

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Lucas Diego Gomes Bernardo

**ESTUDO HISTOLÓGICO QUALITATIVO E QUANTITATIVO DAS ALTERAÇÕES  
NA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC) E IMUNO-HISTOQUÍMICO DO  
INFILTRADO INFLAMATÓRIO EM DOENÇAS GRANULOMATOSAS  
INFECCIOSAS E NÃO INFECCIOSAS.**

Belo Horizonte,

2023

Lucas Diego Gomes Bernardo

**ESTUDO HISTOLÓGICO QUALITATIVO E QUANTITATIVO DAS ALTERAÇÕES  
NA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC) E IMUNO-HISTOQUÍMICO DO  
INFILTRADO INFLAMATÓRIO EM DOENÇAS GRANULOMATOSAS  
INFECCIOSAS E NÃO INFECCIOSAS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia geral Da Faculdade de medicina da Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Investigativa.

**Orientador:** Prof. Dr. Wagner Luiz Tafuri

**Coorientador:** Ramon de Alencar Pereira

Belo Horizonte

2023

043

Bernardo, Lucas Diego Gomes.

Estudo histológico qualitativo e quantitativo das alterações na matriz extracelular (MEC) e estudo imuno-histoquímico do infiltrado inflamatório em doenças granulomatosas infecciosas e não infecciosas [manuscrito] / Lucas Diego Gomes Bernardo. – 2023.

64 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Lui Tafuri. Coorientador: Dr. Ramon de Alencar Pereira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia.

1. Patologia. 2. Ativação de macrófagos. 3. Tecido Elástico. 4. Matriz Extracelular. 5. Doença Granulomatosa Crônica. I. Tafuri, Wagner Luiz. II. Pereira, Ramon de Alencar. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Jéssica Patrícia Silva de Sá – CRB6-3430

CDU: 616



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

### ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 466 DE LUCAS DIEGO GOMES BERNARDO

Realizou-se, no dia 14 de julho de 2023, às 14 horas, no formato híbrido, presencialmente e pela

Plataforma TEAMS da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de Dissertação, intitulada “**Estudo Histológico Qualitativo e Quantitativo das Alterações da Matriz Extracelular (MEC) e Imuno-Histoquímico do Infiltrado Inflamatório em Doenças Granulomatosas Infecciosas e Não Infecciosas**”, apresentada por **Lucas Diego Gomes Bernardo** número de registro 2021662165, graduado no curso de Ciências Biológicas, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: **Profa. Anita Sperandio Porto** – UNIR/Fundação Universidade Federal de Rondônia; **Profa. Mirian Nacagami Solto** – USP; **Prof. Ramon de Pereira Alencar** – Instituto Mário Pena/MG – **COORIENTADOR**; **Prof. Wagner Luiz Tafuri** – ICB/UFMG – **ORIENTADOR**.

A Comissão considerou a Dissertação:

**APROVADA**

**REPROVADA**

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 14 de julho de 2023.

\* De acordo com as Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG o grau de Mestre só será concedido ao aluno que entregar ao Colegiado do Curso, no prazo máximo de 60 dias, a versão final da Dissertação, em conformidade com as indicações da Comissão Examinadora. Após a entrega da versão final com a documentação exigida para emissão de Diploma, a secretaria emitirá Certificado de Conclusão do Mestrado.



Documento assinado eletronicamente por **Wagner Luiz Tafuri, Professor do Magistério Superior**, em 19/07/2023, às 15:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mirian Nacagami So o, Usuária Externa**, em 24/07/2023, às 17:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Anita Sperandio Porto, Usuária Externa**, em 23/08/2023, às 10:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

[https://sei.ufmg.br/sei/controlador.php?acao=documento\\_imprimir\\_web&acao\\_origem=arvore\\_visualizar&id\\_documento=2660559&infra\\_sistema...](https://sei.ufmg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=2660559&infra_sistema...) 1/2 23/08/2023, 12:23 SEI/UFMG - 2464680 - Ata de defesa de Dissertação/Tese



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2464680** e o código CRC **4358063D**.

**Referência:** Processo nº 23072.237954/2023-22 SEI nº 2464680  
[https://sei.ufmg.br/sei/controlador.php?acao=documento\\_imprimir\\_web&acao\\_origem=arvore\\_visualizar&id\\_documento=2660559&infra\\_sistema...](https://sei.ufmg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=2660559&infra_sistema...)



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

### FOLHA DE APROVAÇÃO

**“Estudo Histológico Qualitativo e Quantitativo das Alterações da Matriz Extracelular (MEC) e Imuno-Histoquímico do Infiltrado Inflamatório em Doenças Granulomatosas Infeciosas e Não Infeciosas”**

**LUCAS DIEGO GOMES BERNARDO**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de **Pós-Graduação em Patologia**, como requisito para obtenção do grau de **Mestre em PATOLOGIA**, área de concentração **PATOLOGIA INVESTIGATIVA**.

Aprovada em 14 de julho, pela banca constituída pelos membros:

**Profa. Anita Sperandio Porto - UNIR/Fundação Universidade Federal de Rondônia**

**Profa. Mirian Nacagami Solto o - USP**

**Prof. Ramon de Pereira Alencar - Instituto Mário Pena/MG – COORIENTADOR**

**Prof. Wagner Luiz Tafuri - ICB/UFMG – ORIENTADOR**

**Belo Horizonte, 14 de julho de 2023.**



Documento assinado eletronicamente por **Wagner Luiz Tafuri, Professor do Magistério Superior**, em 19/07/2023, às 15:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mirian Nacagami Solto, Usuária Externa**, em 24/07/2023, às 17:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Anita Sperandio Porto, Usuária Externa**, em 23/08/2023, às 10:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgaoesexterno=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgaoesexterno=0) informando o código verificador **2464684** e o código CRC **04B97D8C**.

**Referência:** Processo nº 23072.237954/2023-22SEI nº 2464684

[https://sei.ufmg.br/sei/controlador.php?acao=documento\\_imprimir\\_web&acao\\_origem=arvore\\_visualizar&id\\_documento=2660563&infra\\_sistema...](https://sei.ufmg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=2660563&infra_sistema...)

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar a pessoa mais importante da minha vida que desde criança me incentivou a estudar para ter um futuro melhor, ser uma pessoa melhor. Me ensinando lições preciosas para a vida, minha mãe meu pilar, Dona Jaqueline.

Ao meu companheiro e parceiro de vida Cristiano que me incentivou no processo e está ao meu lado durante essa jornada.

Agradeço as experiências boas e ruins vividas, pois galgaram o ser humano que me tornei, as adversidades me ensinaram a viver, assim como as vitórias me serviram de gás para ir cada vez mais longe, as oportunidades que me foram oferecidas e que pude agarrar com força e me ajudaram chegar até aqui.

Agradeço aos meus Mestres que ao longo da vida foram muitos em minha jornada de formação, mas que marcaram significativamente com suas lições e ensinamentos que perpassaram a sala de aula, em especial aqueles que viram potencial em mim e incentivaram sempre. Em especial uma Professora, Claudia Nagli lembro-me com carinho de em vários momentos de minhas práticas e minha carreira.

Agradeço ao meu amigo e coorientador Ramon Alencar, pelo incentivo, auxílio e força em todos os momentos necessários.

Agradeço as minhas parceiras e braços direitos que me auxiliaram em vários momentos de sufoco durante a execução desta proposta, Mariana, veterinária dedicada ao qual me tornei amigo durante o período de estudos no mestrado, Lucélia Pinheiro, a Lú que sempre com sua doçura e solicitude me socorreu nos momentos de sufoco.

A equipe técnica do nosso departamento, em especial a Luciana, que me ajudou como suporte em vários momentos durante a execução dessa dissertação.

Finalmente agradeço a todos que colaboraram de maneira direta ou indireta na construção e execução da proposta de estudos que levaram a esta dissertação. A CAPES por fornecer o subsídio financeiro ao longo da minha formação, me possibilitando me tornar hoje Mestre pela Universidade Federal de Minas Gerais.

A todos meu OBRIGADO!

## **TÍTULO:**

Estudo histológico qualitativo e quantitativo das alterações da matriz extracelular (MEC) e imuno-histoquímico do infiltrado inflamatório em doenças granulomatosas infecciosas e não infecciosas.

## **RESUMO:**

Em doenças granulomatosas cutâneas infecciosas e não infecciosas ocorrem profundas alterações de Matriz Extracelular (MEC) como os processos da organização e fibrose (colagenogênese) e/ou síntese ou degradação do tecido elástico. Consequentemente, a atividade dos subtipos de macrófagos contribui para essas alterações da MEC decorrentes da secreção de diversas de citocinas, ou proteínas de remodelagem de MEC como as metaloproteases MMPs, e outras. Tendo em vista a gama de versatilidade e a plasticidade desta célula frente ao combate aos agentes, o mapeamento de proteínas expressas por macrófagos como as moléculas CD68 e CD163 são investigadas. Adicionalmente, alguns marcadores mesenquimais, como alfa-actina e vimentina podem indicar ativação de células com potencial fibroblástico, isto é, fibroblastos ativados produtores de colágeno (“miofibroblastos”). Algumas técnicas de quantificação de componentes específicos da MEC como, as fibras reticulares constituídas principalmente de colágenos I e III e fibras elásticas, fornecem pistas de como a MEC se comporta frente aos diversos modelos de doenças granulomatosas de causas infecciosas como a LTA, hanseníase virchowiana e paracoccidiodomicose e doenças não infecciosas como o granuloma de corpo estranho e a sarcoidose, estabelecendo um comparativo entre esses modelos. Assim, esse estudo demonstrou uma maior expressão de alfa-actina, vimentina e fibras reticulares nas amostras dos grupos da paracoccidiodomicose e granuloma de corpo estranho, aliado ao fato de maiores taxas de macrófagos M2. Alterações do tecido elástico ocorreram principalmente nas amostras de hanseníase virchowiana e LTA. Entretanto, diferenças entre doenças granulomatosa infecciosas e não infecciosas em relação a quantidade de macrófagos M2, fibras reticulares, alfa-actina e vimentina não foram observadas.

**Palavras chaves:** ativação de macrófagos, CD163, CD68, marcadores mesenquimais, fibras reticulares, fibras elásticas, Inflamação granulomatosa

## **ABSTRACT**

Qualitative and quantitative histological study of alterations in the extracellular matrix (ECM) and immunohistochemistry of the inflammatory infiltrate in infectious and non-infectious granulomatous diseases.

Processes of organization and fibrosis (collagenogenesis) and/or elastic tissue synthesis or degradation occur in infectious and non-infectious cutaneous granulomatous diseases characterizing, profound Extracellular Matrix (ECM) alterations. Activity of macrophage subtypes contributes to these ECM changes and to fibrosis processes arising from the secretion of various cytokines, inflammatory activity, or ECM remodeling proteins such as the metalloproteases MMPs, collagen secretion and others.

In view of the versatility and plasticity of this cell against agents, the mapping of macrophage expressed proteins such as CD68 and CD163 are investigated. Additionally, some mesenchymal markers such as alpha-actin and vimentin may indicate activation of cells with fibroblastic potential, i.e. activated collagen-producing fibroblasts ("myofibroblast"). Some quantitative techniques of specific components of the ECM such as reticular fibers (composed mainly of collagens I and III) and elastic fibers, provide clues as to how the ECM behaves in different models of granulomatous diseases of infectious causes such as tegumentary American leishmaniasis - ATL, Virchowian leprosy and paracoccidioidomycosis and also non-infectious diseases such as foreign body granuloma and sarcoidosis, establishing a comparison between these models. Thus, our study demonstrated a higher expression of alpha-actin, vimentin, and reticular fibers in the samples from the paracoccidioidomycosis and foreign body granuloma groups, along with higher rates of M2 macrophages (CD163 positive cells). Alterations in the elastic tissue occurred mainly in the samples from Virchowian leprosy and ATL. However, differences between infectious and non-infectious granulomatous diseases regarding the amount of M2 macrophages, reticular fibers, alpha-actin, and vimentin were not observed.

**Keywords:** macrophage activation, CD163, CD68, mesenchymal markers, reticular fibers, elastic fibers, granulomatous inflammation.

## **LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1-</b> Marcadores de células mesenquimais.....	35
<b>TABELA 2-</b> Marcadores de macrófagos teciduais.....	35

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1-</b> Imunopatologia de doenças granulomatosas em pulmão.....	25
<b>FIGURA 2-</b> Fotomicrografia em aumento de 40 x de cortes de pele humana com doenças granulomatosas infecciosas e não infecciosas em Hematoxilina-Eosina.....	37
<b>FIGURA 3-</b> Fotomicrografia em aumento de 20 x de cortes de pele humana com doenças granulomatosas infecciosas e não infecciosas, CD68+.....	38
<b>FIGURA 4-</b> Gráfico de quantificação de área de células CD68+ nas doenças.....	39
<b>FIGURA 5-</b> Fotomicrografia em aumento de 20 x de cortes de pele humana com doenças granulomatosas infecciosas e não infecciosas, CD163+.....	40
<b>FIGURA 6-</b> Gráfico de quantificação de área de células CD163+ nas doenças.....	41
<b>FIGURA 7-</b> Gráfico da razão entre CD68/CD163.....	41
<b>FIGURA 8-</b> Fotomicrografia em aumento de 20 x de cortes de pele humana com doenças granulomatosas infecciosas e não infecciosas, FXIIIa+.....	42
<b>FIGURA 9-</b> Gráfico de quantificação de área de células Fator XIIIa+ nas doenças .....	43
<b>FIGURA 10-</b> Fotomicrografia em aumento de 20 x de cortes de pele humana com doenças granulomatosas infecciosas e não infecciosas, Vimentina+.....	44
<b>FIGURA 11-</b> Gráfico de quantificação de área vimentina+ nas doenças.....	44
<b>FIGURA 12-</b> Fotomicrografia em aumento de 20 x de cortes de pele humana com doenças granulomatosas infecciosas e não infecciosas, $\alpha$ -Actina+.....	45
<b>FIGURA 13-</b> Gráfico de quantificação de área de células $\alpha$ -Actina+.....	46
<b>FIGURA 14-</b> Fotomicrografia em aumento de 20 x de cortes de pele humana com doenças granulomatosas infecciosas e não infecciosas, Fibras elásticas, coloração de Verhoeff.....	47
<b>FIGURA 15-</b> Gráfico de quantificação de área de fibras elásticas nas doenças.....	48
<b>FIGURA 16-</b> Fotomicrografia em aumento de 20 x de cortes de pele humana com doenças granulomatosas infecciosas e não infecciosas, Fibras reticulares por coloração de Prata amoniacal de Gomori.....	49
<b>FIGURA 17-</b> Gráfico de quantificação de área de fibras reticulares nas doenças.....	49
<b>FIGURA 18-</b> Gráfico de correlação entre os marcadores nas doenças.....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AAMs-** Alternately Activated Macrophages

**ARG-** Arginase

**BSA-** Albumina Sérica Bovina

**CAMs-** Classically Activates Macrophages

**CD68-** Glicoproteína intracelular associada a grânulos citoplasmáticos

**CD80-** Proteínas de membrana da superfamília das imunoglobulinas também chamada de B7.1

**CD86-** Proteína de membrana da superfamília das imunoglobulinas também chamada de B7.2

**CD163-** Receptor internalizador de complexos hepatoglobina-hemoglobina presente em macrófagos.

**CD206-** Receptor de manose tipo C

**DAB-** 3,3-Diaminobenzidina

**FCyR-** Receptor gamma para a porção FC

**GCE-** Granuloma de Corpo Estranho

**GM-CFS-** Fator Estimulador de Colônia de Mastócitos e Granulócitos

**HE-** Hematoxilina e Eosina

**HV-** Hanseníase Virchowiana

**HRP-** Ultra Vision Large Volume Detection System Anti-polivalent

**IC-** Complexos Imune

**IFN $\gamma$ -** Interferon Gama

**IL-** Interleucina

**ILR $\alpha$ -** Receptor alfa de Interleucina

**iNOS-** óxido nítrico sintase induzida

**LPS-** Lipopolisacarídeos

**LTA-** Leishmaniose Tegumentar Americana

**MEC-** Matriz Extracelular

**M1-** Macrófagos classicamente ativados

**M2-** Macrófagos alternativamente ativados

**MMPs-** Metaloproteinases

**NO-** Óxido Nítrico

**PBS-** Tampão Fosfato salino

**PCM-** Paracoccidioidomicose

**ROS-** Radicais superóxido

**TCD4-** Linfócitos helpers

**TCD8-** Linfócitos citotóxicos

**TLR-** Receptores do tipo Toll Like

**Th-** Linfócito T helper

**Th1-** Padrão de resposta imunológico anti-fibrótico

**Th2-** Padrão de resposta imunológico pró-fibrótico

**TNF $\alpha$ -** Fator de necrose tumoral alfa

**TGF $\beta$ -** Fator de crescimento transformante beta

**VEGF-** Fator de Crescimento de Endotélio Vascular

## SUMÁRIO

1) Revisão de literatura .....	18
1.1- Inflamação granulomatosa .....	18
1.2- Origens, funções, heterogeneidade e plasticidade de macrófagos .....	22
1.3- Alterações de matriz extracelular (MEC) e a fibrose .....	25
2) Justificativa .....	29
3) Objetivos .....	31
3.1- Objetivo geral .....	31
3.2- Objetivos específicos .....	31
4- Metodologia empregada .....	32
4.1- Avaliação histológica e seleção dos blocos de tecidos parafinados .....	32
4.1.1- Amostras cutâneas (leishmaniose tegumentar americana, hanseníase virchowiana, paracoccidioidomicose, sarcoidose e granuloma de corpo estranho) e Comitê de ética .....	32
4.2- Colorações histológicas .....	32
4.2.1- Hematoxilina e eosina .....	32
4.2.2- Estudo histoquímico das fibras elásticas .....	33
4.2.3- Estudo histoquímico das fibras reticulares .....	33
4.3- Técnica de estreptoavidina peroxidase imuno-histoquímica para marcação de miofibroblastos e macrófagos .....	34
4.4- Análise de proteínas marcadas .....	35
5- Análises estatística .....	35
6- Resultados .....	36
6.1- Análise da HE e colorações especiais .....	36
6.2- Expressão de antígenos de macrófagos CD68, CD163 e análises morfométricas e imuno-histoquímicas .....	37
6.3- Estudo da matriz extracelular .....	46
6.3.1- Fibras elásticas .....	46
6.3.2- Fibras reticulares (colágeno) .....	48
6.3.3- Análise de correlação (valor de r) .....	50
7- Discussão .....	50
7.1- Estudo qualitativo e quantitativo da matriz extracelular (MEC) .....	50

<b>7.2- Estudo imuno-histoquímico de macrófagos e fibroblastos, razão da subpopulação M2 em doenças granulomatosas cutâneas</b> .....	52
<b>8- Conclusões</b> .....	57
<b>9- Perspectivas futuras</b> .....	57
<b>10- Referências bibliográficas</b> .....	59

## **1- Revisão de literatura**

### **1.1. Inflamação granulomatosa**

A resposta inflamatória crônica granulomatosa caracteriza-se por arranjos concêntricos (nódulos) de um exsudato celular composto predominantemente por células mononucleares denominados granulomas. Há uma variação na densidade de células, de acordo com padrões do hospedeiro e do parasita e da resposta imunológica, mas um fato é que as inflamações granulomatosas são caracterizadas pela presença do granuloma e sua composição característica de macrófagos modificados. Os granulomas são então constituídos por células obrigatórias como os macrófagos modificados (macrófagos epitelióides, macrófagos ativados e células gigantes multinucleadas), linfócitos e plasmócitos. Outras células, ditas não obrigatórias, podem estar presentes como eosinófilos, neutrófilos e mastócitos, o que depende do tipo do agente inflamatório (flogógeno) (Roszer, 2015; Kaye e Beattie, 2015; Tomlin e Piccinini, 2018).

Quanto à disposição das células que formam os granulomas, em geral, mais macrófagos epitelióides e as células gigantes (que podem estar presentes ou não) dispõem-se mais centralmente, enquanto linfócitos e plasmócitos formariam um halo (coroa de linfócitos) mais externo, que no conjunto daria a ideia do enclausuramento do flogógeno (Giorgio et al., 2020; Pagán e Ramakrishnan). Isso daria a ideia de um impedimento de disseminação do flogógeno para o organismo (Viola et al., 2019). De fato, mais externamente à coroa de linfócitos, há fibroblastos e células dendríticas que participam amplamente da atividade inflamatória e que se relacionam ao processo de colagenogênese e remodelagem da matriz extracelular (Mosser e Edwards, 2008; Frederick et al., 2008; Roszer, 2015; Chester et al., 2017).

