Avaliação dos micronúcleos de células inflamatórias em pacientes com esporotricose e cromomicose

Reginaldo Gonçalves de Lima Neto[1]
Jorge Luiz Silva Araújo-Filho[2]
Mário Ribeiro de Melo-Junior[2]

Resumo
Atualmente, micoses subcutâneas, como a esporotricose (ST) e cromomicose (CM), possuem grande incidência na América Latina. Seus sinais clínicos ocorrem inicialmente com a formação de nódulos gomosos na ST e lesões eritematosas e verrucosas na CM, ambas evoluindo para lesões granulomatosas, geralmente combinadas com pseudocarcinomas, formadas principalmente pelo sistema fagocítico-mononuclear, plasmócitos e células gigantes tipo Langerhans. Como conseqüência dessa resposta imune, as células inflamatórias intensificam seu metabolismo e aumenta a síntese protéica, o que conduz a formação de micronúcleos. Os micronúcleos são porções da cromatina oriundas de mitoses aberrantes. Este estudo tem como objetivo quantificar o número médio de micronúcleos por célula inflamatória nas lesões cutâneas de ST e CM. Foram selecionadas biópsias de tecido epidérmico de pacientes portadores de ST (n=10) ou CM (n=10). Realizou-se citoquímica pela coloração com a reação de Feulgen e a contracoloração com Fast Green. Os resultados obtidos indicam que a freqüência dos micronúcleos é significativamente mais alta nas lesões características de ST, quando comparada à dos casos de CM ($p<0,05$). Os resultados preliminares sugerem diferentes mecanismos citogenéticos de resposta das células inflamatórias, embora os perfis histopatológicos das lesões sejam semelhantes.

Palavras-chave: Micronúcleos – Esporotricose - Cromomicose- Feulgen, reação de; Esporotricose; Cromomicose.

INTRODUÇÃO

Atualmente, micoses subcutâneas, como a esporotricose e cromomicose, possuem grande incidência na América Latina (BRUMMER; CASTAÑEDA; RESTREPO, 1993). Estima-se que cerca de 90 milhões de pessoas podem estar acometidas por uma dessas micoses, que são, irrefutavelmente, de difícil tratamento (RESTREPO; McEWEN; CASTAÑEDA, 2001).

Os seus sinais clínicos ocorrem inicialmente com a formação de nódulos gomosos na esporotricose e lesões eritematosas e (ou) verrucosas na cromomicose, ambas evoluindo para lesões granulomatosas, geralmente combinadas com pseudocarcinomas hiperplásicos, formadas principalmente pelo sistema fagocítico-mononuclear, células plasmáticas de defesa e células gigantes tipo Langhans ou Corpo estranho (RUBIN; FARBER, 1999).

Diversos critérios morfológicos têm sido utilizados para descrever ou nomear a agressividade de um processo patológico. Den-

[1]Departamento de Micologia. Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco – UFBA
[2]Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami. Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Correspondência para / Correspondence to:
Prof. Dr. Mario Ribeiro de Melo-Junior
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA). Setor de Patologia. Campus Universitário
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE
Av. Morais Rêgo s/n
50670-91. Recife – Pernambuco – Brasil
Tel./Fax: (81) 2126-8484 / 2126-8485
E-mail: mariormj@gmail.com

tre esses critérios, incluem-se o tipo histológico, o grau de polimorfismo nuclear, a presença ou ausência de resposta inflamatória, o número de mitoses e o comprometimento de vasos sangüíneos e linfáticos além de alterações na matriz extracelular, dentre outros (PAES, 1995).

À histoquímica apresenta-se como um método conspícuo, que irá determinar, através das mais diversas técnicas de marcação, os imensuráveis componentes bioquímicos que constituem os sistema biológicos (SPICER, 1987). Alguns marcadores histoquímicos são reconhecidos como fatores prognósticos bastante característicos, como, por exemplo, marcadores de proliferação celular, tais como a ploidia do DNA e densidade de micronúcleos (CARRECA; BALDUCCI; EXTERMANN, 2005).

Micronúcleos podem ser formados a partir de aberrações cromossômicas em células de diferentes tecidos que sofrem divisão celular constantemente ***in vivo***, ou em células que são submetidas a divisões celulares ***in vitro***. A perda de fragmentos cromossômicos e a formação de micronúcleos provavelmente variam entre as células, dependendo das propriedades dos tecidos às quais pertencem. O tamanho e a forma tanto das células quanto dos cromossomos podem influenciar a probabilidade de exclusão desse último do núcleo filho, tornando-se, então, um núcleo do citoplasma (DIAS; OLIVEIRA; SANTELLI, 2005).

Os mecanismos que levam à formação de micronúcleos são: a perda de fragmentos acêntricos ou de cromossomos inteiros, a inativação do cinetócoro, a formação de uma ponte cromossômica forte como conseqüência de um entrelaçamento de cromossomos, ou ainda a apoptose com subseqüente fagocitose (DIAS; OLIVEIRA; SANTELLI, 2005).

