

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CURSO DE MEDICINA

RAUL DE SOUSA RAMOS

Caracterização clínica e da resposta imune celular em pacientes portadores de  
Cromoblastomicose no estado do Maranhão

São Luís  
2016

RAUL DE SOUSA RAMOS

Caracterização clínica e da resposta imune celular em pacientes portadores de Cromoblastomicose no estado do Maranhão

Monografia apresentada ao Curso de Medicina da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Médico, sob orientação da Profa. Dra. Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo.

São Luís  
2016

Caracterização clínica e da resposta imune celular em pacientes portadores de Cromoblastomicose no estado do Maranhão

RAUL DE SOUSA RAMOS

Monografia apresentada ao Curso de Medicina da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Médico, sob orientação da Profa. Dra. Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo.

BANCA EXAMINADORA

---

Professora Doutora Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo  
(Orientadora – Universidade Federal do Maranhão – Departamento de Medicina I)

---

Professora Doutora Flavia Helen Furtado Loureiro  
(Examinadora – Universidade Federal do Maranhão – Departamento de Medicina I)

---

Professora Doutora Ana Cristina Rodrigues Saldanha  
(Examinadora – Universidade Federal do Maranhão – Departamento de Patologia)

---

Professora Doutora Maria dos Remédios Freitas Carvalho Branco  
(Examinadora – Universidade Federal do Maranhão – Departamento de Patologia)

São Luís  
2016

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A cromoblastomicose é uma micose subcutânea de aspecto polimórfico, acometendo a pele e o tecido celular subcutâneo. O principal agente é a *Fonsecaea pedrosoi*. O mecanismo de defesa do hospedeiro na cromoblastomicose não foi totalmente investigado. Alguns estudos se concentraram na interação fungo-hospedeiro, mostrando uma predominante resposta imune mediada por células. Diante da prevalência dessa micose em nosso meio, torna-se importante conhecer a resposta imune dos pacientes portadores dela, no intuito de melhorar a baixa eficácia terapêutica aos tratamentos atuais e obter métodos de imunização capazes de preveni-la. **OBJETIVO:** Avaliar a resposta imune celular em pacientes portadores de cromoblastomicose. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Foram acompanhados 89 pacientes no Centro de Referência em Doenças Infecções Parasitárias (CREDIP), com diagnóstico de cromoblastomicose por exame direto, cultura e histopatológico. Realizou-se a quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17A por kit citocinas Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17. **RESULTADOS:** Observou-se que a maioria dos pacientes era do gênero masculino [79 pacientes (88,76 %)]; com idade média ao diagnóstico de 58,1 anos (variando entre 33 e 87 anos) e desvio padrão de 11,49. Com relação à idade média por gravidade de doença, esta representou 54,45 anos na forma leve; 55,63 anos na moderada e 60,16 anos na grave. A maioria apresentava, ao diagnóstico, doença moderada ou grave (75,3%). Dos pacientes com a forma leve, IL-6 foi identificada em 22 pacientes, IL-10 em 15, INF- $\gamma$  em 3 e TNF- $\alpha$  em 1. Naqueles com a forma moderada, IL-6 foi identificada em 34 pacientes, IL-10 em 18, INF- $\gamma$  em 5 e TNF- $\alpha$  em 13. Naqueles com a forma grave, IL-6 foi identificada em 31 pacientes, IL-10 em 12, INF- $\gamma$  em 5 e TNF- $\alpha$  em 9. **CONCLUSÃO:** O fato de IL-6 e TNF- $\alpha$ , marcadores de fase aguda, estarem presentes em elevadas titulações em pacientes com as formas moderada e grave, infere uma atividade pró-inflamatória intensa em todos os estágios da doença, denotando seu caráter recidivante. A associação do padrão Th1 com formas mais leves da doença e do padrão Th2 com formas graves foi novamente observada, enquanto a resposta Th17, característica de pacientes com infecções crônicas não foi evidenciada nesta casuística.

**Palavras-chave:** Cromoblastomicose. Imunologia. Citocinas.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Chromoblastomycosis is a subcutaneous mycosis with polymorphic aspect, affecting the skin and subcutaneous tissue. The main agent is *Fonsecaea pedrosoi*. The host defense mechanism in Chromoblastomycosis has not been fully investigated. Some studies have focused on the fungus-host interaction, showing a predominant cell-mediated immune response. Given the prevalence of this mycosis in our midst, it is important to know the immune response of patients with it, in order to improve the low therapeutic efficacy to current treatments and get immunization methods to prevent it. **OBJECTIVE:** to evaluate the cellular immune response in patients with chromoblastomycosis. **MATERIALS AND METHODS:** 89 patients were followed up at the Reference Center for Infectious and Parasitic diseases, diagnosed with chromoblastomycosis by direct examination, culture and histopathology. The quantification of cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-17A was done by cytokines kit Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17. **RESULTS:** we observed that most patients were male [79 patients (88,76%)]; mean age at diagnosis of 58,1 years (range 33 to 87 years) and standard deviation of 11,49. The average age by disease severity represented 54,45 years in mild form; 55,63 years in moderate form and 60,16 years in severe form. Most had at diagnosis moderate or severe disease (75,3%). In the patients with mild form, IL-6 was observed in 22 patients, IL-10 in 15 patients, IFN- $\gamma$  in 3 patients and TNF- $\alpha$  in 1 patient. In those with moderate form, IL-6 was identified in 34 patients, IL-10 in 18 patients, INF- $\gamma$  in 5 patients and TNF- $\alpha$  in 13 patients. In those with severe form, IL-6 was observed in 31 patients, IL-10 in 12 patients, INF- $\gamma$  in 5 patients and TNF- $\alpha$  in 9 patients. **CONCLUSION:** The fact that IL-6 and TNF- $\alpha$ , acute phase markers, have been observed in high titers in patients with moderate and severe forms infers a strong pro-inflammatory activity at all disease' stage, demonstrating its recurrent character. The association of Th1 pattern with milder forms of disease Th2 pattern with severe forms was again observed, while the Th17 response, characteristic of patients with chronic infections was not found in this series.