Os granulomas de maneira geral são classificados em dois grupos de acordo com suas causas: Os granulomas imunogênicos, ou também chamados de granulomas epitelióides e granulomas não imunogênicos ou granuloma de corpo estranho. Granulomas imunogênicos são provocados em resposta a agentes imunogênicos, caracterizados principalmente pela presença de macrófagos epitelióides (Roszer, 2015; Giorgio et al., 2020). Essas células perdem a capacidade de fagocitar, organizando-se em camadas concêntricas em torno do agente infeccioso. Além deste, existem os granulomas não imunogênicos ou granulomas de corpos estranhos, provocados por agentes inertes. Esse é um granuloma menos compacto comparado aos imunogênicos em que as células epitelióides não formam camadas concêntricas. Outra característica interessante na formação do granuloma é que há fusão de macrófagos ativados ou de células epitelióides

formando as células gigantes multinucleadas. *In vitro* observou-se que o fator estimulador de colônia de mastócitos e granulócitos (GM-CSF) e interleucina 6 (IL6) são importantes nesse processo (Gordon, 2005; Edward, 2006; Bogliolo, 2016; Pagán e Ramakrishnan, 2018; Ganesan et al., 2022).

Outro fato importante que destacamos é que o padrão de resposta imunológica e a interação com células Th (linfócitos T helper), determinam se o granuloma será compacto ou frouxo. Assim, o padrão de resposta Th1 caracterizado principalmente pelas citocinas interferon gama (IFN $\gamma$ ) e interleucina 12 (IL12), promove granulomas mais compactos e organizados com halos de células enclausurando o agente potencialmente danoso; enquanto granulomas caracterizados pela padrão de resposta imunológica Th2, com as citocinas características, interleucinas 4, 10 e 13 (IL4, IL10 e IL13), são frouxos e desorganizados, geralmente pouco eficientes em conter os agentes potencialmente danosos (Bogliolo, 2016; Sahebkar, 2017; Ganesan et al 2022).

Desta maneira, o padrão de resposta imunológica e as citocinas presentes no microambiente interferem diretamente na formação de granulomas compactos ou frouxos e determinam o curso do processo inflamatório (Gordon, 2005; Edward, 2006; Giorgio et al., 2020).

A resposta inflamatória crônica granulomatosa caracteriza muitas doenças denunciando muitas vezes seu agente etiológico até mesmo pela sua histologia. Pode ser observada em uma série de doenças infecciosas como a leishmaniose tegumentar americana (LTA), a hanseníase virchowiana, e a paracoccidiodomicose. Assim como, em doenças não infecciosas, incluindo o granulomade corpo estranho e a sarcoidose.

A LTA é uma doença tropical veiculada a um vetor flebotomíneo que transmite o protozoário do gênero *Leishmania*, sendo que no Brasil o contágio é atribuído principalmente as espécies *Leishmania (L.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. Como manifestação principal da doença, há ocorrência de lesões cutâneas ulceradas, indolores, com bordas elevadas e bem definidas, destacando-se no local da lesão a presença de tecido de granulação (Souza-Lemos et al., 2008).

De acordo com padrões de resposta imunológica a infecção pode ser controlada e a eliminação do agente causador ocorre de maneira eficiente por células fagocitárias, com posterior apresentação de antígeno. Nesse sentido o padrão de resposta Th1 com as citocinas características como interleucinas 2 e 12 (IL2 e IL12), interferon gama (IFN $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) formam granulomas capazes de conter e eliminar os macrófagos infectados,

porém, o padrão de resposta Th2, com predominância das citocinas interleucina 10 (IL10) e fator transformante beta (TGF $\beta$ ) favorecem a formação de um granuloma frouxo e um micro ambiente favorável a proliferação do protozoário, além disso, ocorre acentuado processo de colagenogênese e remodelação da MEC (Souza-Lemos et al., 2008; Kaye e Beattie, 2016).

A hanseníase virchowiana se caracteriza pelo comprometimento da pele e de nervos periféricos causada pelo *Mycobacterium leprae*. De acordo com fatores intrínsecos do hospedeiro e do bacilo, a resposta imunológica pode ser conduzida em dois padrões distintos, que determinam a eliminação ou proliferação do bacilo. No padrão de resposta Th1, há apresentação antigênica e ativação de linfócitos TCD4+, ocorrendo uma resposta celular efetora, com predomínio das citocinas interferon gama (IFN $\gamma$ ) e interleucina 12 (IL12), assim o bacilo sofre lise, os granulomas formados são compactos e organizados e realizam a contenção do agente bacteriano. No padrão de resposta Th2, há ativação de linfócitos TCD8+ e as citocinas predominantes são, interleucina 4 e interleucina 10 (IL4, IL10), desta maneira, o bacilo pode multiplicar-se e disseminar-se já que os granulomas formados são frouxos e desorganizados e não são suficientes para contenção do agente (Moura et al., 2012).

A paracoccidioidomicose é uma micose causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, adquirida principalmente pela aspiração de conídios fúngicos. O padrão de resposta celular Th1, forma granulomas compactos capazes de enclausurar o agente, e a atividade inflamatória tende a eliminar o fungo, enquanto o padrão de resposta celular Th2 com a prevalência de citocinas anti-inflamatórias, favorece a formação de granulomas frouxos. Em condições de desequilíbrio da resposta imunológica celular, o fungo tende a disseminar e comprometer vários órgãos e sistemas. A depressão da resposta imune celular, demonstrada pela síntese reduzida de citosinas do padrão Th1 como interleucina 2 e 12 (IL2, IL12) e interferon gama (IFN $\gamma$ ) e aumento das citosinas do padrão de resposta Th2 principalmente interleucinas 4, 5 e 10 (IL4, IL5 e IL10) e fator transformante beta (TGF $\beta$ ) são essenciais para a disseminação sistêmica desse fungo. (Parise-Fortes et al., 2011; Pedreira et al., 2016; Roussey et al. 2016; Griffiths et al., 2021).

Em doenças não infecciosas, como o granuloma de corpo estranho, formam-se aglomerados concêntricos de células mononucleadas como macrófagos e seus derivados (macrófagos ativados, macrófagos epitelióides), linfócitos e plasmócitos. Essas células arranjam-se de forma concêntrica a um agente inerte, formando então o granuloma.

Macrófagos e monócitos recém-chegados ao foco inflamatório, por sua vez, podem se fundir originando células gigantes multinucleadas, que pode ser classificada de acordo com a

organização nuclear. Quando os núcleos se dispõem em forma de ferradura, “bem-organizados” nos polos da célula, essas são classificadas como células gigantes do tipo *Langhans*, mas quando se apresentam distribuídas no centro da célula de forma desorganizada, são classificadas como células gigantes do tipo *corpo estranho* (Pagán e Ramakrishnan, 2018; Bogliolo, 2016; Giorgio et al., 2020).

A sarcoidose, sem causas etiológicas claras ainda, é uma doença sistêmica que pode ter como causa reação imunológica a antígenos próprios (autoimunidade). Outros agentes químicos como berilo, alumínio e zircônio produzem granulomas idênticos aos da sarcoidose (Daldon e Arruda 2007). A imunologia da sarcoidose está relacionada a uma interação entre macrófagos residentes do tecido com linfócitos T CD4. Os macrófagos residentes internalizam o antígeno da sarcoidose e a partir daí apresentam a células T CD4, que influenciam diretamente por meio de quimiocinas a mudança deste macrófago residente em célula epitelióides, que infiltram os granulomas. O padrão de resposta mediado por células Th (linfócitos T Helpers) também influencia na cronicidade da resposta e dos granulomas. No padrão de resposta Th1 foi observado que as citocinas predominantes, fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), interferon gama (IFN $\gamma$ ) interleucinas 2, 12, 15 e 18 (IL12, IL15 e IL18) são responsáveis pela formação do granuloma, as mudanças nos padrões de resposta e citocinas Th2 características destacando-se fator transformante beta (TGF $\beta$ ) e as interleucinas 3 e 10 (IL3 e IL10), são responsáveis pela diferenciação de macrófagos para o perfil M2, esse consequentemente participa ativamente dos processos de fibrogênese (Agostini et al., 1998; Cox et al., 2005; Nunes et al., 2005; Daldon e Arruda, 2007).

Em todas essas doenças, as lesões inflamatórias cutâneas são crônicas do tipo granulomatoso. O processo de cura por organização/fibrose é o mais frequente e decorre de forma altamente coordenada em etapas ou fases: homeostase, inflamação, proliferação e remodelamento/maturação, onde a matriz extracelular (MEC) exerce função central em todas essas fases, instruindo células ou reforçando a síntese de suas moléculas primordiais (Chester e Brown 2017, Pakshir e Hinz, 2019).

A nova MEC deve conter fibras colágenas do tipo I e III (fibras reticulares), que mantêm a força mecânica tecidual. Todavia, outras moléculas como o colágeno do tipo IV e do tipo VI, aliadas ao colágeno I e III, são muito importantes para a manutenção da arquitetura tecidual (estrutura), bem como na quimiotaxia de células produtoras de colágeno. Em processos de fibrose é comum observar a acentuada deposição de fibras de colágeno do tipo I e III (Friedman,

2004; Guyot, 2006; Gordon e Hanh, 2010; El Agha et al., 2017; Pakshir e Hinz, 2018; Distler et al., 2019).

## **1.2. Origens, funções, heterogeneidade e plasticidade de Macrófagos**

Macrófagos são células provenientes de precursores da linhagem eritro-mielóide que se originam do monoblasto, do pró-monócito, e do monócito, e que, posteriormente, em tecidos e órgãos, diferenciam-se em macrófagos. As células dendríticas possuem essa mesma origem (Domen et al., 2011; Abbas, 2011). No embrião os macrófagos são formados a partir do saco vitelínico sem intermediários, até aproximadamente o terceiro mês de gestação (Ross e Pawlina, 2012; Soucie et al., 2016). Há migração destes macrófagos originados do saco vitelínico para o fígado, onde estimulados por fatores adequados dividem e originam os monócitos fetais, que posteriormente diferenciam-se em macrófagos (Fejer e Sharma, 2015; Soucie et al., 2016; Roszer, 2018). Recentemente foi descrita a capacidade de auto renovação de macrófagos teciduais para repovoamento tecidual (Fejer e Sharma, 2015; Soucie et al., 2016; Roszer, 2018).

Os macrófagos são importantes células que fazem parte da imunidade celular, descritas inicialmente em 1989 por Elie Metchnikoff, que observou essas células primeiramente em estrelas do mar, e descreveu a capacidade que estas apresentavam de ingestão de partículas inertes e estranhas, fato verificado quando o pesquisador estaqueou espinhos de roseiras nessas estrelas e em seus estudos observou que essas células se agrupavam ao redor do espinho, depois de um tempo digerindo-o (Metchnikoff, 1989; Gordon, 2007; Pacheco, 2012). A esta capacidade foi definido por ele o termo fagocitose, e as células observadas denominadas como macrófagos e micrófagos de acordo com o seu tamanho. A partir desse fato biológico Elie Metchnikoff também formulou a teoria da imunidade celular (Metchnikoff, 1989) que mais tarde se somaria a teoria da imunidade humoral de Paul Ehrlich (Pacheco, 2012).

Sendo uma célula de alta plasticidade atuante da imunidade celular, os macrófagos exercem uma gama de funções destacando: a) capacidade de ingestão e eliminação de microrganismos; b) geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio; c) ingestão de células mortas do próprio indivíduo (células apoptóticas); d) secreção de citocinas com uma gama de funções como o recrutamento e ativação de outros monócitos e linfócitos e fibroblastos; e) síntese e degradação de compostos da matriz extracelular; f) A capacidade de apresentação antigênica, de suma importância na resposta imune efetora mediada por células T; g) capacidade de promoção de reparo tecidual, com formação de novos vasos e pela síntese de matriz extracelular rica em

colágeno (Metchnikoff, 1989; Gordon, 2003; Mosser e Edwards, 2008; Abbas, 2011; Junqueira e Carneiro, 2011; Roszer, 2015; Adams, 2019; Viola et al., 2019).

Há mais de 20 anos, vários autores consideram a existência de diferentes subpopulações de macrófagos, essas descritas como residentes em tecidos. Todavia mesmo na luz dos conhecimentos atuais que os monócitos circulantes oriundos da medula óssea ao serem recrutados ao tecido sofrem diferenciação distinta aos diferentes microambientes teciduais. Existe um grande debate na literatura sobre possíveis subpopulações de macrófagos (Ziegler-Heitbrock, 1988; Passlick, 1989; Minutti et al., 2011; Barros et al., 2013; Chistiakov et al., 2015).

Assim, na tentativa de uniformizar a nomenclatura dos macrófagos em seu espectro funcional, alguns autores como Gordon et al. 2003, Mosser e Edwards, 2008, propuseram a classificação linear de macrófagos em dois extremos: de um lado estariam os macrófagos denominados M1 ou “macrófagos clássicos ativados” - *Classically Activates Macrophages* - CAMs, e de outro, macrófagos denominados M2 ou “macrófagos ativados alternativamente - *Alternatively Activated Macrophages* – AAMs.

No tecido os monócitos serão sensibilizados e ativados em uma das vias dependendo do microambiente e estímulos recebidos, desta maneira, os macrófagos ativados pela via clássica (CAMs) são estimulados por lipopolisacarídeos (LPS), interferon gama ( $IFN\gamma$ ) e fator de necrose tumoral ( $TNF\alpha$ ). Uma vez estimulados assumem um perfil pró inflamatório, assim os macrófagos clássicos ativados (CAMs), estão envolvidos na produção de óxido nítrico (NO) e na indução de citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas do tipo 1 beta ( $IL1\beta$ ), interleucina 6 (IL-6), interleucina 12 (IL12) e interleucina 23 (IL23) e o fator de necrose tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ), com papel central na reação inflamatória do tipo celular (Edwards et al. 2006; Mosser e Edwards, 2008; Adams et al. 2019; Viola et al. 2019). Em suas membranas esses macrófagos expressam altos níveis de receptores CD68, CD80 e CD86 e o Complexo de histocompatibilidade humana (HLA II) (Viola et al., 2019). Em outro extremo, macrófagos alternativamente ativados (AAMs), são induzidos por complexos imunes, interleucinas 4, interleucina 10 e interleucina 13 (IL4, IL10 e IL13), glicocorticoides, ligantes de receptores do tipo Toll like (TLR) e receptores alfa de interleucina 1 ( $IL1R\alpha$ ). Uma vez estimulados seus produtos e funções são diversas, destacando-se, a produção e secreção de interleucina 10 (IL10), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento transformante beta ( $TGF\beta$ ). Nos macrófagos alternativamente ativados (AAMs), a produção de óxido nítrico (NO) é desviada por indução de arginases 1 e 2 (ARG1, 2) (Murder et al. 2009; Viola et al. 2019), que são enzimas citosólicas que eliminam hidrogênio pela catálise hidrolítica de ureia e ornitina,

assim competem com a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOs), que controla a produção de óxido nítrico (NO). As arginases competem com os estoques intracitoplasmáticos dos macrófagos ditos macrófagos alternativamente ativados (AAMs), desviando a produção do óxido nítrico (NO) para poliaminas e prolinas a partir da ornitina (Maccallini et al. 2009). As prolinas, por sua vez, são essenciais para a produção de colágeno (Morris et al. 2007). Macrófagos alternativamente ativados (AAMs) desempenham um papel essencial no reparo tecidual, neovascularização, remodelagem da matriz extracelular e formação de granulomas (Mosser, et al. 2003; Gordon, 2003; Strauss-Ayali, et al. 2007; Mosser e Edwards, 2008; Roszer, 2015; Adams et al., 2019; Viola, et al., 2019). Em macrófagos são encontrados os receptores CD68, receptores do tipo manose CD206 (lectina tipo C presente principalmente na superfície de macrófagos) receptor do tipo scavenger CD163, receptores do tipo Toll like 1 e 8 (TLR1 e TLR8). (Hogger et al., 1998; Lau et al., 2004; Dias-Costa et al., 2008; Shapouri-Moghaddam, et al. 2017; Viola et al., 2019). Além disso, esses macrófagos exercem papel biológico importante no processo de cicatrização (reparo), colagenogênese e angiogênese. (Kisseleva e Brenner, 2008; Masseno et al. 2010; Adam, et a. 2019).

Quando estes macrófagos são induzidos por glicocorticoides e IL-10, passam a expressar altas quantidades de citocinas anti-inflamatórias como a própria IL-10 e o TGF- $\beta$  (Shapouri-Moghaddam et al. 2017) exercendo papel importante no processo do *clearance* tecidual (fagocitose de células apoptóticas), remodelagem da matriz extracelular, fibrose mediante produção excessiva de matriz intersticial (colágeno) e desbalanço das metaloproteases (MMPs) (Barros et al. 2013; Chistiakov et al. 2015; Chester et al. 2017; Adam et al., 2019).

Apesar da classificação dos macrófagos em macrófagos clássicos ativados (CAMs) e macrófagos alternativamente ativados (AAMs) persistir na literatura, essa classificação não é tão consensual pois existe uma grande plasticidade de ativação destes macrófagos em resposta a vários agentes ou estímulos distintos. Pesquisadores como Edwards et al. (2006) e Mosser e Edwards (2008); demonstraram uma terceira classificação distinta de macrófagos, com uma subpopulação denominada como macrófagos regulatórios. Esses subtipos de macrófagos foram observados após estímulo com complexos imunes (IC) e mediante reconhecimento de receptores do tipo III para a porção Fc das imunoglobulinas (*Fc gamma receptor* - Fc $\gamma$ R). Após a ligação dos complexos imunes a esses receptores, há acentuada produção de interleucina 10 (IL-10), potente citocina anti-inflamatória. Muitos autores admitem assim que essa terceira população de macrófagos seria essencial ao controle da resposta inflamatória, exercendo ação regulatória sobre macrófagos clássicos ativados (CAMs) e macrófagos alternativamente ativados (AAMs) (Gordon e Taylor, 2005; Edward et al., 2006; Gordon, 2017).

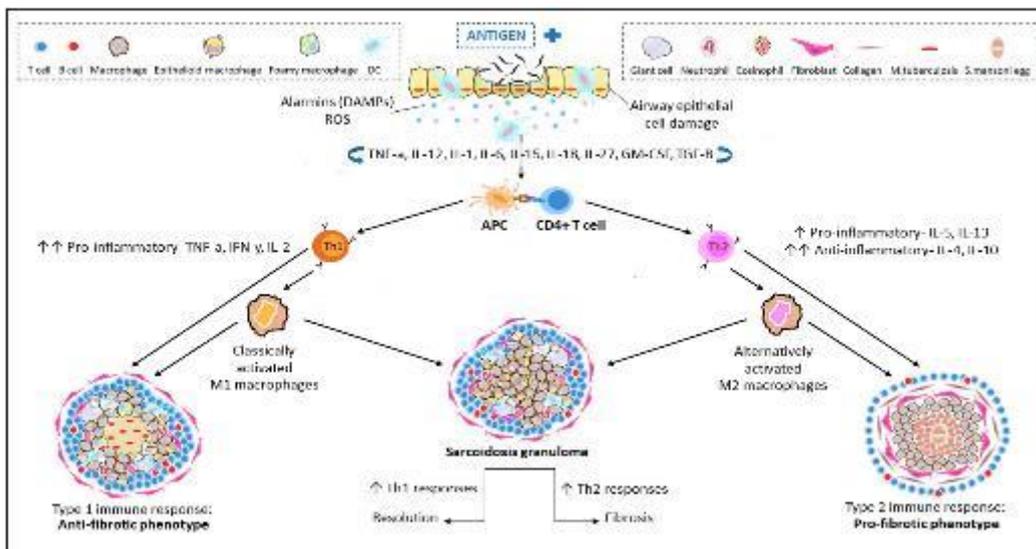


Figura 1- Imunopatologia de doenças granulomatosas pulmonares, onde o contato de células com o agente causador, assim como sua destruição libera alarminas, as células de defesa residentes nesse epitélio também liberam citocinas características e há a liberação de espécies reativas de oxigênio. Todo esse conjunto promove recrutamento, ativação, proliferação e diferenciação de células que irão atuar no combate ao patógeno. A exposição de antígenos por células apresentadoras de antígenos á linfócitos TCD4 pode conduzir a dois tipos de respostas distintas. No padrão de resposta Th1, há predominância de citocinas pró-inflamatórias, com ativação de macrófagos pela via clássica. Desta maneira, a resposta celular de padrão Th1 é caracterizada como anti-fibrótica, com um granuloma bem definido margeado externamente por fibroblastos. Mais internamente aos fibroblastos células T amplamente distribuídas pelo granuloma, algumas células gigantes multinucleadas, pouca densidade de células epitelióides, linfócitos B, células dendríticas, neutrófilos e macrófagos do perfil M2. No centro macrófagos ativados pela via clássica e macrófagos residentes além de fagocitar o agente aqui representado pelo bacilo causador da tuberculose, então contendo esse agente e impedindo sua disseminação. No outro extremo, se a resposta é conduzida ao padrão de resposta Th2, há ativação de macrófagos pela via alternativa e predomínio de citocinas anti-inflamatórias e pró-fibróticas, com um granuloma formado por um halo linfoplasmocitário, com fibras de colágeno e fibroblastos e ao interior um halo de macrófagos ativados pela via clássica M1, reveste um halo de macrófagos ativados pela via alternativa M2 e em seu interior o agente causador, nesse exemplo ovo de parasito. Já em granulomas da sarcoidose a apresentação de antígeno parece ser constante. Os granulomas possuem fibroblastos localizados mais externamente e em seu interior linfócitos T e em menor quantidade linfócitos B. Mais internamente células gigantes em menor densidade, assim como os macrófagos ativados pela via alternativa. E mais no centro desse granuloma, células epitelióides e macrófagos ativados pela via clássica estão amplamente distribuídos e em maior quantidade. Nesse tipo de granuloma o aumento das citocinas características do perfil de resposta Th1, conduz para a resolução assim como o aumento das citocinas do perfil Th2, conduz para a fibrose (Figura adaptado de Ganesan et al., 2022).

