; comparecer à unidade de saúde nas datas marcadas; relatar a seu médico as reações que você apresentar durante o tratamento, tanto positivas quanto negativas.

Caso você necessite de atendimento médico, durante o período em que estiver participando do estudo, procure o Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fiocruz, mesmo fora do seu agendamento. Em caso de necessidade ligue para a Dra Cláudia Maria Valete Rosalino, Dra. Maria Inês Pimentel, Dr. Marcelo Rosandiski Lyra, Dra. Mariza Salgueiro ou Dr. Armando de Oliveira Schubach nos telefones acima. Caso você apresente qualquer quadro clínico que necessite de internação, a equipe médica providenciará seu leito no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fiocruz.

Sua identidade será mantida como informação confidencial. Os resultados do estudo poderão ser publicados sem revelar a sua identidade e suas imagens

poderão ser divulgadas desde que você não possa ser reconhecido. Entretanto, se necessário, os seus registros médicos estarão disponíveis para consulta para a equipe envolvida no estudo, para o Comitê de Ética em Pesquisa, para as Autoridades Sanitárias e para você.

Você pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessárias antes de concordar em participar do estudo, assim como a qualquer momento durante o tratamento. O seu médico deverá oferecer todas as informações necessárias relacionadas à sua saúde, aos seus direitos, e a eventuais riscos e benefícios relacionados à sua participação neste estudo.

### **Procedimentos, exames e testes que serão utilizados:**

Antes do tratamento haverá coleta de informações sobre a doença; exame médico geral e exame da pele com descrição e documentação fotográfica ou filmagem das lesões; exame interno do nariz e da garganta com um aparelho chamado fibra ótica, que permite ver lesões pequenas ou em locais de difícil acesso, para descrição e documentação fotográfica ou filmagem das lesões (se necessário será aplicado "spray" anestésico local). Retirada, com anestesia local, de um pequeno fragmento de "íngua", de pele ou de mucosa (lesadas ou aparentemente saudáveis) para realização de exames tanto para diagnóstico (aspecto microscópico do tecido e culturas para tentativa de isolamento de possíveis agentes de doença como fungos, bactérias e leishmanias) quanto para pesquisa (identificação de células e outros componentes da resposta inflamatória, assim como novos métodos de identificação dos possíveis agentes da doença). Outros materiais também poderão ser coletados na tentativa de isolamento do agente causador da doença: aspiração com seringa e agulha ou escarificação com lâmina de bisturi do bordo da lesão e de secreções em lesões de pele fechadas.

Outros exames também serão realizados para diagnosticar outras doenças possíveis de serem confundidas com a LTA, para classificar a gravidade da doença e avaliar os efeitos dos medicamentos a serem utilizados durante o seu tratamento: um a quatro testes cutâneos (injeção da décima parte de um mililitro de um reativo para determinada doença na pele da região anterior do antebraço, a qual deverá ser revista entre 2 a 3 dias após a injeção); exames de sangue (quantidade equivalente a aproximadamente três colheres de sopa), exame de saliva (coletada com um tipo de cotonete), radiografia dos pulmões e da face (se necessário complementada por tomografia computadorizada); exames da audição e do equilíbrio (se necessários); exames fonoaudiológicos para testar motricidade oral, fala e deglutição (se necessários); exame odontológico (se necessário); acompanhamento fonoaudiológico (se necessário); avaliação nutricional e dietética (se necessário); e eletrocardiograma.

O tratamento da LTA em pacientes humanos costuma ser com o medicamento glucantime por via intramuscular (IM), intravenosa (IV) uma injeção ao dia, geralmente, durante um período de 30 dias contínuos ou com intervalos de descanso. Excepcionalmente, para idosos, pacientes com doenças graves ou que não tolerem o tratamento normal, poderá ser utilizada a via intralesional (IL). O tempo do tratamento poderá ser diminuído ou aumentado conforme a necessidade. Outras opções de tratamento são a anfotericina B (IV) e a pentamidina (IM), ambas injetáveis e necessitando medidas de acompanhamento parecidas com as do glucantime.

Após o início do tratamento, você deverá comparecer a aproximadamente três consultas dentro de 10, 20 e 30 dias. Caso as lesões não cicatrizem totalmente, o tratamento poderá ser continuado pelo período de tempo necessário. Ao se atingir a cura clínica, você deverá retornar para consulta de reavaliação em 1, 3, 6, 9 e 12 meses após o término do tratamento. E, a partir de então, pelo menos uma vez por ano durante um prazo indefinido (no mínimo 5 anos).

A cada retorno deverão ser realizados avaliação médica e exames de sangue (na quantidade aproximada de uma ou duas colheres de sopa) para avaliar os efeitos dos medicamentos utilizados no seu tratamento e/ou para avaliar a evolução da doença. Outros exames, como o eletrocardiograma durante o tratamento, poderão ser realizados quando indicados.