**KEYWORDS:** Chromoblastomycosis. Immunology. Cytokines.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1.1. Resposta Imune na Cromoblastomicose</b> .....	4
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	6
<b>3. RESULTADOS</b> .....	7
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	9
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	12
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	13
<b>APÊNDICE A - FICHA PROTOCOLO</b> .....	18
<b>APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO</b> .....	20

## 1. INTRODUÇÃO

A cromoblastomicose (CBM) é uma micose subcutânea crônica, granulomatosa, supurativa causada por fungos filamentosos, dimórficos, pertencentes à família *Herpotrichiellaceae* (*Dematiaceae*) (LOPEZ MARTINEZ e MENDEZ TOVAR, 2007). Estes fungos têm como característica comum a deposição de melanina na parede celular e nas vesículas intracelulares (FRANZEN et al., 2008) e uma grande variedade está relacionada com a CBM, sendo o *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladophialophora carrionii* as espécies isoladas com maior frequência (BONIFAZ, CARRASCO-GERARD e SAUL, 2001; MINOTTO et al., 2001; PEREZ-BLANCO et al., 2006; SCHELL, ESTERRE e TOPLEY, 2006).

A CBM tem distribuição mundial, sendo prevalente em países de clima tropical e subtropical, como África do Sul, Costa Rica, Brasil e Madagascar (LOPEZ MARTINEZ e MENDEZ TOVAR, 2007). No continente americano também foram diagnosticados casos nos seguintes países: Colômbia, Equador, México, Cuba, República Dominicana e Venezuela (BONIFAZ, CARRASCO-GERARD e SAUL, 2001). Embora apresentem características climáticas semelhantes, os países do continente asiático registram baixos índices da doença, sendo a maioria dos casos observados na China, Japão, Índia e Sri Lanka (XI et al., 2009). Um número reduzido de casos tem sido descrito na Europa e nos Estados Unidos (LOPEZ MARTINEZ e MENDEZ TOVAR, 2007). No Brasil, segundo Queiroz-Telles et al. (2016, no prelo), a CBM é considerada endêmica nos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, São Paulo, região amazônica e Maranhão. A incidência média anual, relatada por esse estudo, no Brasil foi de 6,4 / ano (71 casos / 11 anos) para o estado do Paraná (região Sul); 5,9 / ano (325 casos / 55 anos) para o Pará (Região Norte); 4,3 / ano (13 casos / 3 anos) para o Maranhão (região Nordeste); e de 2,6 / ano (73 casos / 28 anos) para o Rio Grande do Sul (região Sul).

A CBM não é uma doença de notificação obrigatória. Desta forma, todos os dados epidemiológicos são derivados de relatos de casos publicados e inquiridos. As taxas de incidência variam de 1:6.800 habitantes (14/100.000 hab.) em Madagascar até 1:8.625.000 habitantes (0,012/100.000 hab.) nos EUA. No Brasil, estima-se uma prevalência de 3/100.000 habitantes (QUEIROZ-TELLES et al., 2011).

Geralmente a CBM desenvolve-se após a inoculação transcutânea de propágulos fúngicos (fragmentos de hifas, conídeos e células conidiogênicas), em decorrência de traumas

por fragmentos vegetais contaminados, como espinhos e lascas de madeira (ESTERRE e QUEIROZ-TELLES, 2006). O local acometido na maioria das vezes é a extremidade dos membros inferiores, seguido de membros superiores, região glútea, tronco e face. A ocupação desempenha um papel importante, acometendo, principalmente, trabalhadores rurais, lenhadores ou fornecedores de produtos agrícolas. Raramente ocorre antes da adolescência, com a maioria dos pacientes no grupo etário entre 40 a 50 anos de idade, com uma relação homem-mulher de 5:1 e 9:1 reportada (LOPEZ MARTINEZ e MENDEZ TOVAR, 2007; SANTOS et al., 2007). Em área endêmica localizada no estado do Maranhão, nas franjas da floresta amazônica no Brasil, uma fonte potencialmente importante de infecção foi relatada: milhares de famílias estão envolvidas na colheita de babaçu (*Orbignya phalerata*), uma palmeira selvagem. Como os fungos melanizados foram isolados a partir de fragmentos de casca de babaçu, este pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de CBM em centenas de pessoas após o trauma que ocorre no trabalho, nesta região (MARQUES et al., 2006).

Uma vez instalado no tecido, o fungo se adere às células epiteliais e se diferencia em estruturas parasitárias características, denominadas células muriformes, as quais resistem à destruição pelas células efectoras do hospedeiro favorecendo assim o estabelecimento crônico da doença (GIMENES et al., 2006; QUEIROZ-TELLES et al., 2009). A lesão inicial da CBM aparece no local da inoculação, podendo começar como uma lesão macular solitária, progredir para uma pápula elevada, com superfície lisa rosa, e aumentar gradualmente ao longo de algumas semanas até que se torne escamosa (BONIFAZ, CARRASCO-GERARD e SAUL, 2001; QUEIROZ-TELLES, 2015). A evolução pode ser para diversos tipos clínicos: nodular, tumoral (couve-flor), verrucosa ou cicatricial. Em casos avançados e graves, mais de um tipo de lesão pode ser observado no mesmo paciente.

O polimorfismo lesional da CBM leva a vários diagnósticos diferenciais, incluindo doenças infecciosas e não infecciosas, causando atraso no diagnóstico, redução de resposta terapêutica e perda de movimentação do membro acometido (QUEIROZ-TELLES, 2015). No início, as lesões são assintomáticas, e, geralmente, não interferem nas atividades do paciente. Ao longo do tempo, o prurido se torna o sintoma predominante da doença, sendo intenso nas formas moderadas e pode ser acompanhado de dor local. A disseminação da doença pode ocorrer por auto-inoculação, ou por disseminação linfática ou contígua. À medida que aumenta a gravidade, edema e infecções bacterianas secundárias afetam a saúde do doente, modificando a aparência da pele, causando cicatrizes, e, em casos extremos, gera linfedema crônico e anquilose. Outra complicação grave já relatada é a evolução para carcinoma de

células escamosas não-invasivo. Todas estas complicações podem levar à incapacidade definitiva ou à morte (AZEVEDO et al., 2015).