### 1.3. Alterações da Matriz Extracelular (MEC) e a Fibrose

A matriz extracelular (MEC) é uma rede complexa de macromoléculas que proporciona um arcabouço estrutural para os tecidos e influencia o comportamento das células com as quais mantém contato. Essa estrutura é constituída por diversas classes de biomoléculas como glicosaminoglicanos, proteoglicanos, hialuronona, colágenos de vários tipos, fibras elásticas, proteínas especializadas ou moléculas adesivas formadas pela fibronectina, laminina, fibrilina e proteínas de remodelagem de matriz, as denominadas metaloproteases (MMPs). Também são encontradas, além de outras proteínas de matriz, as moléculas de superfície de células como integrinas e mucinas, o que a permite exercer importantes funções relacionadas à adesão, migração ou reconhecimento celular. Recentemente, a matriz extracelular (MEC) tem despertado bastante atenção, devido a sua participação na adesão e sinalização celular, bem como na diferenciação, proliferação, sobrevivência e migração das células (Pollard, 2006; Hynes, 2008; Shapouri-Moghaddam, 2018).

Os diversos colágenos são sintetizados pelos fibroblastos, essas biomoléculas constituem uma classe composta pelas proteínas mais abundantes com funções diversas, encontradas no reino animal, sendo as maiores proteínas constitutivas da matriz extracelular (MEC). No corpo humano são encontrados, vários tipos de colágenos geneticamente distintos que ocorrem em diferentes tecidos conjuntivos (Von Der Mark et al., 1976; Pollard, 2006). Atualmente são descritos vinte e oito tipos de colágenos na literatura, nos focaremos aqui principalmente nos colágenos I e III, denominados como colágenos fibrilares (fibras reticulares), que são sintetizados em moléculas inativas de pré-pró-colágeno, sofrendo processamento intracelular no retículo endoplasmático, tornando-se a forma pró-colágeno, onde é secretada por vesículas pelo complexo de golgi, para fora, da célula onde, a molécula de pró-colágeno sofre atividade enzimática de proteases (Montes, 1996; Pollard, 2006).

Todos os tipos de colágeno, até agora descritos compartilham entre si a origem a partir de uma molécula precursora denominada tropocolágeno, a qual é constituída por três cadeias polipeptídicas, que se enrolam entre si numa configuração estrutural de tríplice hélice. As moléculas de tropocolágeno dão origem às fibrilas colágenas, que por sua vez se dispõem paralelamente para formar as fibras colágenas propriamente ditas (Von Der Mark et al., 1976 ; Montes, 1996; Pollard, 2006; Gordon e Hahn, 2010). O colágeno do tipo I representa o mais comum dos colágenos, forma fibras grosseiras e está presente no tecido conjuntivo propriamente dito, padrão normal da pele, tendão, osso, dentina e cemento. O colágeno do tipo III constitui as fibras reticulares e está fortemente associado ao tipo I. Esta fibra forma um arcabouço estrutural para diversos tecidos, tais como, órgãos linfoides, medula óssea, glândulas, fígado e pulmões (Pollard, 2006; Junqueira e Carneiro, 2011).

As fibras de colágeno fornecem resistência e força aos órgãos e tecidos, servindo também como sustentação para as células da matriz extracelular (MEC) essas fibras não apresentam capacidade de extensão (Pollard, 2006).

Outro abundante componente proteico da matriz extracelular (MEC) são as fibras elásticas, que ao contrário das fibras de colágeno apresentam capacidade de extensão, deformando-se e voltando à sua forma original passivamente. Essas fibras estão distribuídas por todo o corpo, mas abundantemente presentes no tecido conjuntivo da pele, nas paredes de artérias e no pulmão (Montes, 1996; Pollard, 2006; Junqueira e Carneiro, 2011). As fibras elásticas são compostas por micro fibrilas de fibrilina que ligam se de maneira cruzada a elastina, sendo que ambos os componentes são sintetizados por fibroblastos. É descrito que apenas fibroblastos embrionários e os juvenis sintetizam fibras elásticas, as quais tem uma taxa muito baixa de renovação em adultos (Montes, 1996; Pollard, 2006).

Estudos de alterações de matriz extracelular são importantes uma vez que, o processo inflamatório bem como, a ação de células como macrófagos promovem grandes e drásticas alterações na MEC (Friedman, 2004; Chistiakov et al., 2015).

Uma série de alterações, e o desbalanço no microambiente celular corroboram para que a destruição ou mesmo a síntese de compostos da matriz extracelular seja desordenada e excessiva, por exemplo se houver desbalanço entre a atividade dos macrófagos sejam os ativados pela via clássica ou pela via alternativa a atividade inflamatória ou de reparo tendem a ser prejudicados. Considerando a situação em que os macrófagos ativados pela via alternativa sejam maioria e o microambiente rico principalmente nas citocinas, fator transformante beta (TGF $\beta$ ) e interleucinas 10 (IL10), esse desequilíbrio levaria a um maior recrutamento de fibroblastos, com maior síntese de colágenos, o que leva ao estabelecimento de um quadro debilitante, a fibrose (Masseno et al., 2010; Chandrasekaran et al., 2019; Henderson et al., 2020). Esta fibrose promovida pelo desequilíbrio em IL10, acarreta uma síntese excessiva de colágeno I e III, o que acaba por mudar o ambiente ao ponto de se perder a forma, as células nativas e a função, ou simplesmente os efeitos danosos ao tecido proporcionados pela atividade inflamatória exacerbada com predominância de macrófagos ativados pela via clássica e das citocinas interferon gama (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) principalmente (Edward, 2006; Gordon e Hanh, 2010; El Agha et al., 2017; Henderson et al., 2020).

Vários estudos em diversos órgão como rins, pulmões, pele e fígado e outros órgãos descrevem que o fibroblasto exerce um papel importante na secreção de compostos da matriz

extracelular, destacando-se o colágeno em doenças fibrosantes (Roussey et al., 2016; El Agha et al., 2017; Henderson et al., 2020).

Em doenças como a leishmanioses por exemplo, são evidentes alterações relacionados ao colágeno quer seja no homem, (Duarte et al., 1993) quer seja no cão (Moura et al., 2009). Na hanseníase, paracoccidiodomicose, sarcoidose e granulomas de corpo estranho, as lesões inflamatórias cutâneas são descritas na literatura como inflamações crônicas do tipo granulomatosas. Sendo bem característicos nessas inflamações, processo de cura por cicatrização, inclusive a produção excessiva de fibras colágenas principalmente do tipo I e III, (Friedman, 2004; Guyot et al. 2006; Hynes, 2008; Kisseleva e Brenner, 2008; Wynn, 2008).

Assim, a fibrose é o processo mais frequente e bem caracterizado de alteração de matriz extracelular e decorre de eventos altamente coordenados em etapas que incluem: homeostase, inflamação, proliferação e remodelamento. A matriz extracelular (MEC) exerce função central em todas essas fases, instruindo células ou reforçando a síntese de suas moléculas primordiais (Friedman, 2004; Chester e Brown, 2017; Pakshir e Hinz, 2019). A nova MEC deve conter fibras colágenas do tipo I e III, mantenedoras da força mecânica tecidual. Contudo, outras moléculas como o colágeno do tipo IV e do tipo VI, aliadas ao colágeno I e III, são muito importantes para a manutenção da arquitetura tecidual, bem como na quimiotaxia de células produtoras de colágeno, de maneira que no processo de fibrose os colágenos I e III tomam toda a estrutura do órgão, alterando sua morfologia e função (Hynes, 2008; Kisseleva e Brenner, 2008; Wynn, 2008)

É de conhecimento da literatura que a diferenciação de macrófagos classicamente ativados e macrófagos ativados alternativamente no processo da cicatrização e fibrose decorre não só dos estímulos por citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento produzidos no foco inflamatório, mas também da origem desses macrófagos. Esses fagócitos podem ser suscitados no próprio tecido alvo (macrófagos residentes) ou da medula óssea (monócitos). Isso é fato importante porque há diferenças do papel dos mesmos no processo de reparo (Minutti et al. 2017). Mas de qualquer forma é notória a participação de macrófagos no processo de reparo, além da importante função de eliminar restos celulares (“debris” celulares). Subtipos de macrófagos M2, oriundos de um progenitor comum, altamente específicos são conhecidos por sua função pró-fibrótica (Sato et al. 2017). São células capazes de secretar os seguintes fatores relacionados a colagenogênese: (1) arginase-1 que converte arginina em ornitina, etapa bioquímica essencial na biossíntese de prolina necessária para a síntese do fibrila pró-colágena (Hesse et al. 2001); (2) transglutaminases responsáveis por etapas da síntese do colágeno (Lupher, 2006); (3) metaloproteases (MMPs) (MMPs 10, 12, 19, 28) que regulam a síntese e degradação (*turnover*) de fibras pró-colágenas e colágenas de diferentes tipos (Fingleton, 2017);

(4) TGF- $\beta$  importante citocina que exerce papel central da diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, este último expressa receptores para alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), (Masseno et al., 2010; Pakshir e Hinz, 2019). Interessante lembrar que, macrófagos M2 produtores de arginase-1 desviam sua função microbicida com menor produção de óxido nítrico (NO) e radicais livres de oxigênio (ROs) em detrimento à maior síntese de colágeno, o que corrobora para a fibrogenese e remodelação da MEC (Hesse et al. 2001; Gordon e Pluddemann 2017).

Nesse sentido os macrófagos alternativamente ativados na infamação granulomatosa exercem papel fundamental de enclausuramento do agente potencialmente danoso, impedindo sua disseminação e ajudando na sua eliminação por meio de recrutamento de outros macrófagos, linfócitos e plasmócitos seja pela secreção de citocinas próprias, fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas que participam ativamente da reação inflamatória (Friedman, 2004; Guyot, 2006; Edward, 2006; Roussey et al., 2016).

## **2-Justificativa**

Considerando as particularidades de cada doença granulomatosa infecciosa ou não infecciosa, pode-se dizer que todas evidenciam respostas inflamatórias crônicas com exsudato celular constituído predominantemente de macrófagos, linfócitos e plasmócitos, com arranjos especiais denominados “granulomas” (Mosser e Edward, 2008; Roussey et al., 2016; Giorgio et al., 2020). Nessa resposta, os macrófagos diferenciados (ativados pela via clássica ou alternativa), estão circundados por halo de plasmócitos e linfócitos, nessa ordem, caracterizando o granuloma (Edward, 2006; Moura et al., 2012; Chistiakov et al., 2015). Embora a resposta crônica inflamatória, seja observada nas amostras cutâneas de doenças inflamatórias, há ainda uma grande variabilidade histológica entre essas, derivadas do agente etiológico, composição do microambiente, o próprio fato de ser causada por agente infeccioso ou não, entre outras (Kaye e Beattie, 2015; Tomlin e Piccinini, 2018). Não raro, o que se observa é a presença de inúmeros macrófagos formando aglomerados, e, de acordo com a natureza química destes macrófagos haverá diferentes dinâmicas relacionadas a MEC (Souza- Lemos et al., 2008; Aresu et al., 2011; Kanta, 2015).

Portanto, idealiza-se caracterizar macrófagos no espectro das doenças granulomatosas cutâneas, mas em especial buscando elucidar alguns aspectos da diferenciação dos macrófagos M2 relacionados as alterações intersticiais, em especial a collagenogênese e/ou síntese ou destruição de fibras elásticas. Portanto, pretende-se estabelecer a relação desses

macrófagos com as alterações relacionadas as fibras colágenas e elásticas na MEC. (Friedman, 2004; Guyot et al., 2006; Gordon e Hahn, 2010).

Estudos *in vitro* demonstram que, CD163 tem sido indicado como um marcador de macrófagos M2. CD163 é uma glicoproteína de 130-kd pertencente à família dos receptores captadores de radicais livres (scavengers receptors) ricos em cisteína presentes em monócitos/macrófagos. A expressão desse receptor é controlada por vários mediadores químicos tais como o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10) e glicorticóides. Por outro lado, segundo Gordon (2005), Edward et al., (2006) Guyot et al. (2006), para macrófagos, o marcador em potencial, mas com algumas críticas seria o receptor CD68. Este receptor localiza-se nos lisossomas, fagossomas e nos grânulos de monócitos/macrófagos, com identificação intracelular diversificada mediante emprego dos anticorpos monoclonais. Todavia, esses anticorpos geralmente identificam a organela e não o tipo celular e assim, não seriam marcadores de células originadas unicamente de monócitos/macrófagos. Ambos os antígenos são ferramentas importantes podendo ser usadas para discernimento de macrófagos M1 e M2 (Hogger et al., 1998; Mosser, 2003; Lau et al., 2004; Mosser e Edwards, 2008; Moura et al., 2012).

Apesar da classificação de macrófagos em M1 e M2 persistir na literatura, outras pesquisas científicas indicam que outros tipos de macrófagos devem entrar nessa classificação, por apresentarem características bioquímicas e funcionais distintas (Edward et al., 2006; Chistiakov et al., 2015).

Baseando-se na ideia de que a natureza do estímulo (agentes antigênicos) ou uma combinação deles podem provocar profundas alterações fisiológicas nos macrófagos vários autores como Mosser (2003), Gordon e Taylor (2005), Edwards et al., (2006), Mosser e Edwards (2008), Chistiakov et al., (2015) argumentam que diferentes subpopulações de macrófagos existem, e devem ser consideradas na patogenia das doenças. Por exemplo, há uma maior expressão dos receptores transmembrana específicos de células dendríticas (Dendritic cell-specific transmembrane protein – DCSTAMP) e a metaloprotease 10 (MMP10) em macrófagos de pacientes com LTA, assim como são descritas várias subpopulações de macrófagos em estudos relacionados a aterosclerose. Portanto, acredita-se, que os espectros das doenças granulomatosas infecciosas e não infecciosas poderiam ser modelos importantes para um estudo da caracterização desses macrófagos M1 e M2 (Mosser e Edwards, 2008; Chistiakov et al., 2015).

Desta maneira, busca-se traçar padrões de relação entre as mudanças observadas e as quantificações celulares de áreas em componentes e células da MEC, associando sua ocorrência a quantificação e ao tipo de macrófago predominante no infiltrado inflamatório.

### **3 - Objetivos**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Realizar o estudo quantitativo da matriz extracelular (MEC) e estudo imuno- histoquímico do exsudato inflamatório granulomatoso em pele de pacientes com doenças granulomatosas infecciosas e não infecciosas.

#### **3.2 - Objetivos Específicos**

- Analisar qualitativa e quantitativa por microscopia optica e emprego de colorações histológicas especiais, a inflamação e as fibras colágenas (fibras reticulares) e elásticas (MEC) das amostras histológicas de pele de pacientes com as doenças infecciosas LTA, hanseníase virchowiana e a paracoccidioidomicose e as granulomatosas não infecciosas, a sarcoidose e granuloma de corpo estranho.
- Analisar qualitativa e quantitativamente por imuno-histoquímica marcadores celulares de miofibroblastos (marcadores mesenquimais – alfa actina e vimentina) e alguns marcadores de macrófagos (CD68 e CD163) nos fragmentos de pele nos casos de LTA, hanseníase, paracoccidioidomicose, sarcoidose e granuloma de corpo estranho.
- Correlacionar os achados imuno-histoquímicos com as alterações histológicas de matriz extracelular (MEC) nas diferentes doenças granulomatosas estudadas.

## **4 – Metodologia empregada**

### **4.1- Avaliação histológica e seleção dos blocos de tecidos parafinados**

#### **4.1.1- Amostras cutâneas (Leishmaniose Tegumentar americana, Hanseníase virchowiana, Paracoccidiodomicose, Sarcoidose e Granuloma de Corpo Estranho) e Comitê de Ética**

Amostras cutâneas (biópsias) processadas pelas técnicas rotineiras de histologia e posteriormente emblocadas em parafina foram utilizadas para esse estudo. Essas amostras foram obtidas de biópsias de pacientes com diferentes doenças granulomatosas infecciosas e não infecciosas ou produtos de exérese cirúrgica para diagnóstico e posterior tratamento. Todas eram oriundas do arquivo do Laboratório de Dermatopatologia da Divisão de clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas, Núcleo de Dermatologia FMUFMG. Quinze casos (amostras cutâneas parafinada) para cada patologia foi organizada da seguinte maneira: seguintes patologias foram então investigadas:

Grupo Doenças Granulomatosas Infecciosas (quinze casos): Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), Hanseníase (forma virchowiana), e Paracoccidiodomicose

Grupo Doenças Granulomatosas não infecciosas (quinze casos) e Granuloma de Corpo Estranho e Sarcoidose.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – HCFMUSP, sob número do parecer de 4.919.439 em 20 de agosto de 2021.

### **4.2- Colorações histológicas**

#### **4.2.1- Técnica da Hematoxilina-Eosina (HE)**

Os blocos parafinados dos fragmentos de pele foram cortados em micrótomo 3  $\mu$ M, hidratados em série alcoólica decrescente (absoluto I, absoluto II, 90%, 80% e 70%) e água corrente, e, em seguida corados com hematoxilina, posteriormente o excesso da coloração foi retirado com lavagem em água corrente. Os cortes foram submetidos a coloração de eosina, após, desidratados

em série alcoólica crescente (70%, 80%, 90%, absoluto II e absoluto I) e as lâminas foram diafanizadas e montadas com resina.

#### **4.2.2-Estudo histoquímico das fibras elásticas (Verhoeff, 1908)**

Para marcação das fibras elásticas utilizou-se a coloração histoquímica de *Verhoeff*, que consiste no uso de solução de hematoxilina alcoólica a 10%, cloreto férrico 10% e iodo, onde há impregnação desse composto nas fibras elásticas, evidenciando estas estruturas na coloração negra. Para essa técnica os cortes foram desparafinados em dois banhos de xilol, hidratados em série alcoólica decrescente (absoluto I, absoluto II, 90%, 80% e 70%), e água corrente. Em seguida foram submetidos à solução corante de fibras elásticas de uso diário de *Verhoeff*, lavados em água corrente, e mergulhados em água destilada. A diferenciação das amostras foi realizada com solução de cloreto férrico a 2%, até que se veja as fibras elásticas em coloração negra e um fundo cinza claro, as amostras foram submetidas a solução de tiosulfato de sódio 2%, em seguida foram submetidas a banho imersivo em água destilada, após foram contra coradas com a solução corante de *Van Gieson*, havendo a desidratação direta em série alcoólica crescente (70%, 80%, 90%, absoluto II e absoluto I) após a contra coloração, diafanização e montagem das lâminas com resina. Como controle positivo da reação foram usadas amostras de corte de 3  $\mu$ M de artérias de cães, conservadas em blocos de parafina, oriundas do acervo do laboratório de Patologia das leishmanioses, onde pode verificar-se marcação na membrana elástica interna bem delineada e fibras elásticas dispersas que formam a camada adventícia.

#### **4.2.3- Estudo histoquímico de fibras reticulares (Gomori, 1937)**

Para a marcação das fibras reticulares, utilizou-se a coloração histoquímica *Prata Amoniacal de Gomori* na qual estas fibras de colágeno do tipo III são destacadas em negro pela impregnação da solução corante a base de nitrato de prata, (Gonçalves et al., 2007; Madeira et al. 2017). Os cortes histológicos foram desparafinados em banhos de xilol, hidratados em série alcoólica decrescente (absoluto I, absoluto II, 90%, 80% e 70%) e água corrente, sensibilizadas com solução de permanganato de potássio 0,5%, o que deixou os cortes com coloração arroxeada escura, foram lavados e diferenciados em solução de ácido oxálico 3%, com os cortes adquirindo novamente a coloração branca. As lâminas em seguida foram lavadas em água corrente e sensibilizadas com solução de sulfato férrico amoniacal 2%, posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente e em banhos de imersão na água destilada, após, as lâminas foram

coradas com a solução de prata amoniacal de gomori, lavadas rapidamente em banho de imersão em água destilada, redução no formol 20%.

Em sequência, as lâminas foram lavadas em água corrente, submetidas a solução de cloreto de ouro 0,2%, lavadas em banhos imersivos em água destilada, houve em sequência, a passagem das lâminas em solução de tiosulfato de sódio 2%, então as lâminas foram, lavadas em água corrente novamente, contra coradas em solução corante de verde luz 1%, desidratadas em série crescente alcoólica (70%, 80%, 90%, absoluto II e absoluto I), diafanizadas e montadas com resina.