### **Inconvenientes e riscos principais conhecidos até os dias atuais:**

A coleta de sangue poderá causar alguma dor no momento da punção venosa e, eventualmente, poderá haver a formação de uma área arroxeadada no local, que voltará ao normal dentro de alguns dias.

Ocasionalmente, os testes na pele poderão apresentar uma reação forte com inflamação do local, formação de bolhas e, mais raramente, formação de ferida. Todo o processo costuma regredir dentro de alguns dias a poucas semanas.

Tanto os testes na pele quanto o anestésico injetado no momento da biópsia (retirada de um pequeno fragmento de pele para exame) poderão causar alergia, geralmente limitada ao aparecimento de áreas vermelhas, empoladas e com coceira na pele e que respondem bem a medicamentos anti-alérgicos. Mais raramente poderá haver uma reação mais severa com dificuldade de respirar e necessidade de cuidados mais intensos, existentes no IPEC.

No local da biópsia poderá ocorrer inflamação e dor, acompanhados ou não de infecção por bactérias. Caso isso ocorra, poderá ser necessário o uso de medicamentos para dor e antibióticos.

Os medicamentos glucantime e pentamidina costumam causar efeitos indesejáveis, não devem ser utilizados na gravidez e seu uso em mulheres em idade reprodutiva deve ser acompanhado de uso de método anticoncepcional eficaz como preservativo de látex masculino ou feminino ("camisinha"), diafragma feminino ou anticoncepcional oral ("pílula"). Quando o tratamento não puder ser adiado, a anfotericina B poderá ser utilizada na gravidez. Os exames com raios-x também não devem ser realizados em grávidas.

### **Formas de ressarcimento:**

Sempre que necessário, nos dias de seu atendimento, poderá ser fornecida alimentação conforme rotina do Serviço de Nutrição e Serviço social do IPEC para pacientes externos.

### **Benefícios esperados:**

Espera-se que, ao final do tratamento, você esteja curado da LTA, embora as consultas de retorno por vários anos após o tratamento sejam necessárias para a confirmação da cura. Os resultados deste estudo poderão ou não beneficiá-lo diretamente, mas no futuro, poderão beneficiar outras pessoas, pois espera-se também que este estudo contribua para que o diagnóstico e acompanhamento

do tratamento de pacientes com LTA possa ser feito de forma mais eficaz e segura.

Caso a sua investigação demonstre outro diagnóstico diferente de LTA, você será devidamente orientado a buscar o tratamento mais adequado para o seu caso.

Declaro que li e entendi todas as informações referentes a este estudo e que todas as minhas perguntas foram adequadamente respondidas pela equipe médica, a qual estará à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver dúvidas.

Recebi uma cópia deste termo de consentimento e pelo presente consinto, voluntariamente, em participar deste estudo de pesquisa.

---

Nome paciente:

---

Data

---

Nome médico:

---

Data

---

Data

---

Nome testemunha<sup>2</sup>:

---

Data

2. Apenas no caso de pacientes impossibilitados de manifestar o seu consentimento por escrito.

No caso de menores de 18 anos, deverá ser assinado pelo pai, mãe ou responsável legal.

**Anexo 3: Carta de aprovação enviada pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas/ Fundação Oswaldo Cruz (INI/ FIOCRUZ)**

Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz Instituto Nacional de Infectologia  
Evandro Chagas Evandro Chagas



Rio de Janeiro, 13 de fevereiro de 2017

Do: Comitê de Ética em Pesquisa  
Para: Dra. Fátima da Conceição-Silva

Prezada Dra. Fátima,

O projeto "Investigação da influência dos fenômenos de regulação da resposta imune situ na apresentação clínica e na evolução da esporotricose humana", tese de doutorado da aluna Amanda Jacobson Seba, encaminhado a este Comitê em 30/09/2016, é um subprojeto da pesquisa "Influência da resposta imune in situ na evolução de doenças infecto-parasitárias caracterizadas pela presença de reação granulomatosa crônica. Haverá correlação entre a evolução das lesões de esporotricose, leishmaniose, tuberculose, hanseníase e paracoccidiodomicose e o fenômeno inflamatório localizado?" Coordenado por V.Sa, CAAE 014/2001 e aprovado por este Comitê em 27 de agosto de 2001.

Este subprojeto foi apreciado e aprovado por esta Coordenação na presente data.

Atenciosamente,

  
Dra. Lúcia Ferreira Camilla-Caura  
Coordenadora do Comitê  
de Ética em Pesquisa  
Mat. 5042 20370620  
INI / FIOCRUZ