Macroscopicamente a lesão da CBM pode ser classificada em leve, moderada e grave (QUEIROZ-TELLES et al., 1996). O diagnóstico da CBM é baseado principalmente na suspeita clínica e epidemiológica, mas deve ser confirmado por demonstração microbiológica dos agentes etiológicos em amostras clínicas. Biópsias de pele ou raspados da lesão devem ser realizadas, principalmente onde "pontos pretos" são visíveis. Quando examinadas sob microscopia ótica, são observadas as "células muriformes", patognômicas desta doença. Estas estruturas em formato de castanha, arredondadas, com pigmento marrom e câmaras transversais são distintas e têm sido referidas como "corpos escleróticos, células fumagóides ou moedas de cobre" (QUEIROZ-TELLES, 2015) e são consideradas uma adaptação biológica, permitindo que o agente etiológico sobreviva no ambiente hostil do tecido hospedeiro (MATSUMOTO et al., 1993). Histologicamente, a CBM normalmente revela hiperplasia pseudo-epidérmica epiteliomatosa, hiperkeratose, acantose irregular, alternando com áreas de atrofia e coleção de células inflamatórias formando abscessos epidérmicos. Reação granulomatosa com diferentes graus de fibrose pode ser encontrada no nível dérmico. Células muriformes podem ser observadas entre estas estruturas ou dentro de células de Langerhans gigantes. Quando cultivados, todos os agentes da CBM crescem lentamente em cultura. Inicialmente, as colônias são verde-escuras, descrevendo um aspecto escuro de veludo com o tempo. A identificação presuntiva de espécies pode ser conseguida por métodos micológicos morfológicos, mas técnicas moleculares são sugeridas para a identificação definitiva (DE HOOG et al., 2004).

As lesões de cromoblastomicose são recalcitrantes ou muito difíceis de tratar. Se não forem descobertas precocemente, quando as lesões iniciais podem ser removidas cirurgicamente, longos períodos de tratamento antifúngico sistêmico isolado ou em combinação com vários métodos físicos, é a regra para muitos pacientes. A eficácia da terapia pode ser relacionada com a gravidade e a duração da doença, com o agente etiológico e com a adesão do paciente. Como ensaios comparativos sobre esta doença são escassos, provas que ajudam a selecionar a melhor terapia são baseadas em alguns estudos clínicos abertos e opinião de especialistas. Nenhuma terapia "padrão-ouro" para CBM está disponível, mas as opções de tratamento incluem antifúngicos sistêmicos, como monoterapia ou combinados, métodos físicos e adjuvantes imunitários (QUEIROZ-TELLES, 2015).

Assim, admite-se que os medicamentos mais utilizados são o itraconazol e terbinafina, nas doses diárias de 200-400mg e 250-500mg, respectivamente (BONIFAZ et al., 2005). Nos casos refratários, a combinação das duas drogas pode ser tentada (QUEIROZ-TELLES e SANTOS, 2013). Outros tratamentos eficazes incluem posaconazol, 800mg/dia, e a combinação de itraconazol com 5-flucitosina (NEGRONI et al., 2005; GARNICA, NUCCI e QUEIROZ-TELLES, 2009; ANTONELLO et al., 2010). A duração do tratamento deve ser baseada em critérios clínicos, micológicos e histopatológicos. De acordo com dados publicados, taxas de cura com terbinafina ou itraconazol variam de 15 a 80%, dependendo da gravidade da doença. Como esperado, nas formas graves as taxas de cura são mais baixas e as recaídas são mais comuns (GARNICA, NUCCI e QUEIROZ-TELLES, 2009; QUEIROZ-TELLES, 2015).

### **1.1. Resposta Imune na Cromoblastomicose**

A resposta imune na CBM ainda não foi completamente elucidada. Sabe-se que ocorre reação inflamatória granulomatosa, com recrutamento de células envolvidas na resposta inata para o local da infecção, sobretudo neutrófilos polimorfonucleares, macrófagos e monócitos, que são os principais fagócitos que englobam e digerem o fungo. Os neutrófilos eliminam as células fúngicas pela produção de reativos intermediários do oxigênio, mieloperoxidase ou outros componentes secretados que recrutam e regulam a resposta inflamatória de outras células como os macrófagos, células T e neutrófilos inativos, fagocitando e destruindo o patógeno ou, simplesmente, criando uma cápsula de retenção para este organismo: o processo cicatricial fibrótico. Existem evidências de que componentes da parede celular do fungo como a melanina, possam diminuir a eficiência do macrófago em destruir o fungo, pela inibição da produção de óxido nítrico (ROZENTAL, ALVIANO e DE SOUZA, 1994; FARBIARZ et al., 1992; BOCCA, BRITO E FIGUEIREDO, 2006).

Um estudo recente determinou a relação entre a produção de citocinas *in vitro* e a proliferação de linfócitos em pacientes com diferentes formas clínicas de CBM, demonstrando a presença de dois polos: formas leves apresentam níveis de INF- $\gamma$  aumentado, níveis de IL-10 reduzidos e uma proliferação linfocitária eficiente; (GIMENES et al., 2005) e formas graves apresentam índices diminuídos de INF- $\gamma$ , elevados de IL-10 e linfoproliferação prejudicada. Esta capacidade do patógeno em estimular os macrófagos de formas distintas

determina se as células irão desenvolver uma resposta do tipo Th1 ou Th2 (SOUSA et al., 2008). Geralmente, a imunidade mediada por células do tipo Th1 é requerida para o combate a infecções intracelulares, enquanto a imunidade do tipo Th2 resulta em suscetibilidade a estas infecções (ALTAMURA et al., 2001).

Diversos estudos têm sido realizados no intuito de esclarecer as diferenças que o organismo humano faz entre o padrão de resposta Th1/Th2. Sabe-se que há um subgrupo de linfócitos T capaz de articular a resposta imune frente aos patógenos, alérgenos e antígenos próprios e que também faz parte da tolerância imunológica. Essa linhagem foi denominada células T reguladoras (Treg) e são caracterizadas pela expressão de níveis elevados de CD25 (cadeia alfa da IL-2) com a função de controlar a resposta imunológica, bloqueando a ativação ou função das células T efetoras, dependente do fator de transcrição Foxp3 (CAMPBELL e ZIEGLER, 2007; SOJKA, HUANG E FOWELL, 2008; PICIRILLO, 2008).

O TGF- $\beta$ , citocina de grande valor para a resposta imune, quando em altas concentrações, e na ausência de citocinas pró-inflamatórias, direciona o organismo a desenvolver uma resposta reguladora mediada por células T. De modo análogo, baixas concentrações de TGF- $\beta$  associadas às citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-21 e IL-23) promovem a expressão do receptor de IL-23, o que favorece a diferenciação de células TCD4 em Th17 (MANGAN et al., 2006). Essa compreende uma subpopulação de células TCD4+ caracterizada pela secreção de IL-17 que parece reforçar a proteção do hospedeiro quando as cascatas imunes dos perfis Th1 e Th2 não são altamente eficazes frente a patógenos intracelulares. Alvo de estudos recentes, essas células parecem ser protagonistas em quadros inflamatórios crônicos (WEAVER et al., 2007; DI CESARE, DI MEGLIO E NESTLE, 2009).