Como controle positivo da reação, foram usadas amostras de corte de 3  $\mu$ M de fígado de cães, conservadas em blocos de parafina, oriundas do acervo do LPL, onde a marcação possibilita a visualização bem definida das fibras reticulares no parênquima hepático de cães com processo de fibrose com leishmaniose visceral.

#### **4.3-Técnica da estreptoavidina-peroxidase - Imuno-histoquímica para marcação de miofibroblastos e macrófagos**

Os cortes histológicos parafinados de pele foram fixados em lâmina gelatinizadas; sendo posteriormente desparafinados em banhos de xilol, e hidratados em álcoois decrescentes e submetidos a um banho em PBS ("Phosphate Buffer Saline- pH 7,2 0,01M) a 10%.

Como método escolhido para a recuperação antigênica utilizamos a solução de tampão citrato pH 6, para o bloqueio da peroxidase endógena, adicionando-se ao banho de PBS o peróxido de hidrogênio (30 volumes diluído a 4% em PBS), a temperatura ambiente. As lâminas foram, então, cobertas com solução de bloqueio (leite em pó desnatado diluído em PBS), e incubadas em câmara úmida à temperatura ambiente. Logo após, os anticorpos primários específicos para miofibroblastos (marcadores celulares mesenquimais) (**Tabela 1**) e marcadores de macrófagos M2 (**Tabela 2**) foram adicionados em quantidade suficiente para recobrir os fragmentos, sendo as lâminas incubadas por 18 a 24 horas em câmara úmida, a 4°C. A seguir, adicionamos adicionado o ligante ultra vision large volume detection system anti-polyvalent, HRP - ready to use - Lab Vision (e as lâminas foram novamente incubadas em câmara úmida por 60 minutos à temperatura ambiente). As lâminas foram lavadas em lavadas em banhos de PBS, e coradas com DAB, lavadas em água corrente, e contra coradas com H.E (hematoxilina-eosina), lavadas em água corrente para retirada do excesso do corante, desidratadas em série alcoólica crescente (álcool 70%, 80%, 90%, absoluto II e absoluto I) e diafanizadas e montadas em resina.

**TABELA 1- Miofibroblastos (Marcadores Celulares Mesenquimais)**

$\alpha$ -actina (1A4)	1:100	Dako/M0851
Vimentina (V9)	1:100	Dako

**TABELA 2 – Marcadores de Macrófagos Teciduais M1 e M2**

Rabbit anti-CD163 Policlonal M2	1/100	Spring/E18684**
Mouse anti- CD68 Clone PG-M1	1/100	Dako/M0876**
M2		
Mouse anti Fator XIIIa+		Dako
polyclonal	1/100	

Como controle negativo das reações imuno-histoquímicas foram usadas amostras de corte de 3  $\mu$ M de pele de cães, conservadas em blocos de parafina, oriundas do acervo do laboratório de Patologia das leishmanioses, onde na primeira etapa da reação utiliza-se somente o diluente dos anticorpos primários (PBS).

Como controle positivo da reação foram usadas amostras de corte de 3  $\mu$ M de pele de cães, conservadas em blocos de parafina oriundas do laboratório de Patologia das leishmanioses, onde utilizou-se anticorpo primário constituído de anticorpo anti- *Leishmania sp.* (Tafuri et al., 2004).

#### 4.4-Análise das células e proteínas marcadas

Após execução de marcação das proteínas da matriz extracelular e de macrófagos e da realização das colorações especiais foram capturadas 20 imagens no aumento de 40x utilizando-se microscópio óptico Olympus BX40 AXIOSKOP 2 e QR Capture, de cada corte histológico aleatoriamente. Em seguida, as imagens foram digitalizadas criando-se um banco de dados. A análise quantitativa da área de imunomarcagem celular aos diversos antígenos foi avaliada pelo software IMAGEJ com auxílio do *plugin* Colour Deconvolution2.

#### 5-Análise estatística

As análises estatísticas para a expressão de todos os marcadores celulares de inferências foram realizadas utilizando-se o software GRAPHPAD PRISM 7 e RCOMMANDER. De acordo com a natureza da distribuição dos dados obtidos, para as quantificações nas amostras de pele, foram submetidos os seguintes testes: (1) O teste do Coeficiente de Correlação de

Spearman para análises de correlação dentro de um mesmo grupo. Considerou-se de relevância os valores onde o  $P$  é menor que 0,05. (2) O teste Kruskal-Wallis para conjunto de dados não paramétricos e One-Way ANOVA para conjuntos de dados paramétricos, subsequente múltipla comparação de Conover (1999), para análises de múltipla comparação foi aplicado e Valores considerados com significância foram aqueles onde o valor de  $P$  era menor que 0,05.

## 6- Resultados

### 6.1. Análises da HE e Colorações Especiais

Após análise microscópica, da coloração de rotina hematoxilina-eosina (HE) constatou-se que as amostras de LTA e hanseníase virchowiana não apresentavam granulomas bem-organizados ou bem definidos como nódulos. Todavia, notou-se com grande frequência a presença de macrófagos com citoplasma amplo e hipocorado, e núcleo vesiculoso (cromatina frouxa) e nucléolos evidentes, característicos de células epitelióides. Entretanto, estes grupos apresentaram maior destruição e desorganização tecidual, podendo-se observar o agente etiológico (protozoários), no citoplasma de macrófagos, bem como a mudança de seu citoplasma com aquisição de aspecto vacuolizado, característicos dos casos da infecção celular pelas formas amastigotas de *Leishmania* e os bacilos de Hansen na LTA e hanseníase virchowiana, respectivamente. Por outro lado, nos casos de sarcoidose, os granulomas eram bem-organizados, com macrófagos centrais (células epitelióides), halo de linfócitos e cápsula fibrosa delimitante. Todavia, nesse grupo houve menor destruição tecidual, porém uma maior deposição de colágeno em um processo mais organizado, comparando-se a LTA e hanseníase virchowiana.

Em granuloma de corpo estranho e paracoccidiodomicose, os granulomas são bem-organizados e apresentam cápsula fibrótica fazendo a sua delimitação. Grandes números de células multinucleadas puderam ser observados quando comparados aos outros grupos, destacando-se o grupo paracoccidiodomicose,

Por fim, todas as amostras apresentaram deposição de fibras colágenas (fibropose) acompanhando o exsudato celular inflamatório. Essas fibras colágenas eram observadas ora entremeando a área central dos granulomas ou ora acompanhando o halo linfoplasmocitário bem-organizado mais externamente. No caso da LTA e da hanseníase virchowiana, observou-se exsudato inflamatório crônico de mononucleares predominantemente composto

de macrófagos, células epitelióides, linfócitos, mas preferencialmente difuso na derme papilar e focal ao redor de vasos e anexos da derme reticular. Raramente havia organização concêntrica desse exsudato com células epitelióides ao centro e halo linfoplasmocitário na periferia caracterizando granulomas típicos (Figura 2 A-E).

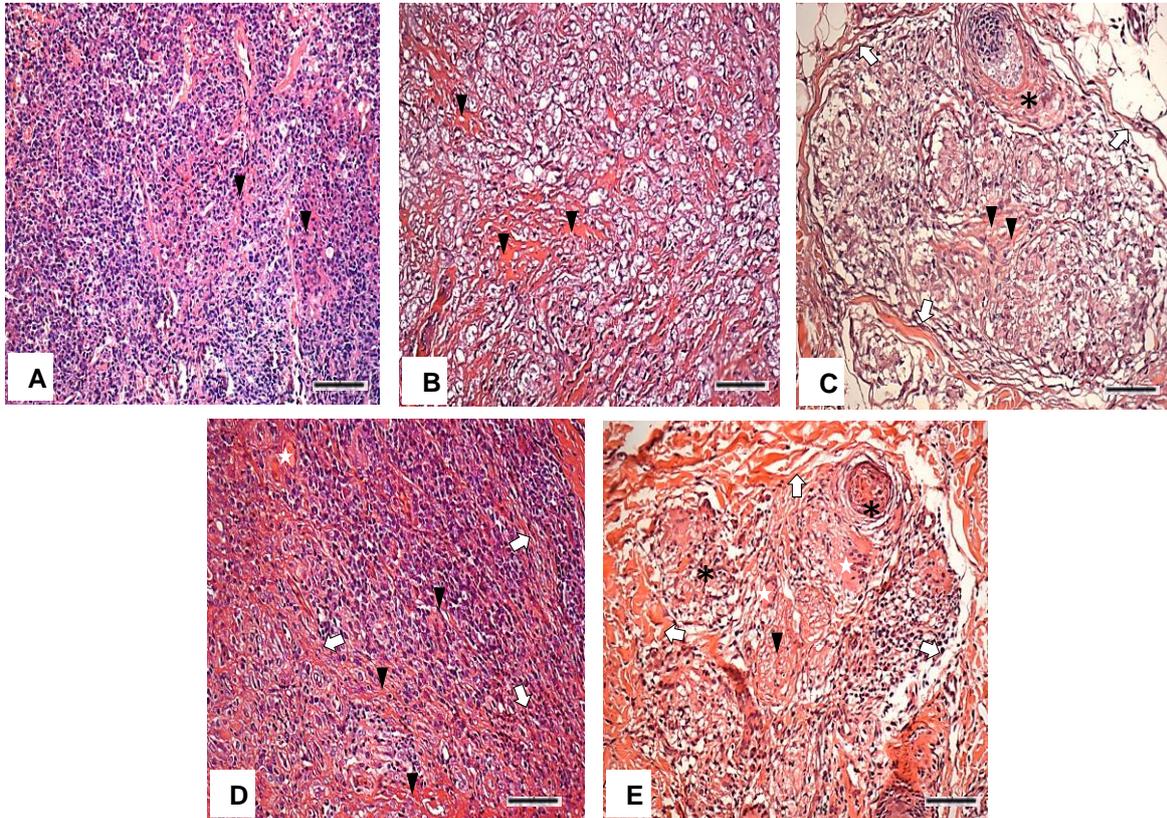


Figura 2 (A-E) -Pele humana corada em hematoxilina e eosina (H&E), com doenças granulomatosas. A) Leishmaniose tegumentar americana, intenso infiltrado inflamatório de natureza crônica com plasmócitos, linfócito e macrófagos epitelióides, formando o granuloma de arranjo frouxo, sem organização e áreas de deposição de matriz extracelular (MEC), (cabeça de seta). B) hanseníase virchowiana, intenso infiltrado inflamatório histiocitário, macrófagos vacuolizados característicos pela infecção pelo *Mycobacterium leprae*, granuloma frouxo com interposição de MEC (Cabeça de seta). C) Sarcoidose, infiltrado inflamatório histioplasmocitário com granuloma compacto bem definido, circunscrito por cápsula fibrosa (seta branca), em detalhe MEC (cabeça de seta). É possível observar um granuloma maior envolvido em cápsula fibrosa (setas brancas), com granulomas bem definidos menores em seu interior, todos compactos e circunscrito por cápsula fibrosa (\*) D) granuloma de corpo estranho com infiltrado inflamatório histioplasmocitário, evidente também a MEC permeando o interior do granuloma (cabeça de seta) delimitação de cápsula fibrosa envolvendo o granuloma compacto (setas brancas), presença de células gigantes multinucleadas (estrela branca). E) Paracoccidioidomicose, infiltrado inflamatório histioplasmocitário, com granuloma compacto revestido de cápsula fibrosa em detalhe (setas), em detalhe interposição de MEC (setas pretas). É possível observar a organização de granulomas internos menores bem circunscritos cápsula fibrosa (\*) observa-se ainda a presença de células gigantes multinucleadas permeando toda a estrutura do granuloma (estrela branca). Barra em 50 µm.

## 6.2. Expressão de antígenos de macrófagos CD68, CD163 e análises morfométricas e imuno-histoquímicas

Em geral, para todos os casos estudados, as marcações dos antígenos CD68 e CD163 foram observadas nas células inflamatórias distribuídas difusamente na derme papilar e profunda e/ou nas células que compõem os granulomas, majoritariamente macrófagos.

Análises comparativas da expressão de células CD68 (CD68+) demonstraram uma maior área de quantificação para este marcador no grupo granuloma de corpo estranho, houve também diferença entre as médias dos grupos LTA, hanseníase virchowiana e sarcoidose. Além disso, o grupo paracoccidioidomicose também apresenta semelhança de área de marcação com leishmaniose tegumentar americana, mas difere sua média dos grupos hanseníase virchowiana e sarcoidose. Nas imagens histológicas é possível observar a diferença nas áreas de marcações para as diferentes doenças, sendo visível a maior área de marcação em dourado em granuloma de corpo estranho, seguidos de paracoccidioidomicose (Figura 3 A-E).

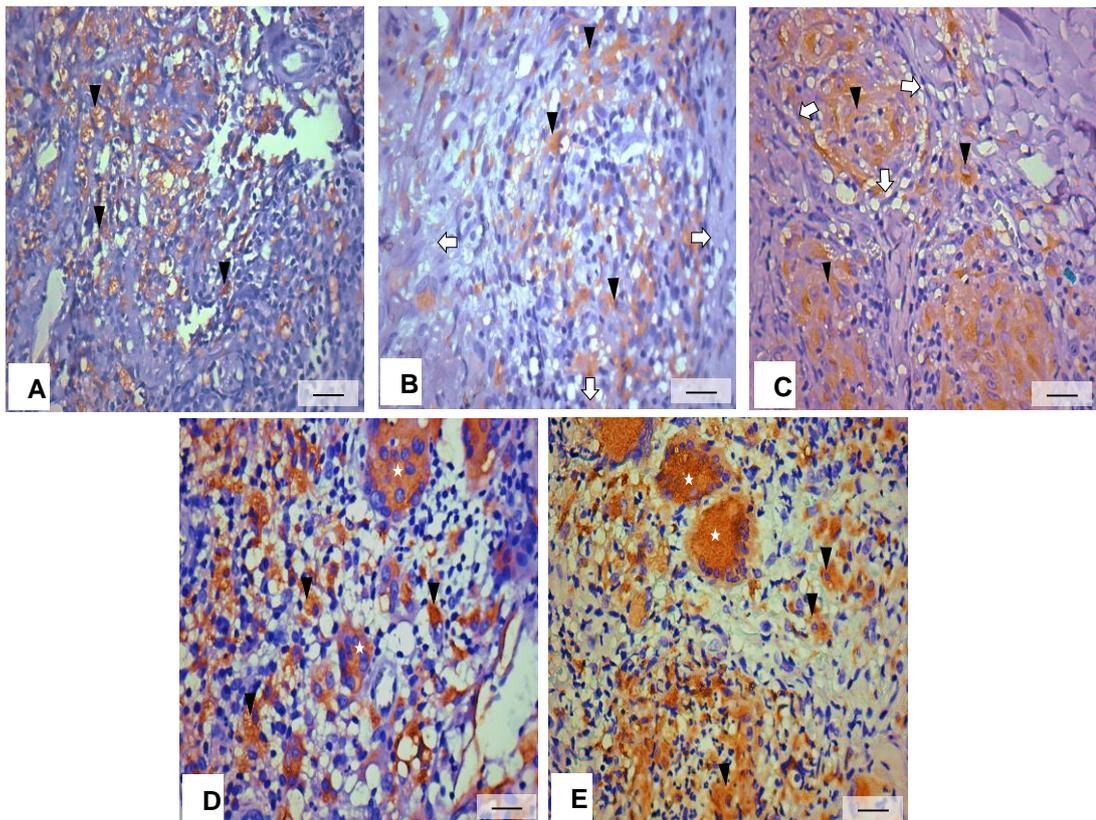


Figura 3 (A-E) - Peles humanas com marcação imuno-histoquímica de CD68+ em doenças granulomatosas. A) Leishmaniose tegumentar americana, é possível observar os limites do granuloma de arranjo frouxo (setas brancas), com células CD68+ em dourado (cabeças de seta) permeando o granuloma e o foco inflamatório. B) Hanseníase, os limites do granuloma podem ser vistos (setas brancas) arranjo frouxo com células CD68+ em dourado (cabeças de seta) permeando o granuloma e foco inflamatório C) Sarcoidose, granulomas bem definidos com cápsula fibrosa evidente (setas brancas), células CD68+ em dourado (cabeças de seta) permeiam quase que totalmente a área interna desses granulomas. D) Granuloma

de corpo estranho, células CD68+ em coloração dourada (cabeças de seta) permeiam todo o foco inflamatório, evidente nesse foco inflamatório a presença de células gigantes multinucleadas CD68+ (estrelas brancas) presentes no foco inflamatório. O núcleo destas células está disperso pelo citoplasma sem uma organização, sugestivos de células gigantes de corpo estranho. E) Paracoccidioidomicose, em detalhe delimitação do granuloma compacto e bem definido com cápsula fibrótica evidente (setas brancas), células CD68+ em dourado (cabeças de seta) permeiam todo o interior do granuloma, assim como células gigantes multinucleadas CD68+ estão presentes (estrelas brancas), notar que nestas células os núcleos estão organizados dispendo se na periferia citoplasmática em forma de ferradura, sugestivo de células gigantes de Langhans. Barra em 20  $\mu\text{m}$ .

As menores áreas de marcação são observadas no grupo hanseníase virchowiana, seguido de sarcoidose e leishmaniose tegumentar americana. Nos grupos hanseníase virchowiana e sarcoidose foram observadas semelhanças entre as médias de quantificação para este marcador, porém estas médias são diferentes dos demais grupos estudados (Figura 4).

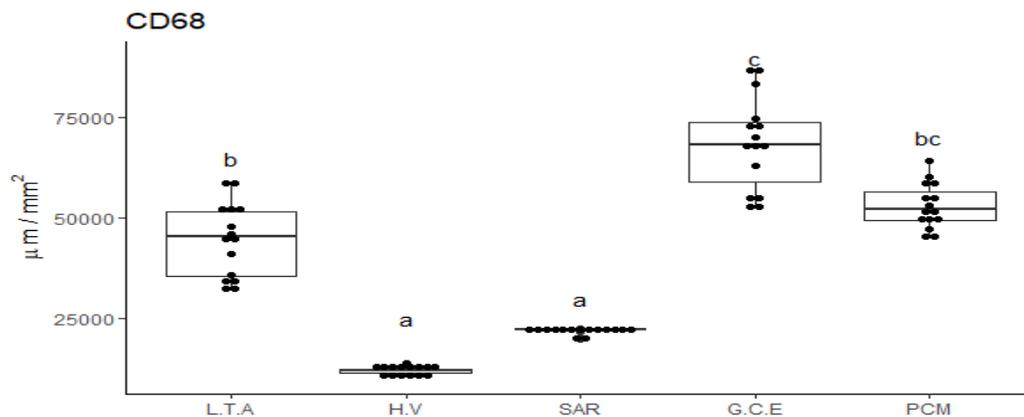


Figura 4- Gráfico de Comparação da área em  $\mu\text{m}/\text{mm}^2$  de células CD68+ em diferentes patologias. Essas variáveis não atenderam os pressupostos da ANOVA e foram avaliadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pela comparação múltipla de Conover (1999). Letras diferentes em um mesmo gráfico indicam diferença estatística entre as patologias pelo pós-teste ( $p < 0,05$ ). (L.T. A= LEISHMANIOSE TEGUMENTAR, H.V= HANSENÍASE VIRCHOWIANA, S.A.R= SARCOIDOSE, G.C.E = GRANULOMA DE CORPO ESTRANHO, P.C.M= PARACOCÍDIOIDOMICOSE).

Na observação qualitativa histológica verificamos que, a área de células CD163 positivas (CD163+) foi maior no grupo dos casos do granuloma de corpo estranho, seguido dos grupos de casos da paracoccidioidomicose e da LTA. Por outro lado, as menores áreas de células marcadas foram observadas em hanseníase virchowiana e sarcoidose (Figura 5 A-E).