Diante da prevalência e importância dessa patologia em nosso meio, torna-se importante conhecer o comportamento da resposta imune celular dos pacientes no intuito de contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na progressão e cura desta patologia. O objetivo deste trabalho é avaliar a resposta inflamatória apresentada pelos pacientes com CBM, relacionando à gravidade das lesões, a fim de oferecer subsídios para o desenvolvimento de novas terapias e melhor compreensão dos efeitos do fungo no hospedeiro ao longo da história natural da doença.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Estudo transversal e descritivo. A amostra, de conveniência, foi constituída por 89 pacientes com diagnóstico de CBM em acompanhamento no ambulatório especializado em doenças infectoparasitárias (CREDIP) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) que assinaram o TCLE (Apêndice B).

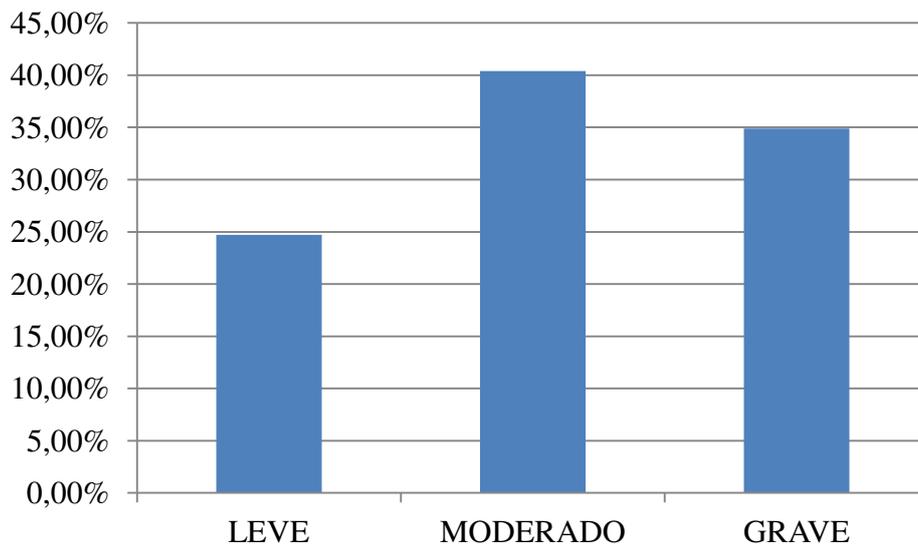
Para a quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL -17A foi coletada amostra de 10ml de sangue e utilizada a técnica de CBA, ensaio citométrico de esferas ordenadas. Todos os reagentes utilizados foram provenientes do Kit (Human Th1/Th2/Th17 cytokine Kit) obtidos da Becton Dickinson Biosciences (San Jose, CA, USA). Os plasmas foram centrifugados à 1500rcf por 10 minutos à temperatura ambiente para precipitação de debris. Em cada poço da placa de 96 poços, fundo U, foram adicionados 25 $\mu$ L da amostra padrão fornecida pelo fabricante ou dos plasmas a serem testados. Em seguida receberam 25 $\mu$ L de cada reagente “cytokinebeads” para marcar a produção de cada citocina e 25 $\mu$ L de anticorpo conjugado ao fluorocromo PE. Os poços foram homogeneizados e incubados à temperatura ambiente por 3 horas protegidos da luz. Após o período de incubação as amostras foram ressuspensas com 300 $\mu$ L de solução tampão. A placa foi centrifugada por 10 minutos a 453rcf e o sobrenadante foi descartado. As amostras foram então ressuspensas em 150 $\mu$ L de solução tampão para leitura no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Após a leitura dos padrões e das amostras, os dados foram analisados no software FCAP ARRAY Versão 3.0 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), onde os valores foram expressos em pg/mL para cada citocina.

As variáveis coletadas foram idade, gênero e gravidade da doença selecionadas de uma ficha protocolo usada como padrão nos atendimentos do ambulatório (Apêndice A). As lesões foram classificadas em leve, moderada e grave, segundo os critérios estabelecidos por Queiroz-Telles (1996). A análise dos dados foi realizada no Microsoft Excel 2007 e Graphpad Prism5 e as variáveis apresentadas em média, desvio padrão e frequência percentual. A pesquisa segue a Resolução 466/12 do CNS e foi aprovada pelo CEP do HUUFMA sob parecer nº 1276.342.

### 3. RESULTADOS

Por meio da análise de 89 pacientes com diagnóstico de CBM, observou-se que a maioria era do gênero masculino [79 pacientes (88,76 %)]; com idade média ao diagnóstico de 58,1 anos (variando entre 33 e 87 anos) e desvio padrão de 11,49. Com relação à idade média por gravidade de doença, esta representou 54,45 anos na forma leve; 55,63 anos na moderada e 60,16 anos na grave. A maioria apresentava, ao diagnóstico, doença moderada ou grave (75,3%), como mostra a figura 1.

**Figura 1. Gravidade das lesões de cromoblastomicose em 89 pacientes, submetidos à dosagem de citocinas, São Luís, MA, 2016.**



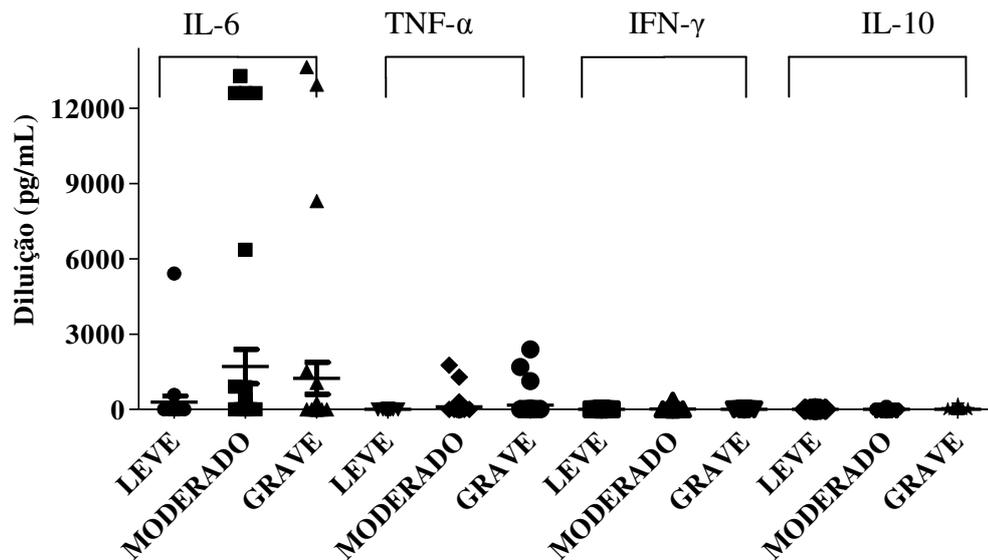
Quantificaram-se as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  e IL-17A. As citocinas IL-2, IL-4 e IL-17A não foram detectáveis na amostra.

Dos pacientes com a forma leve, IL-6 foi identificada em 22 pacientes, IL-10 em 15, INF- $\gamma$  em 3 e TNF- $\alpha$  em 1. Naqueles com a forma moderada, IL-6 foi identificada em 34 pacientes, IL-10 em 18, INF- $\gamma$  em 5 e TNF- $\alpha$  em 13. Naqueles com a forma grave, IL-6 foi identificada em 31 pacientes, IL-10 em 12, INF- $\gamma$  em 5 e TNF- $\alpha$  em 9. As porcentagens de pacientes em que foram identificadas essas citocinas, o valor médio e o desvio padrão por gravidade encontram-se na tabela. A figura 2 mostra as titulações de IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  em pg/mL encontradas nos pacientes analisados, mostrando significância estatística em tais citocinas, quando comparadas as gravidades.

**Tabela. Distribuição das dosagens de citocinas, com média e desvio padrão em 89 pacientes de acordo com a gravidade da doença.**

CITOCINAS/ GRAVIDADE	LEVE			MODERADO			GRAVE		
	MÉDIA	DP	%	MÉDIA	DP	%	MÉDIA	DP	%
IL-6	286,7	1153,05	100	1710	4109,58	94,4	1238	3554,3	100
IL-10	3,43	6,39	68,18	7,361	21,25	50	8,08	34,07	38,7
IFN- $\gamma$	2,86	8,1	13,63	13,25	59,31	13,8	0,27	1,04	16,12
TNF- $\alpha$	0,82	3,85	4,5	103,2	359,1	36,11	171,5	547	29,03

**DP: Desvio padrão.**



**Figura 2. Distribuição da titulação de IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 em pg/mL no soro de pacientes com cromoblastomicose, de acordo com a gravidade ( $p < 0,0001$ ). A barra horizontal representa a média.**

#### 4. DISCUSSÃO

Os dados do estudo apontam que dos 89 pacientes analisados, a maioria apresentava doença moderada e grave, estando isso de acordo com Gimenes et al. (2005), que analisando 29 pacientes portadores de CBM, mostrou que 23 estavam com doença moderada e grave. Igual observação foi feita por Sousa et al. (2008) e Sousa et al. (2009). A maioria da amostra é composta por homens, com idade média de 56,7 anos (33 a 87 anos), estando essas observações de acordo com a literatura, pois no mesmo estudo de Gimenes et al. (2005), os autores relatam maior prevalência em homens, com idades que variavam de 33 a 92 anos. Ainda analisando sexo e idade mais prevalentes, em estudos de Sousa et al. (2008) e Sousa et al. (2009), também encontraram maior prevalência em homens, com idades entre 40 e 92 anos.

Na análise das citocinas, observou-se que a média e a porcentagem destas na amostra foram de 1193,74 pg/mL e 97,75% para IL-6; 6,64 pg/mL e 50,56% para IL-10; 6,16 e 14,6% para IFN- $\gamma$  e 101,69 pg/mL e 25,84% para TNF- $\alpha$ , respectivamente. Vários fatores podem afetar o perfil de citocinas que, por sua vez, influencia a diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> específicas para o antígeno *in vivo*. As citocinas podem ser induzidas por agentes patogênicos modificando o microambiente e iniciando a ativação das células apresentadoras de antígeno (APCs), o que interfere na diferenciação de Th1/Th2 (MURPHY et al., 1998). Nas infecções fúngicas em humanos e nos experimentos animais, a resposta mediada por células é crítica para a defesa do hospedeiro (ROMANI, 2004). Sabe-se que os mecanismos de defesa do hospedeiro influenciam a manifestação e gravidade das infecções fúngicas, por conseguinte, as formas clínicas de doença dependem da resposta imunológica do paciente (MARR, PATTERSON e DENNING, 2002; FIDEL e SOBEL, 1994; PUCETTI, ROMANI e BISTONI, 1995). Os mecanismos de defesa do hospedeiro contra fungos são numerosos, e derivam de mecanismos de proteção que estavam presentes no início da evolução da doença. Assumindo que os efetores da resposta imune são determinados pela ativação de ambas subpopulações Th1 e Th2, a identificação das subpopulações de células T, que secretam diferentes perfis de citocinas, contribui para uma melhor compreensão da regulação de respostas efetores imunes na CBM.

No estudo, a IL-6 foi encontrada no sangue da quase totalidade dos pacientes avaliados, com altos títulos dessa citocina nas formas moderada e grave. A IL-6 induz reações de fase aguda, como respostas imunes celulares nas células infectadas e respostas humorais

das mucosas contra reinfecção. Não há estudos na literatura, ao que se sabe, que tenham dosado esta citocina no sangue de pacientes portadores de CBM para fins comparativos.

O TNF- $\alpha$  foi identificado em menos da metade dos pacientes, porém, apresentou titulação elevada em pacientes com as formas moderada (36,11%) e grave (29,03%). Isso vai ao encontro dos achados de Gimenes et al. (2005), que mostraram maior produção de TNF- $\alpha$  apenas na forma grave, porém, sem diferença significativa entre as diversas formas da doença.

D'ávila, Pagliari e Duarte (2003) e Minotto (2009) realizaram estudos da resposta imune na CBM e mostraram que doença moderada, com lesões verrucosas, apresentavam a formação de granuloma micótico com um padrão de resposta Th2 - compatível com a pior resposta contra o fungo - enquanto que lesões do tipo placa, mesmo que graves, são caracterizadas por um padrão Th1 de citocinas e melhor resposta imune. Wang et al. (2013), analisaram eventos sequenciais e mudança na liberação local de citocinas num modelo murino infectado por *Fonsecaea pedrosoi* e sugeriu que TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  agem como fator protetor na CBM, enquanto que IL-4 e IL-10 são reguladores negativos para a cura da infecção. Na avaliação da resposta imune adaptativa, Gimenes et al. (2005) encontraram altos títulos de IL-10 e baixos títulos de IFN- $\gamma$  na forma grave, característicos da resposta Th2 e altos títulos de IFN- $\gamma$  e baixos de IL-10 na forma leve demonstrando compatibilidade com a típica resposta Th1. Resultados, esses, de acordo com o encontrado nesta casuística. A forma moderada apresentou títulos mais altos de IFN- $\gamma$  e IL-10 que as formas grave e leve e caracterizam uma resposta intermediária entre Th1 e Th2.