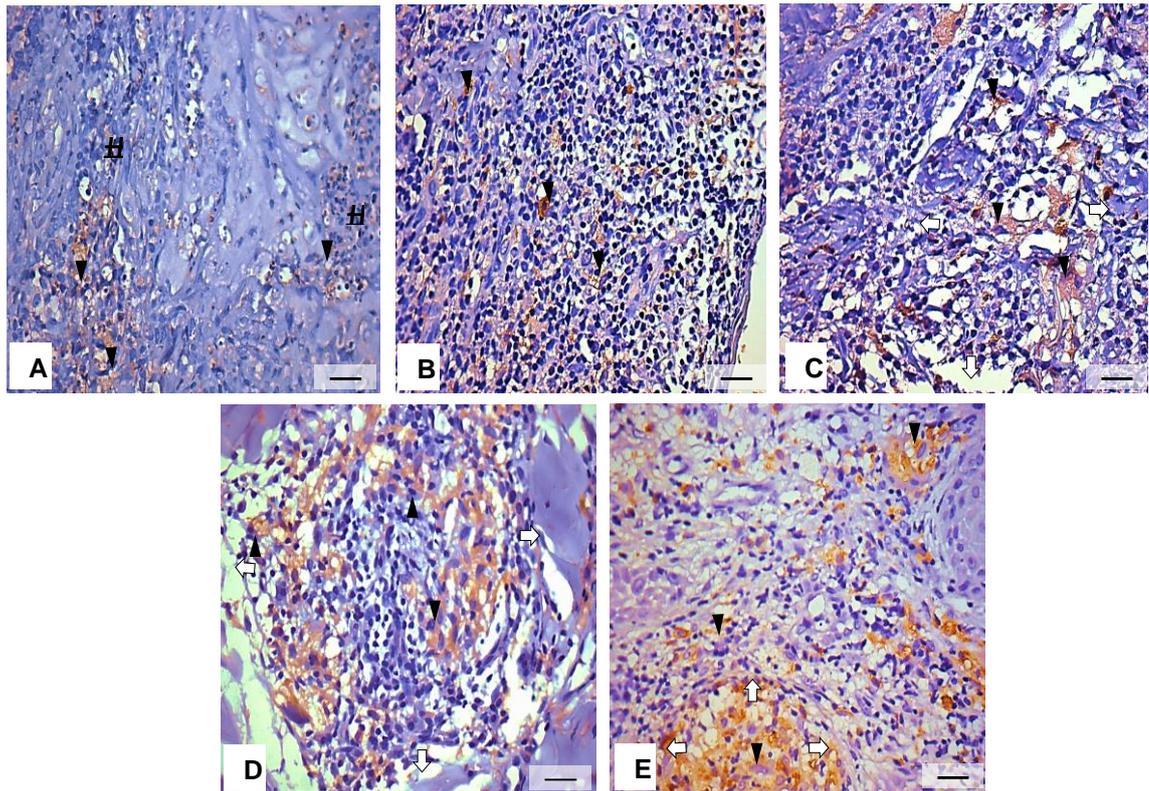


Figura 5 (A-E) - Peles humanas com marcação imuno-histoquímica de CD163+ em doenças granulomatosas. A) Leishmaniose tegumentar americana, em evidência área onde é possível observar *Leishmania brasiliensis* visíveis dentro do citoplasma de macrófagos (#), em dourado observa-se células CD163+ (cabeças de seta) permeando todo o foco inflamatório B) Hanseníase, é possível observar um arranjo de granuloma frouxo, com células CD163+ de coloração dourada permeando o granuloma (cabeças de seta) C) Sarcoidose, em dourado é possível observar células CD163+ (cabeças de seta) com interposição de MEC pelo foco inflamatório e delimitação de um granuloma (setas brancas). D) Granuloma de corpo estranho, delimitação do granuloma (setas brancas) com células CD163+ em dourado (cabeças de seta) permeando o interior do granuloma. E) Paracoccidioidomicose, granuloma compacto e bem definido (setas brancas) com seu interior permeado por células CD163+ (cabeças de seta). Barra em 20  $\mu\text{m}$ .

No sentido causal da inflamação granulomatosa não foram observadas diferenças estatísticas quando comparamos a sarcoidose, porém para granuloma de corpo estranho foi observado diferença estatísticas dos demais grupos (Figura 6).

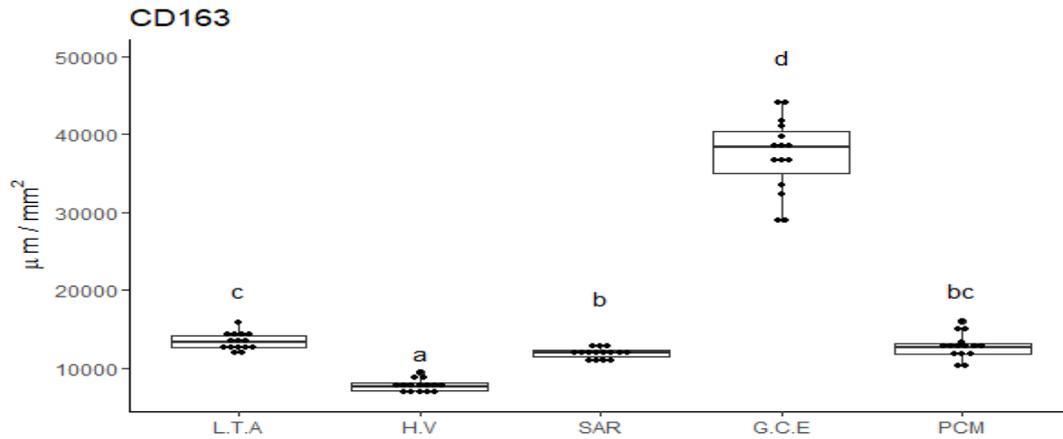


Figura 6- Gráfico de Comparação da área em  $\mu\text{m}/\text{mm}^2$  de células CD163+ em diferentes patologias. Essas variáveis não atenderam os pressupostos da ANOVA e foram avaliadas pelo teste não paramétricos de Kruskal-Wallis seguido pela comparação múltipla de Conover (1999). Letras diferentes em um mesmo gráfico indicam diferença estatística entre as patologias pelo pós-teste ( $p < 0,05$ ). (L.T.A= LEISHMANIOSE TEGUMENTAR , H.V= HANSENÍASE VIRCHOWIANA, S.A.R= SARCOIDOSE, G.C.E = GRANULOMA DE CORPO ESTRANHO, P.C.M= PARACOCCÍDIOIDOMICOSE).

Pela análise entre a razão das células CD68+/CD163+ podemos observar que hanseníase virchowiana, sarcoidose e granuloma de corpo estranho apresentam médias de quantidade de células M2 estatisticamente parecidas, sendo observados nesses grupos as maiores proporções de macrófagos M2 em relação aos demais grupos diferindo dos grupos leishmaniose tegumentar americana e paracoccidioomicose que apresentam médias de células M2 estatisticamente semelhantes e proporções de M2 menores comparadas aos demais grupos analisados (Figura 7).

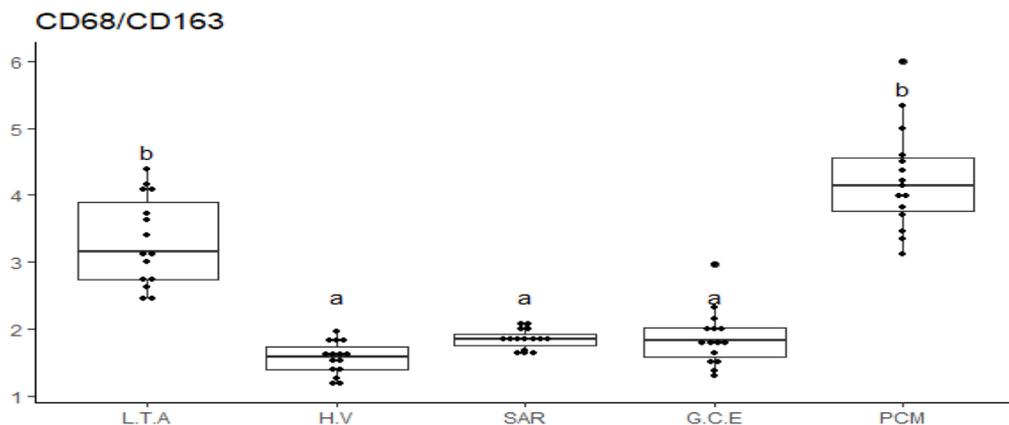


Figura 7-Gráfico demonstrativo da razão de CD68/CD163 nas doenças granulomatosas infecciosas e não infecciosas. Essas variáveis não atenderam os pressupostos da ANOVA e foram avaliadas pelo teste não paramétricos de Kruskal-Wallis seguido pela comparação múltipla de Conover (1999). Letras diferentes em um mesmo gráfico indicam diferença estatística entre as patologias pelo pós-teste ( $p < 0,05$ ). (L.T.A= LEISHMANIOSE TEGUMENTAR , H.V= HANSENÍASE VIRCHOWIANA, S.A.R= SARCOIDOSE, G.C.E = GRANULOMA DE CORPO ESTRANHO, P.C.M= PARACOCCÍDIOIDOMICOSE).

Na análise histológica das células positivas para o Fator XIIIa (Fator XIIIa+), observou-se que no total dos casos estudados no grupo da hanseníase virchowiana houve uma maior média de área de células positiva, seguida do grupo da paracoccidioidomicose e granuloma de corpo estranho as menores médias de área deste marcador são observadas em LTA e sarcoidose (Figura 8 A-E).

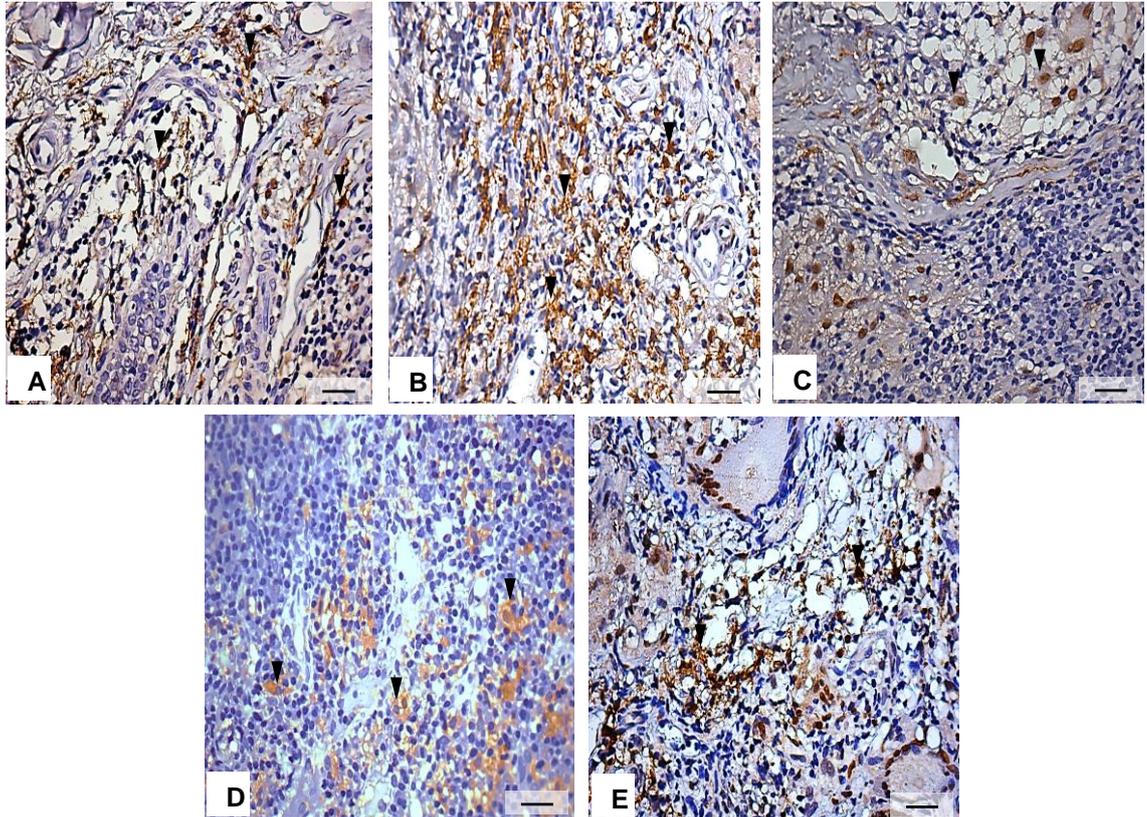


Figura 8 (A-E) - Peles humanas com marcação imuno-histoquímica de Fator XIIIa+ em doenças granulomatosas. A) Leishmaniose tegumentar americana. B) Hanseníase. C) Sarcoidose. D) Granuloma de corpo estranho. E) Paracoccidioidomicose. Em detalhe (cabeças de seta) é possível observar células dendríticas dérmicas Fator XIIIa+. Barra em 20  $\mu$ m.

Observando a figura, na análise comparativa de área de células Fator XIII+, o grupo de casos da hanseníase virchowiana apresentou médias diferentes estatisticamente dos grupos LTA, sarcoidose e granuloma de corpo estranho. Entretanto, este grupo apresentou médias de área estatisticamente semelhantes com paracoccidioidomicose. LTA apresentou médias de área estatisticamente semelhantes a sarcoidose e granuloma de corpo estranho. Os grupos sarcoidose e granuloma de corpo estranho apresentaram áreas estatisticamente distintas (Figura 9).

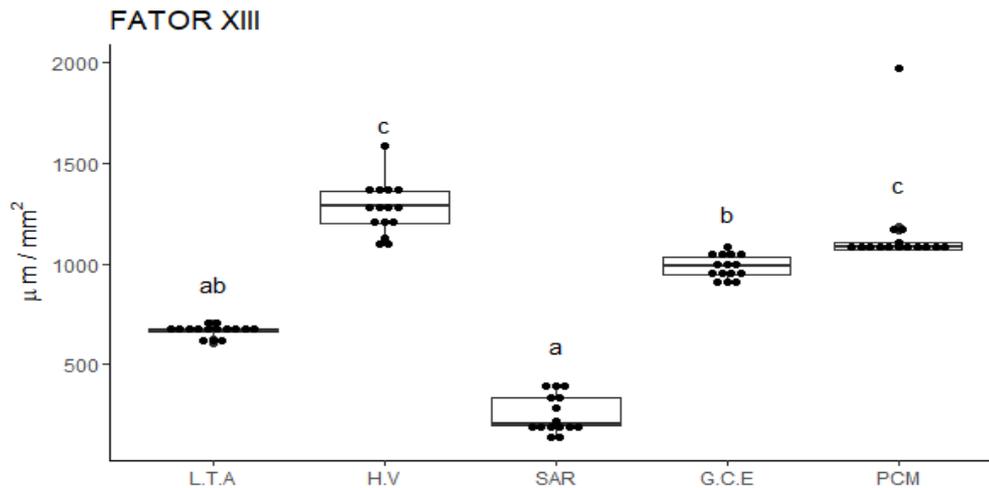


Figura 9 – Gráfico de Comparação da área em  $\mu\text{m}^2$  de células Fator XIIIa+ em diferentes patologias. Essas variáveis não atenderam os pressupostos da ANOVA e foram avaliadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pela comparação múltipla de Conover (1999). Letras diferentes em um mesmo gráfico indicam diferença estatística entre as patologias pelo pós-teste ( $p < 0,05$ ). (L.T.A= LEISHMANIOSE TEGUMENTAR, H.V= HANSENÍASE VIRCHOWIANA, S.A.R= SARCOIDOSE, G.C.E = GRANULOMA DE CORPO ESTRANHO, P.C.M= PARACOCÍDIOIDOMICOSE).

Em relação ao estudo da expressão de vimentina as análises histológicas revelaram células inflamatórias positivas (marcação citoplasmática) distribuídas difusamente na derme papilar e reticular, e aquelas células constituintes dos granulomas, incluindo macrófagos epitelióides e células gigantes (Figura 10 A-E).

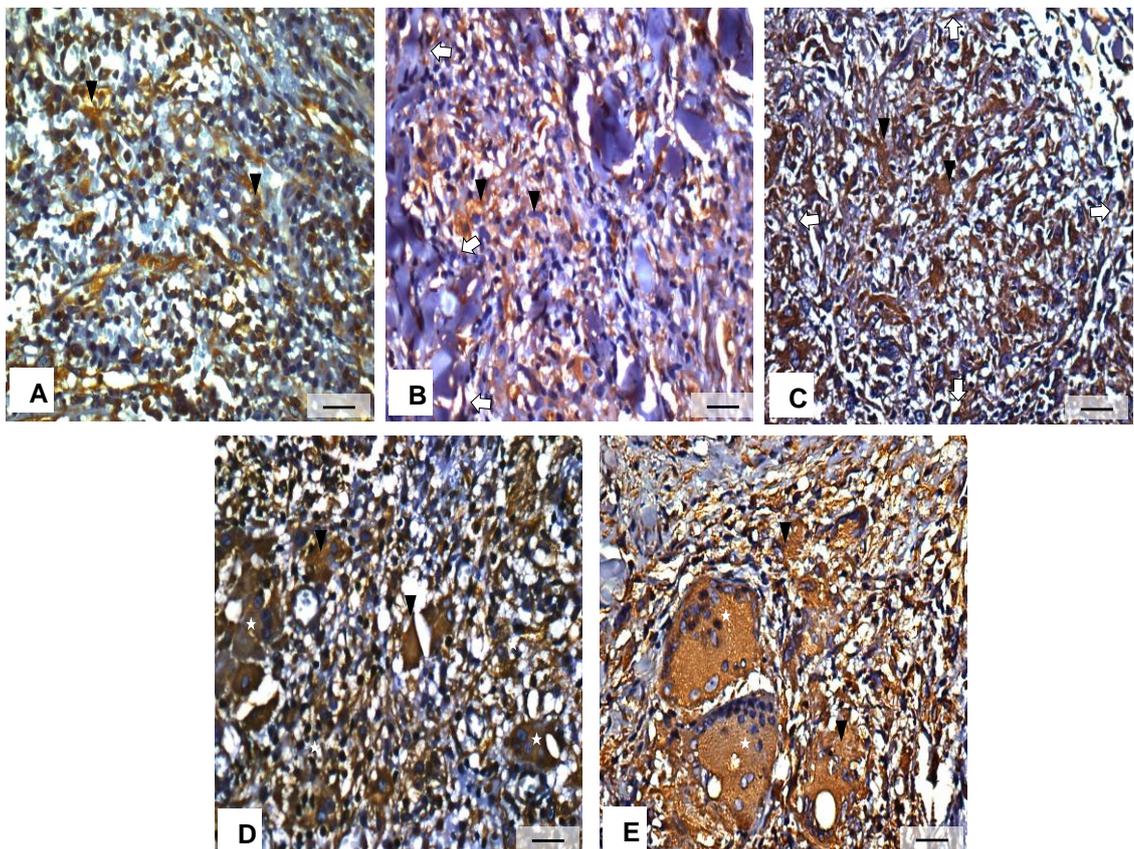


Figura 10 (A-E) - Peles humanas com marcação imuno-histoquímica de vimentina+. A) Leishmaniose tegumentar americana, evidenciando em marrom acastanhado células vimentina positiva (pontas da seta). B) Hanseníase, limites de um granuloma desorganizado e impreciso (setas brancas), células vimentina+ em marrom acastanhado em evidência (pontas da seta). C) Sarcoidose, observa-se a delimitação de um granuloma bem delimitado (setas brancas), com células marrons acastanhadas, vimentina+ permeando todo o seu interior e adjacência (pontas de seta). D) Granuloma de corpo estranho, em detalhe células marrons acastanhadas vimentina+ (pontas de seta) permeiam todo o foco inflamatório. E) Paracoccidioidomicose, em detalhe células marrons acastanhadas vimentina+ (pontas de seta) com várias células gigantes de corpo estranho visíveis (estrelas brancas) presentes no foco inflamatório. Barra em 20  $\mu\text{m}$ .

Análises quantitativas revelaram maiores áreas de células positivas nos casos dos grupos da paracoccidioidomicose seguido de granuloma de corpo estranho e sarcoidose. Já os menores valores para este marcador foram observados em hanseníase virchowiana e leishmaniose tegumentar americana (Figura 11).

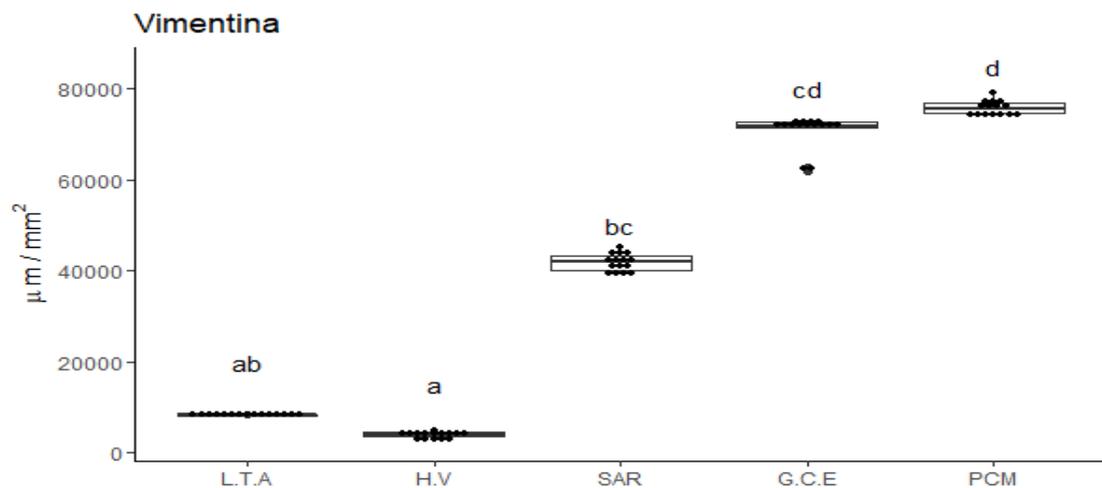


Figura 11- Gráfico de Comparação da área em  $\mu\text{m}/\text{mm}^2$  de células vimentina+ em diferentes patologias. Essas variáveis não atenderam os pressupostos da ANOVA e foram avaliadas pelo teste não paramétricos de Kruskal-Wallis seguido pela comparação múltipla de Conover (1999). Letras diferentes em um mesmo gráfico indicam diferença estatística entre as patologias pelo pós-teste ( $p < 0,05$ ). (G.C.E = GRANULOMA DE CORPO ESTRANHO, H.V= HANSENÍASE VIRCHOWIANA, L.T.A= LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA, P.C.M= PARACOCÍDIOIDOMICOSE, S.A.R= SARCOIDOSE).