Em relação a outras doenças fúngicas, estudos imunológicos em pacientes com formas polarizadas de paracoccidiodomicose mostram uma associação entre reatividade baseada em Th1 em formas assintomáticas ou leves de infecção. Em contraste, as respostas de células Th2 se correlacionam com a doença grave. Várias observações clínicas indicam uma relação inversa entre IFN- $\gamma$  e a produção de IL-10 em pacientes com infecções fúngicas. Níveis elevados de IL-10, que afetam negativamente a produção de IFN- $\gamma$ , já foram detectados na doença crônica por *Candida spp.* (ROILIDES et al., 1998), em pacientes com a forma grave de micose endêmica (PERAÇOLI et al, 2003) e, em pacientes neutropênicos com aspergilose (ROILIDES et al., 2001). Polissacarídeos fúngicos são conhecidos por modular negativamente candidíase mucocutânea com produção de IL-10, o que indica que sua produção pode ser consequência de infecção (ROMANI e KAUFMANN, 1998). Pacientes com paracoccidiodomicose disseminada tem defeito na produção de IFN- $\gamma$  e reação de hipersensibilidade tardia (DTH), como encontrado na CBM no estudo de Sousa et al. (2008), associada com o aumento dos níveis de citocinas tipo 2 (IL-4 e IL-5), IgE, IgA e IgG 4.

Eosinofilia, que é um marcador de mau prognóstico em micoses endêmicas, também está presente. Em pacientes com uma via IL-12/IFN- $\gamma$  defeituosa, tal como aqueles com síndrome de hiperglobulinemia E, infecções fúngicas e alergias são observadas com mais frequência (CLEMONS e STEVENS, 2001; NETEA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2002).

## 5. CONCLUSÃO

Este estudo foi importante por ser o primeiro a relatar a real participação da IL-6 na resposta imune de pacientes portadores de cromoblastomicose. O fato de IL-6 e TNF- $\alpha$ , marcadores de fase aguda, estarem presentes em elevadas titulações em pacientes com as formas moderada e grave, infere uma atividade pró-inflamatória intensa em todos os estágios da doença, demonstrando seu caráter recidivante. A associação do padrão Th1 com formas mais leves da doença e do padrão Th2 com formas graves foi novamente observada, enquanto a resposta Th17, característica de pacientes com infecções crônicas não foi observada nesta casuística. O presente estudo, portanto, apresenta dados relevantes sobre a resposta imune na CBM. Ressalta-se que a continuidade de pesquisas nesta área virá a fortalecer e elucidar o conhecimento desta doença, tanto no tratamento, quanto na abordagem dos pacientes.

## REFERÊNCIAS

- ALTAMURA, M.; CASALE, D.; PEPE, M.; TAFARO, A. Immune responses to fungal infections and therapeutic implications. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* 2001; 1:189–197.
- ANTONELLO, V.S.; APPEL DA SILVA, M.C.; CAMBRUZZI, E.; KLIEMANN, D.A.; SANTOS, B.R.; QUEIROZ-TELLES, F. Treatment of severe chromoblastomycosis with itraconazole and 5-flucytosine association. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 2010; 52:329-31.
- AZEVEDO, C.M.; MARQUES, S.G.; SANTOS, D.W.; SILVA, R.R.; SILVA, N.F.; SANTOS, D.A.; RESENDE STOIANOFF, M.A. Squamous cell carcinoma derived from chronic chromoblastomycosis in Brazil. *Clin. Infect. Dis.* 2015 May 15; 60(10):1500-4. doi:10.1093/cid/civ104.
- BOCCA, A.L.; BRITO, P.P.M.S.; FIGUEIREDO, F. et al. *Mycopathologia* (2006) 161: 195. doi:10.1007/s11046-005-0228-6.
- BONIFAZ, A.; CARRASCO-GERARD, E.; SAUL, A. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. *Mycoses.* 2001; 44:1-7.
- BONIFAZ, A.; SAUL, A.; PAREDES-SOLIS, V.; ARAIZA, J.; FIERRO-ARIAS, L. Treatment of chromoblastomycosis with terbinafine: experience with four cases. *J. Dermatolog. Treat.* 2005; 16:47-51.
- CAMPBELL, D.J.; ZIEGLER, S.F. Foxp3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T-cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7(4):305-310.
- CLEMONS, K.; STEVENS, D.A. Overview of host defense mechanisms in systemic mycosis and the basis for immunotherapy. *Semin. Respir. Infect.* 2001; 16:60–66.
- D'ÁVILA, S.C.; PAGLIARI, C.; DUARTE, M.I. The cell-mediated immune reactions in cutaneous lesions of chromoblastomycosis and their correlation with different clinical forms of the disease. *Mycopathologia*, 2003; 156:51–60.
- DE HOOG, G.S.; ATTILI-ANGELIS, D.; VICENTE, V.A.; VAN DEN ENDE, A.H.; QUEIROZ-TELLES, F. Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* species. *Med. Mycol.* 2004; 42:405-16.
- DI CESARE, A.; DI MEGLIO, P.; NESTLE, F.O. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J. Inv. Dermatology*, 2009; 129:1339–1350.
- ESTERRE, P. & QUEIROZ-TELLES, F. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2006; 19:148-52.

FARBIARZ, S.R.; DE CARVALHO, T.U.; ALVIANO, C.; DE SOUZA, W. Inhibitory effect of melanin on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with mammalian cells *in vitro*. *Journal Of Medical And Veterinary Mycology* Vol. 30, Iss. 4, 1992.

FIDEL, P.L. & SOBEL, J.D. The role of cell-mediated immunity in candidiasis. *Trends in Microbiology*. 1994. Volume 2, Issue 6, 202 – 206.

FRANZEN, A.J.; CUNHA, M.M.; MIRANDA, K.; HENTSCHEL, J.; PLATTNER, H.; DA SILVA, M.B.; SALGADO, C.G.; DE SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Ultrastructural characterization of melanosomes of the human pathogenic fungus *Fonsecaea pedrosoi*. *J. Struct. Biol.* 2008; 162:75–84.

GARNICA, M.; NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F. Difficult mycoses of the skin: advances in the epidemiology and management of eumycetoma, phaeohyphomycosis and chromoblastomycosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2009; 22:559-63.

GIMENES, V.M.F. *et al.* Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. *Microbes and Infection*, 2005; Volume 7, Issue 4, Pages 708-713.

GIMENES, V.M.F.; CRIADO, P.R.; MARTINS, J.E.C. *et al.* Cellular immune response of patients with chromoblastomycosis undergoing antifungal therapy. *Mycopathologia* (2006) 162: 97. doi:10.1007/s11046-006-0041-x.

LOPEZ MARTINEZ, R. & MENDEZ TOVAR, L.J. Chromoblastomycosis. *Clin. Dermatol.* 2007; 25:188 – 194.

MANGAN, P.R.; HARRINGTON, L.E.; O'QUINN, D.B.; HELMS, W.S.; BULLARD, D.C.; ELSON, C.O.; HATTON, R.D.; WAHL, S.M.; SCHOEB, T.R.; WEAVER, C.T. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*. 2006; 441:231-34.

MARQUES, S.G.; SILVA, C. DE M.; SALDANHA, P.C.; RESENDE, M.A.; VICENTE, V.A.; QUEIROZ-TELLES, F. *et al.* Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of babassu coconut (*Orbignya phalerata*) in the Amazon region of Maranhão, Brazil. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 2006; 47:305-11.

MARR, K.A.; PATTERSON, T.; DENNING, D. Aspergillosis: Pathogenesis, clinical manifestations, and therapy. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2002; 16:875–894.

MATSUMOTO, T.; MATSUDA, T.; MCGINNIS, M.R.; AJELLO, L. Clinical and mycological spectra of *Wangiella dermatitidis* infections. *Mycoses*. 1993; 36:145-55.

MINOTTO, R. *Respostas polares a infecção pela cromoblastomicose antes e após as terapias*. Porto Alegre, 2009. 111p.

MINOTTO, R.; BERNARDI, C.D.V.; MALLMANN, L.F.; EDELWEISS, M.I.A.; SCROFERNEKER, M.L. Chromoblastomycosis: a review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2001; 44:585-92.

MURPHY, J.W.; BISTONI, F.; DEPPE JR, G.S.; BLASCKSTOCK, R.A.; BUCHANAN, K.; ASHMAN, R.B. Type 1 and type 2 cytokines: from basic science to fungal infections. *Med. Mycol.* 1998; 36:109–118.

NEGRONI, R.; TOBON, A.; BUSTAMANTE, B.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; PATINO, H.; RESTREPO, A. Posaconazole treatment of refractory eumycetoma and chromoblastomycosis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 2005; 47:339-46.

NETEA, M.G.; SCHNEEBERGER, P.M.; DE VRIES, E.; KULLBERG, B.J.; VAN DERMEER, J.W.; KOLLEN, M.L. Th1/Th2 cytokines imbalance in a family with hyper-IgE syndrome. *Neth. J. Med.* 2002; 60:349–353.

OLIVEIRA, S.J.; MAMONI, R.L.; MUSATTI, C.C.; PAPAORDANOU, P.M.O; BLOTTA, M.H.S.L. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls, *Microbes Infect.* 2002; 4:139–144.

PERAÇOLI, M.T.; KUROKAW, C.S.; CALVI, S.A.; MENDES, R.P.; PEREIRA, P.C.; MARQUES, S.A. et al., Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect.* 2003; 5:413–418.

PEREZ-BLANCO, M.; HERNÁNDEZ VALLES, R.; GARCIA-HUMBRIA, L.; YEGRES, F. Chromoblastomycosis in children and adolescents in the endemic area of the Falcon State, Venezuela. *Med. Mycol.* 2006; 44:467-71.

PICIRILLO, C.A. Regulatory T cells in health and disease. *Cytokine*, 2008; 120:395-401.

PUCETTI, P.; ROMANI, L.; BISTONI, F. A th1–th2-like switch in candidiasis: new perspectives for therapy. *Trends Microbiol.* 1995; 3:237–240.

QUEIROZ-TELLES, F. & SANTOS, D.W. Challenges in the therapy of chromoblastomycosis. *Mycopathologia.* 2013; 175:477-88.

QUEIROZ-TELLES, F. A cromoblastomicose no Estado do Paraná: etiologia, epidemiologia, clínica e terapêutica com itraconazol. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v. 30, n. 4, p. 345-346, Aug. 1996.

QUEIROZ-TELLES, F. Chromoblastomycosis: a neglected tropical disease. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 57 (Suppl 19): 46-50, 2015.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. *Chromoblastomycosis*. No prelo 2016.

QUEIROZ-TELLES, F.; ESTERRE, P.; PEREZ-BLANCO, M.; VITALE, R.G.; SALGADO, C.G.; BONIFAZ, A. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med. Mycol.* 2009; 47:3-15.

QUEIROZ-TELLES, F.; NUCCI, M.; COLOMBO, A.L.; TOBÓN, A.; RESTREPO, A. Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med. Mycol.* 2011; 49:225-36.

ROILIDES, E.; SEIN, T.; RODEN, M.; SCHAUFLELE, R.; WALSH, T.J. Elevated serum concentrations of interleukin-10 in nonneutropenic patients with invasive aspergillosis, *J. Infect. Dis.* 2001; 183:518–520.

ROILIDES, E.; SEIN, T.; SCHAUFLELE, R.; CHANOCK, S.J.; WALSH, T.J. Increased serum concentration of IL-10 in patients with hepatosplenic candidiasis. *J. Infect. Dis.* 1998, 178:589–592.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* 4:1–23 (2004).

ROMANI, L. & KAUFMANN, S.H. Immunity to fungi. *Res. Immunol.* 1998; 149:281–493.

ROZENTAL, S.; ALVIANO, C.S.; DE SOUZA, W. The in vitro susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* to activated macrophages. *Mycopathologia*. 1994. v.126, p.85-91.

SANTOS, A.L.; PALMEIRA, V.F.; ROZENTAL, S.; KNEIPP, L.F.; NIMRICHTER, L.; ALVIANO, D.S. et al. Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. *FEMS Microbiol Rev.* 2007; 31(5):570-91.

SCHELL, W.A.; ESTERRE, P.; TOPLEY, W.W.C. *Mycology Reference Book*. 10 ed. London: Hodder Arnold; 2006. Chromoblastomycosis. In.

SOJKA, D.K.; HUANG, Y.H. & FOWELL, D.J. Mechanisms of regulatory T-cell suppression – a diverse arsenal for a moving target. *Immunology*. 2008; 124(1):13–22. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02813.x>.