Nas análises histológicas qualitativas da expressão da alfa-actina, assim como a vimentina, observou-se marcações de células inflamatórias positivas na derme papilar e reticular, bem como nas células constituintes dos granulomas como os fibroblastos.

Interessantemente, não foram observadas marcações positivas em células gigantes, como observado em vimentina, porém, em todos os casos, as marcações foram mais discretas, menos intensas que as da vimentina (Figura 12 A-E).

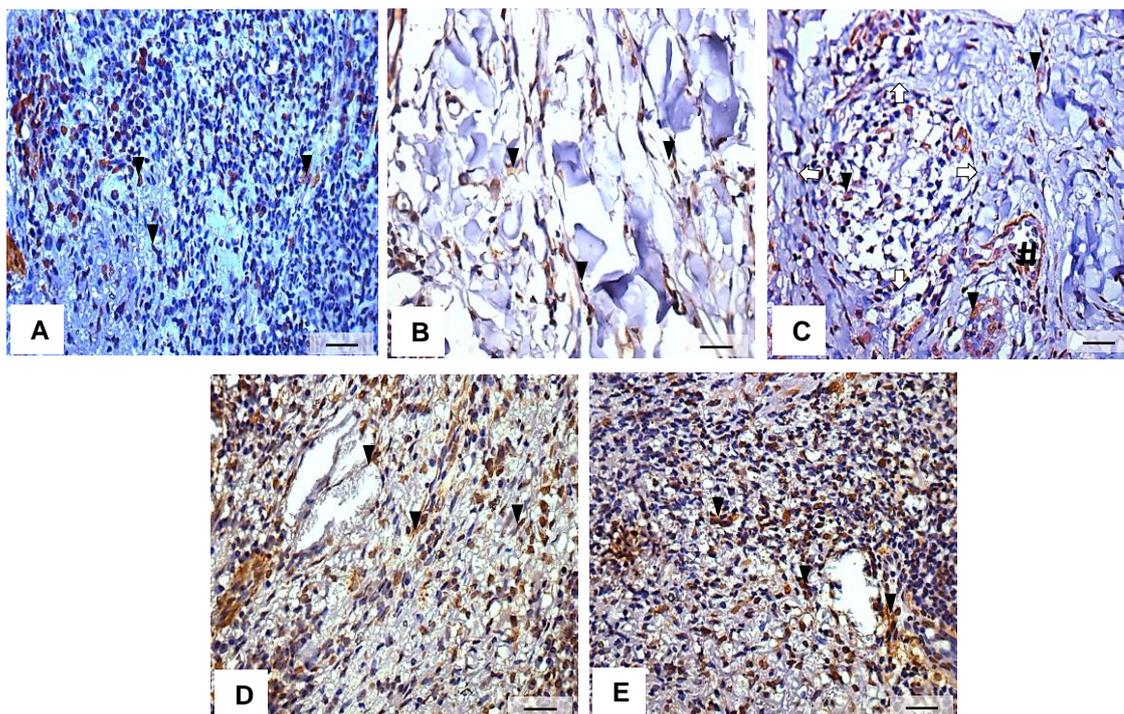


Figura 12 (A-E) - Peles humanas com marcação imuno-histoquímica de alfa-actina+. A) Leishmaniose tegumentar americana, em coloração acastanhada (ponta de seta) é possível observar células positivas para alfa-actina semelhantes a fibroblastos e outras que se assemelham a células epitelióides distribuídas pelo tecido. B) Hanseníase virchowiana, em castanho, células positivas para alfa-actina, distribuídas pelo tecido, células morfológicamente semelhantes a fibroblastos. C) Sarcoidose, é possível observar a delimitação de um granuloma bem definido (setas brancas) cercado por células alfa-actina positivas, essas células se distribuem internamente no granuloma e em todo tecido, células endoteliais expressam positividade a este marcador. É possível observar um vaso em (#). D) Granuloma de corpo estranho, marcação de células que exibem positividade a alfa-actina em coloração acastanhada (Pontas de seta) permeiam todo o tecido. E) Paracoccidioidomicose, em detalhe em coloração acastanhada é possível observar a positividade das células alfa-actina (Pontas de seta). É possível observar que estas células se distribuem em meio às fibras em todas as amostras das doenças estudadas. Barra em 20  $\mu$ m.

Análises quantitativas de área revelaram a maior média de área de células positivas em granuloma de corpo estranho foi observada a maior área de deposição para este marcador, seguido de paracoccidioidomicose, LTA, sarcoidose e hanseníase virchowiana, nesta ordem (Figura 13).

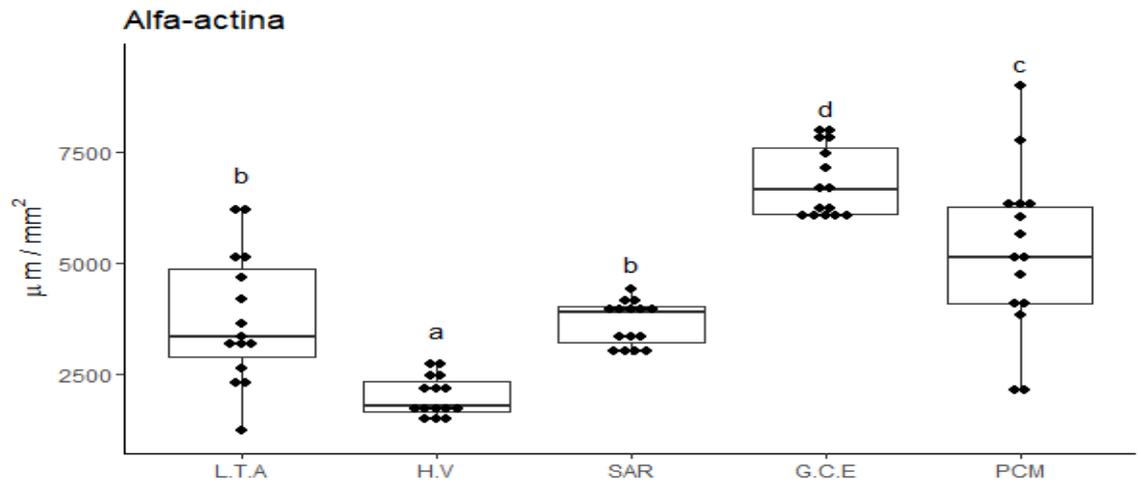


Figura 13- Gráfico de Comparação da área em  $\mu\text{m}/\text{mm}^2$  de alfa-actina+ em patologias. Essas variáveis atenderam os pressupostos da ANOVA e foram avaliadas pela ANOVA seguida pelo teste de Duncan. Letras diferentes em um mesmo gráfico indicam diferença estatística entre as patologias pelos pós-testes usados ( $p < 0,05$ ).

(G.C.E = GRANULOMA DE CORPO ESTRANHO, H.V= HANSENÍASE VIRCHOWIANA, L.T.A= LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA, P.C.M= PARACOCCÍDIOIDOMICOSE, S.A.R= SARCOIDOSE).

### 6.3- Estudo da matriz extracelular

#### 6.3.1- Fibras elásticas

Fibras elásticas foram marcadas em negro pela coloração de Verhoeff em todos os casos, sendo essas visualizadas tanto na derme papilar e profunda. Nos casos dos grupos da LTA e hanseníase virchowiana houve uma menor área de fibras elásticas, isto é, raras as fibras elásticas observadas nestes grupos (Figura 14 A-E).

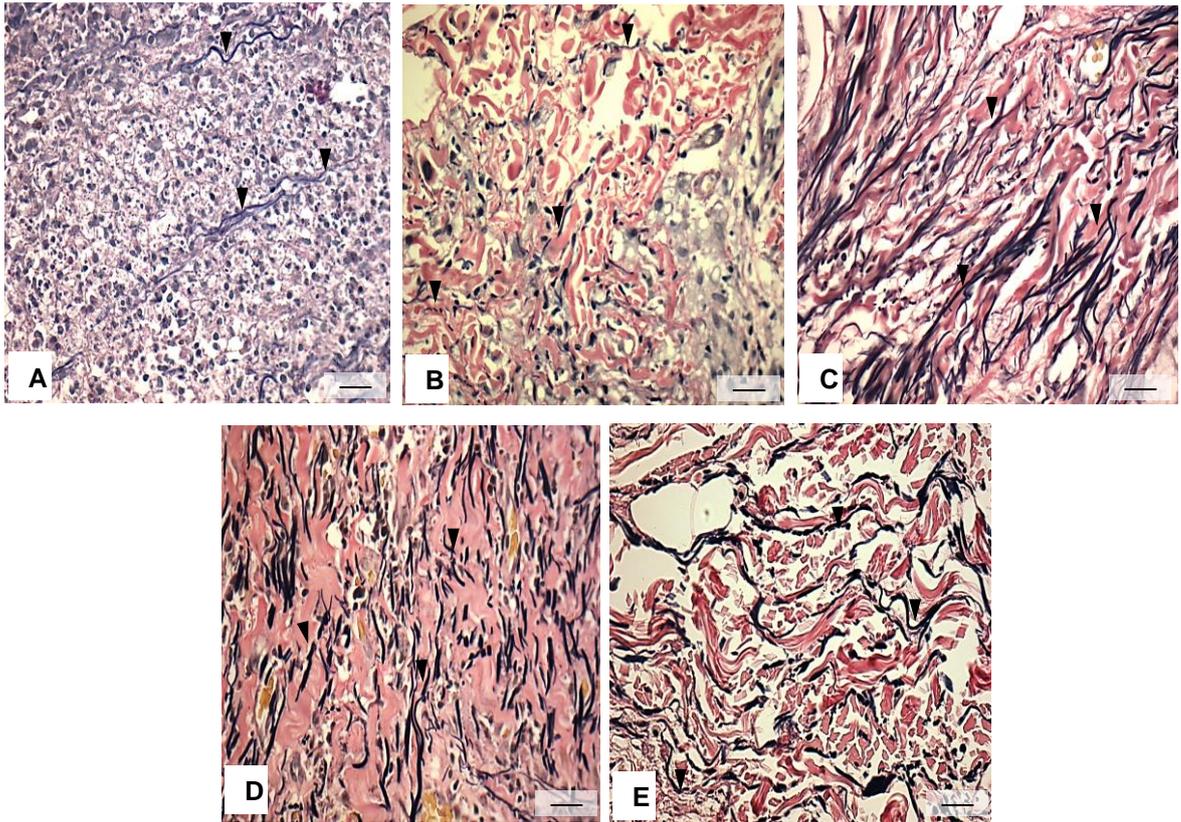


Figura 14 (A-E) - Peles humanas com doenças granulomatosas, coloração de Verhoeff. A) Leishmaniose tegumentar americana em detalhe é possível observar as fibras finas de elastina em negro (pontas de seta), impregnadas por solução de hematoxilina férrica. B) Hanseníase, a conformação das fibrilas elásticas (cabeças de seta) é quase ausente na amostra devido a degradação destas fibras pela atividade inflamatória. C) Sarcoidose, observa-se uma maior organização e preservação das fibras elásticas em negro (cabeças de seta) dispostas por todo o tecido. D) Granuloma de corpo estranho, fibras elásticas em negro (cabeças de seta) dispostas e preservadas na amostra. E) Paracoccidioidomicose, é possível a visualização das fibras elásticas em negro (cabeças de seta) por impregnação de hematoxilina férrica. Barra em 20  $\mu\text{m}$ .

De fato, análise quantitativa revelaram uma maior quantidade de fibras elásticas em todas as amostras do grupo sarcoidose, seguido do grupo granuloma de corpo estranho e paracoccidioidomicose (Figura 15).

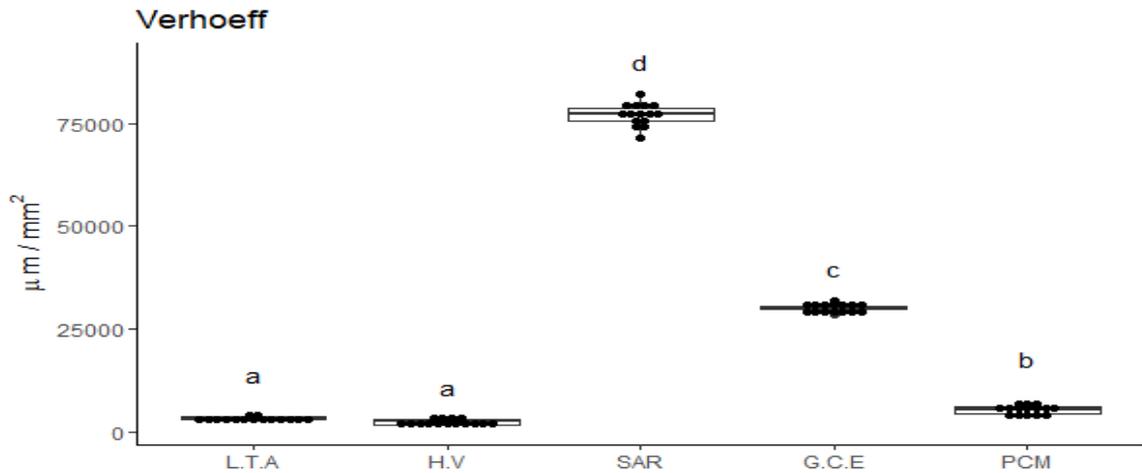


Figura 15-Gráfico de Comparação da área em  $\mu\text{m}/\text{mm}^2$  de fibras elásticas em diferentes patologias. Essas variáveis atenderam os pressupostos da ANOVA e foram avaliadas pela ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Letras diferentes em um mesmo gráfico indicam diferença estatística entre as patologias pelos pós-testes usados ( $p < 0,05$ ). (L.T.A= LEISHMANIOSE TEGUMENTAR , H.V= HANSENÍASE VIRCHOWIANA, S.A.R= SARCOIDOSE, G.C.E = GRANULOMA DE CORPO ESTRANHO, P.C.M= PARACOCCÍDIOMICOSE).

### 6.3.2- Fibras reticulares (colágeno)

A deposição do colágeno pode ser analisada qualitativamente e quantitativamente pela deposição das fibras reticulares (fibropose) coradas em negro. Em todos os casos, essa fibropose era difusa na derme papilar e profunda, variando de discreta a intensa, mas sempre diretamente correlacionada ao processo inflamatório crônico (Figura 16 A-E). Todavia, quando os granulomas eram presentes na derme, poucas ou mesmo nenhuma fibra reticular era observada ao centro desses granulomas, com a exceção dos casos de sarcoidose. De fato, a fibropose, quando relacionada aos granulomas, era sempre presente nas camadas mais externas dos granulomas.

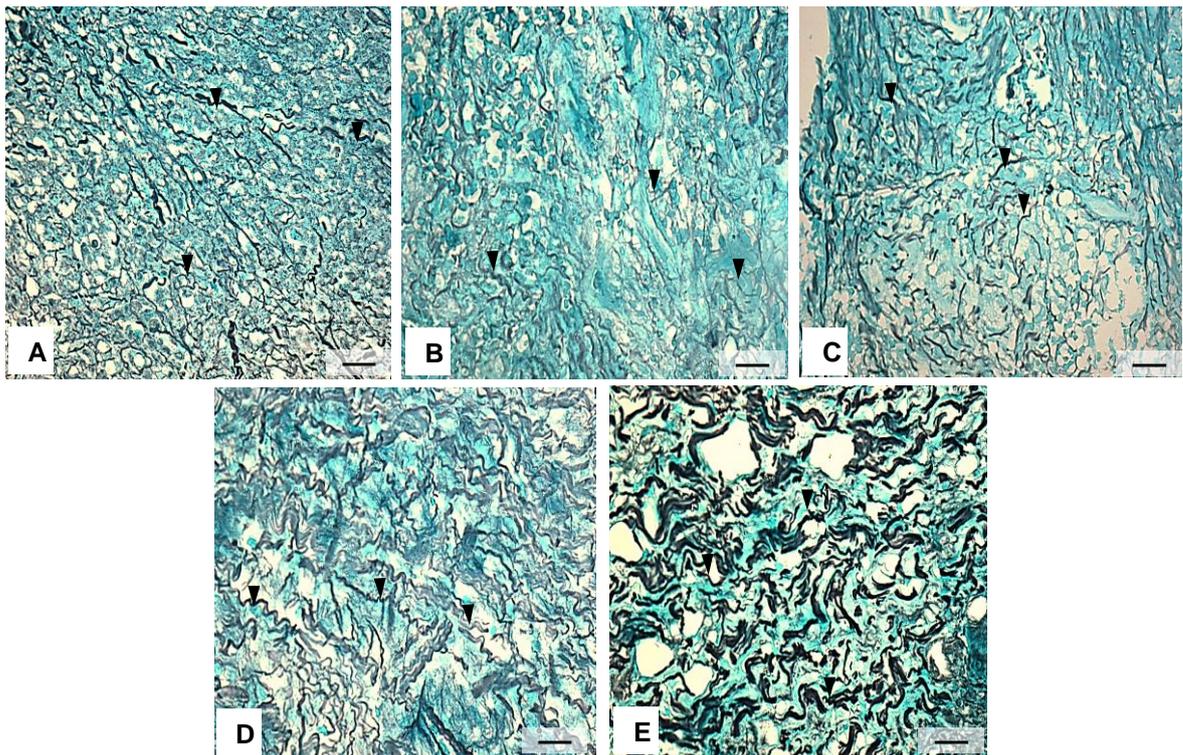


Figura 16 (A-E) - Peles humana com doenças granulomatosas, coloração de prata amoniacal de Gomori. A) Leishmaniose tegumentar americana. B) Hanseníase. C) Sarcoidose. D) Granuloma de corpo estranho. E) Paracoccidioidomicose. Em detalhe (cabeça de seta) é possível a observação de fibras reticulares, marcadas por técnica de impregnação argêntica. Barra em 20  $\mu\text{m}$ .

Após as análises quantitativas (morfométricas) da deposição de fibras reticulares observou-se uma maior fibropose nos casos do grupo das paracoccidioidomicoses e granuloma de corpo estranho, sarcoidose, LTA e hanseníase virchowiana (Figura 17).

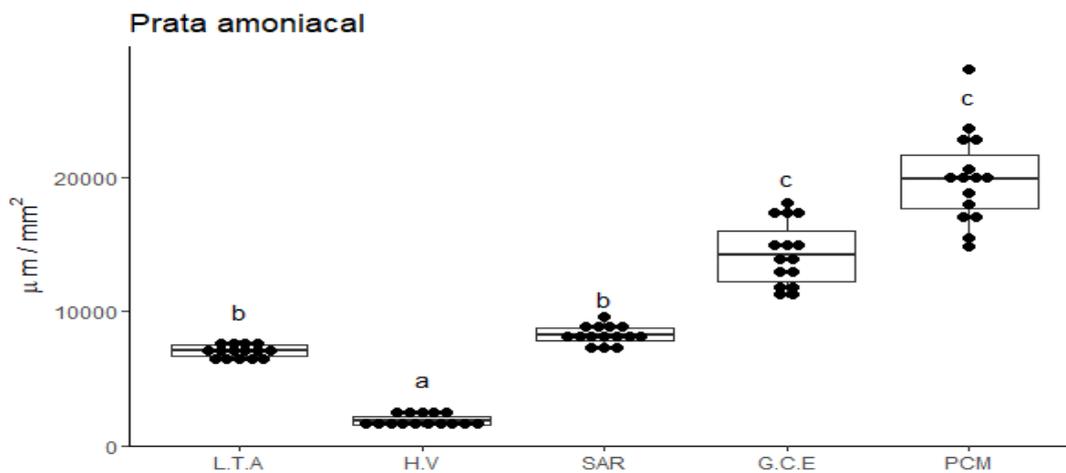


Figura 17- Gráfico de Comparação da área em  $\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$  de fibras reticulares em diferentes patologias. Essas variáveis não atenderam os pressupostos da ANOVA e foram avaliadas pelo teste não paramétricos de Kruskal-Wallis seguido pela comparação múltipla de Conover (1999). Letras diferentes em um mesmo gráfico indicam diferença estatística entre as patologias pelo pós-teste ( $p < 0,05$ ). (L.T.A=

LEISHMANIOSE TEGUMENTAR , H.V= HANSENÍASE VIRCHOWIANA, S.A.R= SARCOIDOSE, G.C.E = GRANULOMA DE CORPO ESTRANHO, P.C.M= PARACOCCÍDIOIDOMICOSE).