SOUSA, M.G.T.; AZEVEDO, C.D.M.P. E S.; NASCIMENTO, R.C.; GHOSN, E.E.B.; SANTIAGO, K.L.; NOAL, V.; BOMFIM, G.F.; MARQUES, S.G.; GONCALVES, A.G.; SANTOS, D.W.D.C.L.; ALMEIDA, S.R. *Fonsecaea pedrosoi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines in monocytes from patients with severe

and mild forms of chromoblastomycosis. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 84, p. 864-870, 2008.

SOUSA, M.G.T.; GHOSN, E. EID BOU; NASCIMENTO, R. C.; BOMFIM, G.F.; NOAL, V.; SANTIAGO, K.; DE MARIA PEDROZO E SILVA DE AZEVEDO, C.; MARQUES, S.G.; GONÇALVES, A.G.; DE CASTRO LIMA SANTOS, D. W.; CRIADO, P. R.; COSTA MARTINS, J.E.; ALMEIDA, S.R. Monocyte-derived dendritic cells from patients with severe forms of chromoblastomycosis induce CD4 + T cell activation in vitro. *Clinical and Experimental Immunology* (Print), v. 156, p. 117-125, 2009.

WANG, H.; UM, W.; JA, Q. et al. Cytokine Profile of a Self-Healing *Fonsecaea pedrosoi* Infection in Murine Model. *Cell Biochem. Biophys.* 2013; 67:599. doi:10.1007/s12013-013-9547-2].

WEAVER, C.T.; HATTON, R.D.; MANGAN, P.R.; HARRINGTON, L.E. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu. Ver. Immunol.* 2007; 25:821–852.

## APÊNDICE A - FICHA PROTOCOLO

### 1. Identificação

Nome: \_\_\_\_\_

Sexo: 1  Mas: 2  Fem

Idade: \_\_\_\_\_ Cor: \_\_\_\_\_ Naturalidade: cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

Local onde adoeceu:

Cidade \_\_\_\_\_ Estado ou País \_\_\_\_\_

Profissão atual: \_\_\_\_\_ Profissão quando adoeceu: \_\_\_\_\_

### 2. Hábitos de Vida

Lida com terra ou vegetais? \_\_\_\_\_ Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

Sofreu microtraumatismos? \_\_\_\_\_ Usa proteção local? \_\_\_\_\_

Anda descalço? \_\_\_\_\_

### 3. Exame clínico específico

Localização da lesão: \_\_\_\_\_ Número de lesões: \_\_\_\_\_

Evolução em anos: \_\_\_\_\_

Dimensão da maior lesão (no maior diâmetro): \_\_\_\_\_

### 4. Sinais e Sintomas:

Prurido? \_\_\_\_\_ Descamação? \_\_\_\_\_ Linfedema? \_\_\_\_\_ Dor? \_\_\_\_\_

Odor? \_\_\_\_\_ Adenomegalias? \_\_\_\_\_

Secreção? \_\_\_\_\_

Forma Clínica: \_\_\_\_\_ Gravidade: \_\_\_\_\_

### 5. Diagnóstico:

Exame Micológico Direto: \_\_\_\_\_ Cultura: \_\_\_\_\_

Fungo isolado: \_\_\_\_\_ Exame Histopatológico: \_\_\_\_\_

Coleta de sangue total para extração de DNA? Sim \_\_\_\_\_ Não \_\_\_\_\_

6. Coleta de sangue para dosagem de citocinas? Sim \_\_\_\_\_ Não \_\_\_\_\_



## **APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO**

### **CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E DA RESPOSTA IMUNE CELULAR EM PACIENTES PORTADORES DE CROMOBLASTOMICOSE NO ESTADO DO MARANHÃO**

O Sr(a). está sendo convidado(a) pela Dr<sup>a</sup>. Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo (CRM-MA: 2415), médica pesquisadora da Universidade Federal do Maranhão, a participar deste projeto de pesquisa. Este projeto visa fazer exames para avaliar as citocinas no sangue, que são substâncias produzidas no organismos para a defesa contra a sua doença. Para isso precisaremos coletar 10 mL de sangue que serão levados para o laboratório na Universidade Federal do Maranhão, onde realizaremos os exames. Compreenda que o objetivo principal desta pesquisa é avaliar a resposta da sua imunidade contra esta doença, bem como analisar a forma clínica, gravidade da sua doença e se existe alguma relação entre a dosagem das citocinas e da gravidade da sua doença e se há alteração com o tratamento realizado na rotina da doença neste serviço. O Sr(a) sentirá uma dor pequena durante a punção para a coleta do sangue, mas rápida, sem conseqüências danosas a sua saúde. O principal risco deste procedimento é a dor durante a coleta, mas que será feita por profissional treinado para que a coleta seja rápida e cuidadosa, para que não forme área arroxeadada por extravasamento de sangue no local da coleta. Os principais benefícios esperados são que a imunidade específica contra esta doença será conhecida e poderá ser analisada, podendo-se intervir para melhorar a resposta em caso de resposta imunológica inadequada.

O Sr(a). será solicitado a dar informações sobre seus dados pessoais, além de informações sobre possíveis lesões típicas da doença e que serão anotados em uma ficha própria.

Afirmo que você não é obrigado a participar do estudo e que isso não trará nenhum prejuízo ao Sr(a). ou seus familiares. Explico que não receberá nenhum pagamento por participar da pesquisa, e que se participar, tem o direito de desistir a qualquer momento. Garantimos que as informações dadas ao projeto permanecerão em sigilo durante todas as etapas desta pesquisa, inclusive na publicação dos resultados da mesma.

Também afirmo que poderá solicitar qualquer esclarecimento ou fazer qualquer reclamação com a Dr<sup>a</sup>. Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo ou outro membro de

sua equipe, pessoalmente ou pelos telefones (98) 30821193, (98) 88036918. Também forneço o telefone do CEP (Comitê de Ética na Pesquisa), para que possa fazer qualquer reclamação ou tirar dúvidas sobre questões éticas relacionadas à pesquisa. Tel: (98)21091250.

Este documento estará em duas vias, assinadas e rubricadas pelo pesquisador responsável e pelos voluntários da pesquisa, ficando uma via com o pesquisador e a outra com o voluntário.

Por fim, após ler esse documento, pode solicitar qualquer explicação que deseje da equipe, e caso não possua mais dúvidas, concorda em participar como voluntário do projeto e estudo agora proposto, o que fica confirmado pela sua assinatura abaixo.

(Local) ....., ..... de ..... de 201\_\_

NOME: .....

Assinatura: \_\_\_\_\_

IMPRESSÃO DATILOSCÓPICA (quando se aplicar)



TESTEMUNHAS:

1. NOME:.....

Assinatura: \_\_\_\_\_

1. NOME:.....

Assinatura: \_\_\_\_\_