### 6.3.3- Análises de Correlação (valores de r)

A análise de correlação geral entre os marcadores nas diferentes doenças demonstrou o seguinte: (1) correlação positiva entre CD68 e CD163 ( $r= 0,81$ ), mostrando aumento da expressão de CD68 concomitante aumento da expressão de CD163 ; b) CD68 e alfa-actina ( $r = 0,73$ ) revelando aumento da expressão CD68 concomitante a alfa actina; c) CD163e alfa-actina ( $r = 0,72$ ) evidenciando aumento da expressão de CD163 também concomitante a alfa-actina; d) vimentina e fibras reticulares ( $r= 0,94$ ) à medida que a área de expressão de vimentina aumenta, aumenta também a área de expressão de fibras reticulares. (Figura 18).

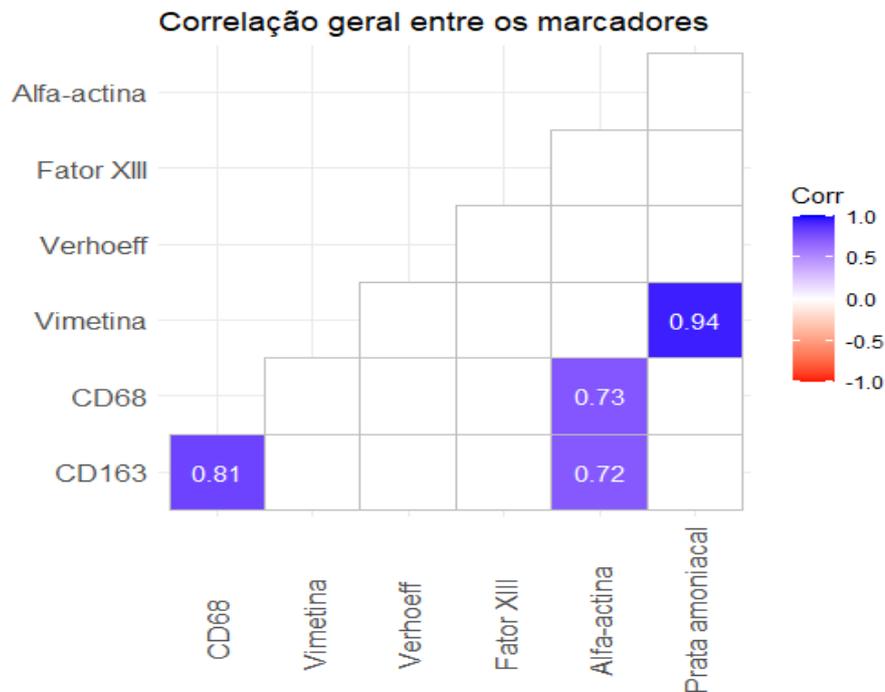


Figura 18- Gráfico de Correlação de Spearman entre marcadores. Correlação não significativas foram mostradas em branco ( $p>0.05$ ). Correlações positivas e significativas foram mostradas em azul e as correlações negativas e significativas foram mostradas em vermelho.

## 7- Discussão

### 7.1- Estudo qualitativo e quantitativo da matriz extracelular (MEC)

O objetivo principal deste trabalho foi de descrever as alterações da matriz intersticial (tecido colágeno e tecido elástico) e o processo inflamatório mediante estudo

de alguns marcadores celulares (macrófagos), em doenças granulomatosas infecciosas e não infecciosas. Assim, amostras de pele (biópsias) parafinadas de pacientes com doenças granulomatosas infecciosas (leishmaniose tegumentar, hanseníase virchowiana e paracoccidiodomicose) e não infecciosas (granuloma corpo estranho e sarcoidose) foram utilizadas.

As análises histológicas qualitativas em microscopia óptica revelaram um processo inflamatório crônico, focal ou difuso, variando de discreto a intenso, mas sempre atingindo a derme papilar e reticular em todos os casos estudados. Entretanto algumas observações já nos chamaram a atenção: uma maior fibropoese nos casos de paracoccidiodomicose, granuloma corpo estranho e sarcoidose quando comparadas as amostras de pele dos casos de leishmaniose tegumentar americana, hanseníase virchowiana nessa ordem. De fato, as análises morfométricas comprovaram essas observações microscópicas qualitativas. Alterações da MEC podem ser explicadas pela presença do agente causador da infecção e as interações estabelecidas.

Por exemplo, Tomlin e Piccinini (2018), destacam a capacidade que agentes bacterianos, protistas e virais possuem de alteração da MEC, promovendo remodelação por ação de citocinas, principalmente o TNF $\alpha$  e IL10 que modulam a atividade inflamatória, sendo responsáveis por recrutamento de células como monócitos ou agindo na diferenciação celular. Os macrófagos por sua vez possuem a capacidade de liberação de metaloproteases MMPs, principalmente a MMP-1 e MMP-13 responsáveis pela quebra de colágeno, e MMP-2 e MMP-9 que são responsáveis pela quebra da elastina e de outras proteínas de matriz intersticial (Aresu et al., 2011). Todo esse mecanismo é ativado por células residentes, ao serem expostas a lipopolissacarídeos (LPS) ou lipofosfoglicanos (LPG), ou outros produtos dos parasitas (bactérias, fungos e protozoários). Além disso, os patógenos bacterianos apresentam capacidade de indução de MMPs, destacando-se nesse contexto a MMP-9, durante a infecção, o que causa grandes e profundas alterações na MEC. Desta maneira, essas MMPs secretadas por macrófagos e fibroblastos (Aresu et al., 2011; Kanta, 2015; Tomlin e Piccinini, 2018) seriam responsáveis pela destruição de fibras reticulares. Nesse trabalho observamos que houve menor deposição de fibras elásticas e fibras reticulares na LTA e hanseníase virchowiana, em comparação aos demais grupos, sendo observadas as menores taxas de fibras elásticas e fibras reticulares em hanseníase virchowiana. Esses achados sugerem

ação de MMPs, mas são necessários estudos e comparações nos grupos e nas amostras para confirmação.

Sabe-se que a ativação de macrófagos frente ao combate da infecção bacteriana causa instabilidade na MEC, devido a ação de citocinas liberadas nesse processo, que em excesso, podem desregular a resposta imunológica e levar a grandes danos teciduais (Tomlin e Piccinini, 2018; Henderson et al., 2020; Yunna et al., 2020). Assim, uma profunda alteração nas proteínas expressas e na MEC, bem como o desbalanço nas citocinas e ativação de macrófagos contribuem para processos de colagenogênese. Interessante observar que é reportado aos macrófagos a capacidade de síntese de vários tipos de colágenos. Estudos mapearam vários genes em macrófagos, responsáveis por produção de colágenos tipo I, II, III, IV, IX entre outros (Distler et al., 2019; Henderson et al., 2020).

Estudos de alterações de matriz extracelular e de subpopulações de macrófagos são importantes uma vez que estas células apresentam uma gama de ações imunes modulando o processo inflamatório, bem como o processo da cicatrização e fibrose. (Kloc et al., 2019; Kim e Nair, 2019; Hassanshahi et al., 2022). (Kloc et al., 2019; Kim e Nair, 2019; Hassanshahi et al., 2022).

Uma vez ativada a resposta a um agente agressor bacteriano, ou fúngico, ou outro qualquer por exemplo, neste contexto, os macrófagos classicamente ativados (CAMs) teriam a capacidade de englobar esses agentes promovendo sua total destruição, com exposição antigênica, assim o processo inflamatório seguiria seu curso normal, e o próximo passo seria o reparo tecidual e recomposição da matriz extracelular da região, assim os macrófagos alternativamente ativados (AAMs) com secreção principalmente de fator transformante beta (TGF $\beta$ ) e interleucina 10 (IL10) recrutam os fibroblastos (Hesse et al. 2001; Wynn, 2008; Gordon, 2017; Kim e Nair, 2019; Hassanshahi et al., 2022). No processo de fibrose, os fibroblastos exercem função primordial, pois como dito anteriormente, participam da síntese de colágenos e elastina, bem como as metaloproteases (MMP) que podem também agir tanto no sentido de promover a síntese de novos componentes da MEC como na quebra de componentes (Nagase et al., 2006; Frederick et al. 2008; Distler et al., 2019; Pakshir et al., 2019).

## **7.2- Estudo imuno-histoquímico de macrófagos e fibroblastos, razão da subpopulação M2 em doenças granulomatosas cutâneas**

As subpopulações de macrófagos podem nos indicar sobre a fibropoese nas doenças estudadas, uma vez que essas células exercem grande papel nas mudanças que ocorrem na MEC e em suas proteínas, resultado da atividade inflamatória e perfil de resposta imune. Com este objetivo utilizamos marcadores imuno-histoquímicos para células CD68+ e CD163+ (Lau et al., 2004; Moeller et al., 2012; Kujan et al., 2015; Henderson et al., 2020).

As análises histológicas qualitativas revelaram maiores taxas de áreas de células CD68+ nas doenças granuloma de corpo estranho, paracoccidioidomicose, LTA, sarcoidose, hanseníase virchowiana, nesta ordem, com presença de células gigantes CD68+ nos grupos paracoccidioidomicose, granuloma de corpo estranho e sarcoidose.

Vários autores como, Lau et al., (2004) e Rodríguez e Arias (2019), argumentam que para análises de subpopulações de macrófagos este marcador não deve ser usado sozinho, devido ao fato de que, este marcador indica uma organela, esse receptor localiza-se em membranas de lisossomos e fagossomos. Desta maneira, empregamos o uso do marcador CD163 (CD163+), que é descrito na literatura como um marcador específico para macrófagos ativados do perfil M2. Os receptores são do tipo scavengers responsáveis por remover a hemoglobina livre durante a hemólise pelos macrófagos, assim Lau et al., (2004) demonstram a especificidade desse marcador, em seus estudos em amostras de tecidos conservados em parafina. Já Moeller et al., (2012) mapearam geneticamente a expressão de CD163-L1 e as citocinas que influenciam na expressão desse receptor.

Assim em nossos estudos observamos as maiores taxas de área de células CD163 + nos grupos granuloma de corpo estranho, leishmaniose tegumentar americana, paracoccidioidomicose, sarcoidose e hanseníase virchowiana, nesta ordem.

As análises estatísticas realizadas pelo teste de *Kruskall-Wallis*, seguidos de teste de comparação múltipla de *Conover* (1999) com significância menor que 0,05% demonstram diferenças entre esses marcadores e as doenças estudadas.

Pela análise entre a razão de células CD68+/CD163+, seguida pelo teste de *Kruskall-Wallis* e teste de comparação de *Conover* (1999), podemos determinar estatisticamente as quantidades médias de áreas de células do grupo de macrófagos M2 ou AAMs (macrófagos ativados alternativamente), uma vez o marcador CD68 é relatado como marcador de macrófagos (Rodríguez e Arias, 2019) e CD163 relatado como marcador específico de macrófagos M2. Moeller et al., (2012) observou em seus estudos que na presença de LPS e INF $\gamma$  há redução na expressão de CD163. Já na presença das IL4 e

IL13 há super-expressão desse receptor (Lau et al., 2004; Moeller et al., 2012; Moura et al., 2012). Assim pudemos observar a partir desta análise que maiores proporções desse marcador foram observadas em hanseníase virchowiana, sarcoidose e granuloma de corpo estranho, nesta ordem, e as menores em paracoccidioidomicose e leishmaniose tegumentar americana.

Quando há elevadas quantidades de macrófagos ativados alternativamente (M2) e principalmente um ambiente rico em citocinas características, há um ambiente favorável, que corrobora para atividade fibrogênica. El Agha et al., (2017) demonstram, o papel de algumas citocinas em especial do TGF $\beta$ , na secreção de outras citocinas pelos macrófagos e fatores de crescimento que estimulam o recrutamento de monócitos, multiplicação e diferenciação celular. As citocinas e fatores de crescimento agem diretamente na diferenciação de macrófagos adquirindo o perfil M2, já relatado como com capacidade de síntese de colágeno, desta maneira associados a colagenogênese, além disso maiores taxas de M2 podem se associar a secreção de MMPs, esse mecanismo parece ser observado em LTA e hanseníase virchowiana. (El Agha et al., 2017; Yan e Horng, 2020; Yunna et al., 2020).

Maiores áreas de macrófagos M2 nas amostras são acompanhadas de maior quantificação de fibras reticulares em paracoccidioidomicose, (Shapouri-Moghaddam et al., 2018; Yunna et al., 2020), além disso há aumento da vimentina, tudo isso associado ao maior número de células gigantes como observado por Pedreira et al., (2016) ao estudar paracoccidioidomicose, onde relatam a predominância de células gigantes multinucleadas.

Adicionalmente, seguindo a literatura, o aumento da vimentina pode ser justificado pelas mudanças do citoesqueleto que ocorrem nos macrófagos quando se fundem e originam as células multinucleadas, a vimentina é relatada por Kieselova et al., (2018) ao observarem o elevado número de células gigantes e positividade destas a vimentina em seus estudos.

Ao estudar ratos infectados com *Paracoccidioides brasiliensis*, Gonzalez et al., (2008), Gonzalez e Hernandez, (2016) observou o aumento de alguns componentes da MEC, entre esses componentes há o aumento de fibras elásticas, assim como observado em nossos estudos onde as amostras desta doença apresentam a terceira maior quantidade destas fibras em comparação aos outros grupos, destacando também o arranjo e conservação destas fibras neste grupo.

Amostras do grupo LTA apresentaram taxas de M2 semelhantes às do grupo paracoccidioidomicose, porém a taxa de vimentina nesse grupo foi a segunda mais baixa comparada aos demais grupos, talvez este fato da baixa vimentina seja justificado pela pouca presença de células gigantes multinucleadas nesse grupo (Pedreira et al., 2016).

Sobre as fibras elásticas observou-se maior quantidade dessas fibras na sarcoidose quando comparadas as outras patologias cutâneas. Chamou atenção a menor presença de fibras elásticas nas doenças infecciosas como a paracoccidioidomicose, leishmaniose tegumentar e hanseníase virchowiana (Daldon e Arruda, 2007; Parise-Fortes et al., 2010; Aresu et al., 2011; Moura et al., 2012; Kujan et al., 2015; Pedreira et al., 2016; Tomlin e Piccinini 2018; Rodríguez e Arias, 2019).

Em granuloma de corpo estranho observou-se que a taxa de vimentina é segunda maior, assim como as fibras elásticas tal fato talvez possa ser justificado pela relação de quanto mais vimentina mais células gigantes, visto que nas amostras de granuloma de corpo estranho em análises histológicas foram observadas muitas células gigantes multinucleadas (Pedreira et al., 2016; Kieselova et al., 2018), mais estudos são necessários para elucidar sobre as fibras elásticas, se há uma maior síntese destas pelos macrófagos e ou fibroblastos (Masseno et al., 2010; Shook et al., 2019) nas modificações ocorridas na MEC durante os vários processos que decorrem da atividade inflamatória. Mas observamos que há uma relação perceptível entre células gigantes multinucleadas, aumento de quantificação de vimentina nas amostras e maior área de fibras elásticas. Ainda para as amostras de paracoccidioidomicose e granuloma de corpo estranho, foram observadas as maiores taxas de alfa-actina, associadas as maiores taxas de fibras reticulares. Esse conjunto de dados sugere maior atividade colagenogênica nos grupos paracoccidioidomicose e granuloma de corpo estranho comparados aos demais, uma vez que os indicadores usados para analisar a colagenogênese foram alfa-actina, fibras reticulares, vimentina, além da elevada concentração de M2 nessas amostras. Shook et al., (2019) relatam que os tipos mais comuns de fibroblastos envolvidos em processos de fibrose são aqueles que expressam alfa-actina, mas sabemos que nenhum marcador é absoluto, desta maneira outras células podem expressar essa proteína, além disso há uma diversidade de populações de fibroblastos que devem ser consideradas e estudadas em processos de colagenogênese (Pakshir e Hinz, 2018; Pakshir et al., 2019; Shook et al., 2019), principalmente em comparativos de doenças granulomatosas infecciosas e não infecciosas.

Em relação a sarcoidose, observamos que este grupo apresentou a terceira maior quantidade de vimentina comparado aos outros grupos, corroborando mais uma vez com os achados histológicos de células gigantes multinucleadas, presença acentuada de fibras reticulares e fibras elásticas, destacando esse último grupo de fibras, que nas amostras para essa doença foram observadas as maiores quantidades (Pedreira et al., 2016; Kieselova et al., 2018). Mais uma vez, fica evidente nesse grupo a relação de maior quantidade de vimentina, mais células gigantes multinucleadas e a maior densidade de fibras elásticas podendo estar relacionados, porém, mais estudos necessitam ser realizados para o entendimento do papel das células gigantes e a relação com as fibras elásticas e a vimentina.

Em relação ao Fator XIIIa+ esse marcador é descrito como marcador de células dendríticas dérmicas (Duarte e Rochael, 2006) que participam amplamente da atividade inflamatória sendo células apresentadoras de antígenos (Cruvinel et al., 2010), na hanseníase virchowiana e paracoccidiodomicose observou-se maior densidade de células FXIIIa+ comparados aos demais grupos estudados. Essas células devem ser estudadas junto com a população de células T como sugere Distler et al., (2019), outro contexto que deve ser considerado, é o controle e atividade de células T (Treg) que regulam a atividade inflamatória e dirigem o curso do processo inflamatório e auxiliam na colagenogênese.

Os resultados em relação as análises de área de alfa-actina nas diversas doenças revelaram maiores quantificações em granuloma de corpo estranho, paracoccidiodomicose, leishmaniose tegumentar americana, sarcoidose e hanseníase virchowiana. Além disso, os grupos que apresentavam maiores quantificações de área de alfa-actina, também apresentavam maior área de fibras reticulares. Este marcador é descrito para fibroblastos e atividade de fibropoese por Masseno et al., (2010), Bellini et al., (2011) e Henderson et al., (2020) que descrevem a expressão desse marcador em fibroblastos envolvidos em processos de fibrose, porém, estes mesmos autores destacam a heterogeneidade de populações de fibroblastos. Estes autores ainda destacam a capacidade que os fibroblastos que expressam alfa-actina possuem de atividade fibrogênica.

Por fim, as análises de correlação entre os marcadores tornam evidentes as relações positivas estabelecidas entre os marcadores dentro das doenças e que traçam um perfil biológico já descrito na literatura, onde há aumento área de CD68 há aumento de área

de CD163, essa observação pode ser justificada, visto a grande participação dos macrófagos e ativação destes macrófagos nos processos inflamatórios.

Para aperfeiçoamento de um painel imuno-histoquímico, que vise estabelecer melhor a participação dos macrófagos frente ao comparativo das doenças granulomatosas infecciosas e não infecciosas acredita-se que análises de outros marcadores de macrófagos como o CD206 (macrófagos M2) e da citocina TGF $\beta$  (citocina central da fibrogenese) poderiam dar uma maior contribuição ao estudo da participação de macrófagos ativados alternativamente (M2) nas diferentes doenças estudadas. As citocinas INF $\gamma$ , IL12, TNF $\alpha$ , IL1 forneceriam um perfil sobre os macrófagos clássicos ativados (M1), além do estudo das metaloproteases (MMPs).

## **8- Conclusões:**

De acordo com os resultados descritos podemos concluir que:

1-Foram observadas diferenças entre as doenças granulomatosa estudadas em relação à quantidade de macrófagos M2, fibras reticulares, alfa-actina e vimentina.

2-Houve maior expressão de alfa-actina, vimentina e fibras reticulares nas amostras dos grupos da paracoccidioidomicose e granuloma de corpo estranho indicando maior colagenogênese nesses dois grupos comparados aos demais, aliado a esses indicadores, maiores taxas de macrófagos M2.

3- Em sarcoidose, granuloma de corpo estranho e paracoccidioidomicose foram observadas as maiores taxas de fibras elásticas, fibroblastos e vimentina, sugerindo fibrogênese de colágeno e fibras elásticas.

4- Foi observada uma menor fibropoese nos grupos LTA e hanseníase virchowiana.

5-Alterações das fibras elásticas ocorreram principalmente nas amostras de hanseníase virchowiana e leishmaniose tegumentar americana, onde essas fibras eram escassas e raras.

6-Há uma relação direta entre a formação de células gigantes multinucleadas e expressão de vimentina na paracoccidioidomicose, granuloma de corpo estranho e sarcoidose.

## **9- Perspectivas**

- Quantificar e comparar outros marcadores imuno-histoquímicos de macrófagos como CD206, B7.1 e B7.2 nas doenças granulomatosas infecciosas e não infecciosas.

- Quantificar e comparar interleucinas e outras citocinas como IL10, IL12,  $\text{INF}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{TGF}\beta$  nas doenças granulomatosas infecciosas e não infecciosas.
- Incluir mais amostras dos grupos já estudados e outros grupos como esporotricose.
- Estudar expressão de STAT3 E STAT6 nos grupos.

## 10- Referências bibliográficas

- ADAMS S, WUESCHER L.M., WORTH R. Mechano-Immunomodulation: Mechanoresponsive Changes in Macrophage Activity and Polarization. *Ann Biomed Eng.* 47: 2213-2231, 2019.
- ARESU L, BENALI S, GARBISA S, GALLO E, CASTAGNARO M. Matrix metalloproteinases and their role in the renal epithelial mesenchymal transition. *Histol Histopathol.* 2011 Mar;26(3):307-13. doi: 10.14670/HH-26.307. PMID: 21210343.
- BARROS MH, HAUCK F, DREYER JH, KEMPKES B, NIEDOBITEK G. Macrophage polarization: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PLoS One.* 8 (11) e 80908. 2013
- BELINNI A, MARINI MA, BIANCHETTI L, BARCZYK M, SCHIMIDT M, MATTOLI S. Interleukin (IL)-4, IL-13, and IL-17A differentially affect the profibrotic and proinflammatory functions of fibrocytes from asthmatic patients. *Mucosal Immunol.* 2012 Mar;5(2):140-9. doi: 10.1038/mi.2011.60. Epub 2011 Dec 21. PMID: 22189956.
- CHANDRASEKARAN P, Izadjoo S, Stimely J, Palaniyandi S, Zhu X, Tafuri W, Mosser DM. Regulatory Macrophages Inhibit Alternative Macrophage Activation and Attenuate Pathology Associated with Fibrosis. *J Immunol.* 2019 203:2130-2140 2019.
- CARLSON, B. M. Human Embryology and Developmental Biology. 5.ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2014. p.37-472.
- CHISTIYAKOV DA, BOBRYSHYEV YV, NIKIFOROV NG, ELIZOVA NV, SOBENIN IA, OREKHOV AN. Macrophage phenotypic plasticity in atherosclerosis: The associated features and the peculiarities of the expression of inflammatory genes. *Int J Cardiol.* 184: 436-45, 2015.
- CHRISTENSEN SM, Belew AT, El-Sayed NM, Tafuri WL, Silveira FT, Mosser DM. Host and parasite responses in human diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis*. *PLoS Negl Trop Dis.* 13 (3): e0007152, 2019.
- CHESTER D, BROWN AC. The role of biophysical properties of provisional **matrix** proteins in wound repair. *Matrix Biol.* 61:124-140, 2017
- DALDON, P.E.C, ARRUDA, L.H.F. Granulomas não infecciosos: sarcoidose. *An Bras Dermatol.* 2007;82(6):559-71.
- DISTLER, J.H.W., GYORFI, A.H., RAMANUJAM, M. *et al.* Shared and distinct mechanisms of fibrosis. *Nat Rev Rheumatol* **15**, 705–730 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41584-019-0322-7>
- DUARTE, M.L, ROCHAEL, M.C. Perfil histopatológico e imuno-histoquímico da leishmaniose tegumentar americana com ênfase nos dendrócitos dérmicos FXIIIa+. *An Bras Dermatol [Internet].* 2006Nov;81(6):541–8. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962006000600005>.
- EDWARDS JP, ZHANG X, FRAUWIRTH KA, MOSSER DM. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol.* 80:1298-307, 2006.
- EI AGHA E, KRAMANN R, SCHNEIDER RK, LI X, SEEGER W, HUMPHREYS BD, BELLUSCI S. Mesenchymal Stem Cells in Fibrotic Disease. *Cell Stem Cell.* 2017 Aug 3;21(2):166-177. doi: 10.1016/j.stem.2017.07.011. PMID: 28777943.
- FINGLETON B. Matrix metalloproteinases as regulators of inflammatory processes, *Biochim Biophys Acta* 1864(11 Pt A) 2036-2042, 2017.
- FREDERICK LA, MATTHEWS JA, JAMIESON L, JUSTILIEN V, THOMPSON EA, RADISKY DC, FIELDS AP. Matrix metalloproteinase-10 is a critical effector of protein

- kinase Ciota-Par6alpha-mediated lung cancer. *Oncogene*. 27: 4841-53, 2008
- FRIEDMAN, S.L., Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nature clinical practice* 1, 98-105, 2004.
- GANESAN, N.; RONSMANS, S.; VANOIRBEEK, J.; HOET, P.H.M. Assessment of Experimental Techniques That Facilitate Human Granuloma Formation in an In Vitro System: A Systematic Review. *Cells* **2022**, *11*, 864. <https://doi.org/10.3390/cells11050864>.
- GIORGIO, S., GALLO-FRANCISCO, P.H., ROQUE, G.A.S., FLÓRO E SILVA, M., Granulomas in parasitic diseases: the good and the bad. *Parasitol Res.* 2020 Oct;119(10):3165-3180. doi: 10.1007/s00436-020-06841-x. Epub 2020 Aug 13. PMID: 32789534.
- GONCALVES, R., TAFURI, W.L., MELO, M.N., RASO, P., TAFURI, W.L., Chronic interstitial pneumonitis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*: a histopathological and morphometric study. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 45, 153-158, 2003.
- GORDON MK, HAHN RA. Collagens: Review. *Cell Tissue Res.* 339 :247-57, 2010.
- GORDON, S., TAYLOR, P.R., Monocyte, and macrophage heterogeneity. *Nature reviews* 5, 953-964, 2005.
- GORDON, S., Alternative activation of macrophages. *Nature reviews* 3, 23-35, 2003.
- GORDON, S.A. PLUDDMANN, Tissue macrophages: heterogeneity and functions, *BMC Biol* 15: 53, 2017.
- GONZÁLEZ, A et al. Paracoccidioides brasiliensis conidia recognize fibronectin and fibrinogen which subsequently participate in adherence to human type II alveolar cells: involvement of a specific adhesin. **Microbial pathogenesis**, v. 44, n. 5, p. 389-401, 2008.
- GONZALES, A., HERNANDEZ, O. New insights into a complex fungal pathogen: the case of *Paracoccidioides* spp.. *Yeast*, 33: 113– 128. doi: [10.1002/yea.3147](https://doi.org/10.1002/yea.3147). 2016
- GUYOT, C., LEPREUX, S., COMBE, C., DOUDNIKOFF, E., BIOULAC-SAGE, P., BALABAUD, C., DESMOULIERE, A., Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo)fibroblastic cell subpopulations involved. *The international journal of biochemistry & cell biology* 38, 135-151, 2006.
- GRIFFITHS JS, CAMILLI G, KOTOWICZ NK, Ho J, RICHARDSON JP e NAGLIK JR (2021) Papel para Cytokines família IL-1 em Infecções Fúngicas. *Frente. Microbiol.* 12:633047. doi: 10.3389/fmicb.2021.633047.
- HASSANSHAHI, A.; MORADZA, M.; GHALAMKARI, S.; FADAEI, M.; COWIN, A.J.; HASSANSHAHI, M. Macrophage-Mediated Inflammation in Skin Wound Healing. *Cells* *11*, 2953. 2022, <https://doi.org/10.3390/cells11192953>.
- HESSE M, MODOLELL M, LA FLAMME AC, SCHITO M, FUENTES JM, CHEEVER AW, PEARCE EJ, WYNN TA. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol.* 167: 6533-44, 2001.
- HENDERSON, N.C, RIEDER, F. WYNN, T.A, Fibrosis: From to mechanisms to medicines. *Nature* 2020, 555-566.
- HINZ B. Myofibroblasts. *Exp Eye Res.* 142: 56-70. 2016
- HÖGGER P, DREIER J, DROSTE A, BUCK F, SORG C. Identification of the integral membrane protein RM3/1 on human monocytes as a glucocorticoid-inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family (CD163). *J Immunol.* 161 :1883-90, 1998.
- HYNES R.O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 326: 1216-9, 2009.
- JUNQUEIRA, L.C e CARNEIRO, J. Histologia básica. 11°.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2011. P. 102-121.
- KANTA, J. Collagen matrix as a tool in studying fibroblastic cell behavior. *Cell Adh Migr.* 2015;9(4):308-16. doi: 10.1080/19336918.2015.1005469. Epub 2015 Mar 3. PMID: 25734486; PMCID: PMC4594574.

- KAYE, P.M, BEATTIE L. Lessons from other diseases: granulomatous inflammation in leishmaniasis. *Semin Immunopathol.* 2016 Mar;38(2):249-60. doi: 10.1007/s00281-015-0548-7. Epub 2015 Dec 17. PMID: 26678994; PMCID: PMC4779128.
- KIESELOVA, K., SANTIAGO, F., AMADO, C., & HENRIQUE, M. Case for diagnosis. Solitary violaceous nodule on the toe. *Anais Brasileiros De Dermatologia*, 93(4), 595–597 (2018). <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20187445>
- KIM, S. Y., & NAIR, M. G. Macrophages in wound healing: activation and plasticity. *Immunology and cell biology*, 97(3), 258-267, 2019.
- KISSELEVA, T., BRENNER, D.A., Mechanisms of fibrogenesis. *Experimental biology and medicine* 233: 109-122, 2008.
- KLOC, M., GHOBRIAL, R. M., WOSIK, J., LEWICKA, A., LEWICKI, S., & KUBIAK, J. Z. Macrophage functions in wound healing. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13(1), 99-109, 2019.
- KUJAN O, Al-SHAWAF, A.Z, AZZEGHAIBY, S, AIMANADILLE A, AZIZ K, RAHEEL S.A. Immunohistochemical comparison of p53, Ki-67, CD68, vimentin,  $\alpha$ -smooth muscle actin and alpha-1-antichymotry-psin in oral peripheral and central giant cell granuloma. *J Contemp Dent Pract.* 2015 Jan 1;16(1):20-4. doi: 10.5005/jp-journals-10024-1629. PMID: 25876945.
- KUMAR A, DAS S, MANDAL A, VERMA S, ABHISHEK K, KUMAR A, KUMAR V, GHOSH AK, Das P *Leishmania* infection activates host mTOR for its survival by M2 macrophage polarization. *Parasite Immunol.*, 40 (11): e12586, 2018.
- LAU SK, Chu PG, Weiss LM. CD163: a specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples. *Am J Clin Pathol.* 122: 794-801, 2004.
- LODYGA M, HINZ B. TGF-B1 - A truly transforming growth factor in fibrosis and immunity. *Semin Cell Dev Biol.* 2019
- LUPHER, MR Jr., W.M. Gallatin, Regulation of fibrosis by the immune system, *Adv Immunol* 89 245-88, 2006.
- MACCALLINI, C., PATRUNO, A., BESKER, N., ALI, J.I., AMMAZZALORSO, A., DE FILIPPIS, B., FRANCESCHELLI, S., GIAMPIETRO, L., PESCE, M., REALE, M., TRICCA, M.L., RE, N., FELACO, M., AMOROSO, R., 2009, Synthesis, Biological Evaluation, and Docking Studies of N-Substituted Acetamidines as Selective Inhibitors of Inducible Nitric Oxide Synthase. *Journal of medicinal chemistry J Med Chem.* 2009 Mar 12;52(5):1481-5.
- MASSENO, A.P.B, PORTO, C.D, NUNES, L.C, SEQUEIRA, J.P e ALVARENGA, M.A, Miofibroblastos: Revisão de literature, *Vet e Zootecnia* 2010, 177-190
- MINUTTI CM, KNIPPER JA, ALLEN JE, ZAISS DM. Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. *Semin Cell Dev Biol.* 2017
- MOELLER J.B, NIELSEN M.J, REICHHARD M.P, SCHLOSSER A, SORENSEN G.L, NIELSEN O, TORNOE I, GRONLUND J, NIELSEN M.E, JORGENSEN J.S, JENSEN O.N, MOLLENHAUER J, MOESTRUP S.K, HOLMSKOV U. CD163-L1 is an endocytic macrophage protein strongly regulated by mediators in the inflammatory response. *J Immunol.* 2012 Mar 1;188(5):2399-409. doi: 10.4049/jimmunol.1103150. Epub 2012 Jan 25. PMID: 22279103.
- MORRIS RT, FINE DM, LEES SJ, BOOTH FW, LINK CD, FERRARIO CM, STUMP CS, SOWERS JR. Exercise training prevents development of cardiac contractile dysfunction in hypertensive TG (mREN-2) rats. *J Am Soc Hypertens.* 1: 393-9, 2007.
- MONTES, G. S. Structural biology of the fibers of the collagenous and elastic systems. *Cell biology international*, 20: 15-27, 1996.
- MOSSER, D.M., The many faces of macrophage activation. *Journal of leukocyte biology* 73,

209-212, 2003.

MOSSER, D.M., EDWARDS, J.P., Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews* 8, 958-969, 2008.

MOURA, D.F, DE MATTOS, K.A, AMADEU, T.P, ANDRADE, P.R, SALES, J.S, SCHMITZ, V, NERY, J.A, PINHEIRO, R.O, SARNO, E.N. CD163 favors Mycobacterium leprae survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. *Eur J Immunol.* 2012 Nov;42(11):2925-36. doi: 10.1002/eji.201142198. Epub 2012 Sep 14. PMID: 22851198.

MUNDER, M., Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *British journal of pharmacology* 158, 638-651, 2009.

NAGASE H, VISSSE R, MURPHY G. Structure and function of matrix metalloproteinases and

TIMPs. *Cardiovasc Res.* Feb 69: 562-73, 2006.

PAKSHIR P, ALIZADEHGIASHI M, WONG B, COELHO NM, CHEN X, GONG Z, SHENOY VB, MCCULLOCH CA, HINZ B. Dynamic fibroblast contractions attract remote macrophages in fibrillar collagen matrix. *Nat Commun.* 10:1850, 2019.

PARISE-FORTES MR, MIOT HA, KUROKAWA CS, MARQUES MEA, MARQUES AS. Imunologia da paracoccidiodomicose. *An Bras Dermatol.* 2011;86(3):516-25.

PAGÁN AJ, RAMAKRISHNAN L. The Formation and Function of Granulomas. *Annu Rev Immunol.* 2018 Apr 26;36:639-665. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-100022. Epub 2018 Feb 5. PMID: 29400999

PASSLICK B1, FLIEGER D, ZIEGLER-HEITBROCK HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood *Blood.* 74 :2527-34, 1989

PEDREIRA R.P.G, DE CARLI M.L, BEIJO, L.A, NONOGAKI, S, PEREIRA, A.A, JUNIOR N.V, SPERADIO F.F, HANENNAN J.A. Oral Paracoccidiodomycosis Granulomas are Predominantly Populated by CD163+ Multinucleated Giant Cells. *Mycopathologia.* 2016 Oct;181(9-10):709-16. doi: 10.1007/s11046-016-0016-5. Epub 2016 May 28. PMID: 27236303.

POLLARD, T.D. & EARNSHAW, W.C. – *Biologia celular.* Rio de Janeiro, Elsevier, 2006.

RAMOS-VARA, J.A.; Kiupel, M.; Baszler, T.; Bliven, et al. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J Vet Diagn Invest,* 20, 293–413, 2008.

REA, T.H.; MODLIN, R.L. In: FTZPATRICK, T.B.; EISEN, A.Z.; WOLFF, K.; FREEDBERG, I.L.; AUSTEN, K.F. *Tratado de Dermatologia.* 5. ed. Rio de Janeiro, Revinter Ltda, v.2., 2005.

RODRÍGUEZ G, ARIAS V. Giant cells lepromatous leprosy. Diffuse dermatitis with exuberant foreign body giant cells in treated lepromatous leprosy. *Biomedica.* 2019 Aug 1;39(Supl. 2):26-31. English, Spanish. doi: 10.7705/biomedica.v39i4.4493. PMID: 31529831.

RODRIGUEZ JA, ORBE J, MARTINEZ DE LIZARRONDO S, CALVAYRAC O, RODRIGUEZ C, MARTINEZ-GONZALEZ J, PARAMO JA. Metalloproteinases and atherothrombosis: MMP-10 mediates vascular remodeling promoted by inflammatory stimuli. *Front Biosci.* 13: 2916-21, 2008

ROCHA, R.M.; MILLER, K.; SOARES, F.; VASSALLO, J.; SCHENKA, N.; GOBBI, H. The use of the immunohistochemical biotin-free visualization systems for estrogen receptor evaluation of breast câncer. *Applied Cancer Research,* 29:112-117, 2009.

ROUSSEY, J.A., OLSZEWSKII A.M, OSTERHOLZER, J.J. "Imunoregulação em Doenças Fúngicas" *Micro-organismos* 4, nº 4: 47. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4040047> 2016.

SATOH T, NAKAGAWA K, SUGIHARA F, KUWAHARA R, ASHIHARA M, YAMANE

- F, MINOWA Y, FUKUSHIMA K, EBINA I, YOSHIOKA Y, KUMANOGOH A, AKIRA S. Identification of an atypical monocyte and committed progenitor involved in fibrosis. *Nature*. 541: 96-101, 2017.
- SHAPOURI MOGHADDAM A., MOHAMMADIAN S., VAZINI H., TAGHADOSI M, SEYED-ALIREZA E., MARDANI F, SEIFI B, MOHAMMADI A, AFSHARI J.T., SAHEBKAR, A. Macrophage plasticity, polarization and function in health and disease, *Journal of Cellular Physiology* 19: 2017
- SIRUM KL, BRINCKERHOFF CE. Cloning of the genes for human stromelysin and stromelysin 2: differential expression in rheumatoid synovial fibroblasts. *Biochemistry*. 28: 8691-8. 1989
- SOUZA-LEMOS C, DE-CAMPOS, S.N, TEVA, A, CÔRTE-REAL, S, FONSECA, E.C, PORROZI, R, GRIMALDI, G Jr. Dynamics of immune granuloma formation in a *Leishmania braziliensis*-induced self-limiting cutaneous infection in the primate *Macaca mulatta*. *J Pathol*. 2008 Nov;216(3):375-86. doi: 10.1002/path.2403. PMID: 18702174.
- STRAUSS-AYALI, D., CONRAD, S.M., MOSSER, D.M. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *Journal of leukocyte biology* 82, 244-252. 2007
- SHOOK, B.A, WASKO, R.R, RIVERA-GONZALEZ G.C, SALAZAR-GATZIMAS, E, LÓPEZ-GIRÁLDEZ, F, DASH, B.C, MUÑOZ-ROJAS A.R, AULTMAN, K.D, ZWICK, R.K, LEI, V, ARBISER J.L, MILLER-JENSEN, K, CLARK, D.A, HSIA, H.C, HORSLEY, V. Myofibroblast proliferation and heterogeneity are supported by macrophages during skin repair. *Science*. 2018 Nov 23;362(6417):eaar2971. doi: 10.1126/science.aar2971. PMID: 30467144; PMCID: PMC6684198.
- TAFURI, W.L.; SANTOS, R.L.; ARANTES, R.M.; GONÇALVES, R.; DE MELO, M.N.; MICHALICK, M.S.; TAFURI, W.L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J. Immunol. Methods*, 292: 7-23, 2004.
- TOMLIN, H, PICCININI A.M. A complex interplay between the extracellular matrix and the innate immune response to microbial pathogens. *Immunology*. 2018 Oct;155(2):186-201. doi: 10.1111/imm.12972. Epub 2018 Jul 5. PMID: 29908065; PMCID: PMC6142291.
- VIOLA A, MUNARI F, SÁNCHE-RODRÍGUEZ R, SCOLARO T, CASTEGNA A. The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Front Immunol*. 2019 Jul 3;10:1462. doi: 10.3389/fimmu.2019.01462. PMID: 31333642; PMCID: PMC6618143.
- VON DER MARK, K.; VON DER MARK, H.; GAY, S. Study of differential collagen synthesis during development of the chick embryo by immunofluorescence. II. Localization of type I and type II collagen during long bone development. *Dev Biol*, 53, 153-70, 1976.
- WILKINS-PORT CE1, YE Q, MAZURKIEWICZ JE, HIGGINS PJ. TGF-beta1 + EGF initiated invasive potential in transformed human keratinocytes is coupled to a plasmin/MMP-10/MMP-1-dependent collagen remodeling axis: role for PAI-1. *Cancer Res May* 69: 4081-91, 2009.
- WYNN, T.A. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nature reviews* 4, 583-594. 2004
- WYNN, T.A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of pathology* 214, 199-210, 2008.
- YUNNA C, MENGRU H, LEI W, WEIDONG C. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur J Pharmacol*. 2020 Jun 15;877:173090. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173090. Epub 2020 Mar 29. PMID: 32234529.

YAN J, HORNG T. Lipid Metabolism in Regulation of Macrophage Functions. *Trends Cell Biol.* 2020 Dec;30(12):979-989. doi: 10.1016/j.tcb.2020.09.006. Epub 2020 Oct 6. PMID: 33036870.

ZAVADIL, J., BOTTINGER, E.P. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 24, 5764-5774, 2005.

ZIEGLER-HEITBROCK HW, PASSLICK B, FLIEGER D. The monoclonal antimonocyte antibody My4 stains B lymphocytes and two distinct monocyte subsets in human peripheral blood. *Hybridoma* 7: 521-7, 1988.