A análise do conteúdo do DNA envolve duas áreas fundamentais. A primeira permite a avaliação do estado da ploidia das populações celulares normais e anormais. Em contrapartida, células em situações patológicas, freqüentemente apresentam uma quantidade de DNA diferente de 2N (aneuplóide), refletindo a perda ou ganho de DNA, resultante de mutações cromossômicas, tanto por amplificações quanto por deleções (SHACKNEY; SHANKEY, 1995).

A segunda área de análise do DNA é dependente do estudo dinâmico da cinética celular, através da quantificação das células entre os vários estágios do ciclo celular. Esse tipo de avaliação possibilita um melhor conhecimento da atividade proliferativa da população celular estudada, permitindo informações a respeito do diagnóstico, prognóstico e monitorização da resposta da doença à terapêutica, uma vez que nem todas as células de defesa apresentam-se no mesmo estágio proliferativo no ciclo celular (DIAS; OLIVEIRA; SANTELLI, 2005).

Os dados indicam, geralmente, um prognóstico ruim nas patologias aneuplóides, que são relacionados à menor sobrevida e tempo de recorrência. (COHEN, 1996). No entanto, os resultados da análise do DNA não devem ser usados como única base para decisões clínicas: devem ser usados em conjunto com parâmetros clínicos e laboratoriais (HAROSKE et al., 1998).

O perfil da ploidia do DNA pode ser um indicador útil no prognóstico das micoses subcutâneas, e pode ser obtido através da observação de micronúcleos. Essas estruturas são porções de cromatina resultantes de mitoses aberrantes que permanecem próximas ao núcleo celular, e sua freqüência tem sido utilizada para avaliar o grau de injúria genotóxica que as células podem sofrer (REIS et al., 2002).

A reação de Feulgen, proposta por Feulgen e Rossenbeck há mais de 80 anos, é até hoje bastante utilizada como técnica de citohistoquímica, para evidenciar micronúcleos (CHIECO; DERENZINI, 1999). Atualmente, sua aplicação na microscopia eletrônica proveu uma ferramenta sem igual para investigar ***in situ*** a organização estrutural dos componentes celulares que contêm DNA (DERENZINI, 1995).

A intensidade de coloração é proporcional à concentração de DNA. A reação de Feulgen foi amplamente estudada desde 1924 por vários autores, em sua especificidade, e, ao final dos anos quarenta, tinha se tornado uma das reações químicas mais investigadas para quantificação de DNA (CHIECO; DERENZINI, 1999).

Entretanto, existem poucos estudos que utilizam a análise de micronúcleos em tecidos que apresentam infecção profunda de etiologia fúngica. Além disso, poucos estudos histoquímicos relacionam a esporotricose e a cromomicose, no que tange às lesões subcutâneas. Essas micoses apresentam patogenias bastante semelhantes, sendo necessário um estudo histopatológico mais aprofundado que determinará suas distinções. Dessa forma, o presente estudo utilizou-se da histoquímica, a partir da reação de Feulgen para avaliar a densidade de micronúcleos em células da resposta inflamatória na esporotricose e cromomicose.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção dos casos

Foram selecionadas biópsias de tecido epidérmico de pacientes de ambos os sexos e idade média de 40 anos, com diagnóstico positivo para ES (n=10) ou CM (n=10), que apresentavam lesões granulomatosas, provenientes do serviço de dermatologia do Hospital das Clínicas da UFPE e do Centro Integrado de Anatomia Patológica – CIAP do Hospital Oswaldo Cruz da UPE.

Procedimento histológico

Todos os fragmentos selecionados foram fixados em formalina a 10%, submetidos à rotina histológica e incluídos em parafina. De todos os tecidos, foram obtidos cortes (4 µm) montados em lâminas histológicas, coradas pela reação de Feulgen (com o corante reativo de Schiff), segundo protocolo modificado de Chieco e Derenzini (1999), e contracoradas com o "Fast Green", para verificação da presença e quantificação de micronúcleos.

Análise de micronúcleos e células micronucleadas

O parâmetro morfométrico adotado foi contagem de cinco campos/área aleatoriamente em cada lâmina, contando-se o número de micronúcleos em um total de 10 células por campo/área. Todas as análises foram realizadas na magnificação de 400x.

A avaliação das lâminas foi procedida em teste cego, no qual o observador não teve conhecimento das micoses estudadas. Os critérios utilizados para identificação dos micronúcleos foram previamente estabelecidos por Countryman e Heddle (1976): 1) presença de material nuclear; 2) terem intensidade de luz maior ou igual ao do núcleo; 3) terem forma circular ou oval; 4) possuírem área menor que 1/5 do núcleo e 5) estarem completamente separados do núcleo.

Análise estatística

Os padrões de marcação obtidos pela citoquímica, entre os grupos estudados, foram analisados estatisticamente, utilizando-se os testes t de Student ($p < 0,05$) através do software PRISMA 3.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A dificuldade no diagnóstico de muitas micoses subcutâneas está relacionada a vários fatores, tais como a ampla variedade de lesões e seus subtipos morfológicos. Outro fator importante diz respeito aos diferentes agentes etiológicos, uma vez que vários estudos demonstram que, macroscopicamente, as lesões subcutâneas são bastante assemelhadas, embora sejam oriundas de fungos diferentes.

Dessa forma, devido ao fato de que são escassos os estudos sobre as alterações celulares em micoses subcutâneas, pelos diferentes agentes etiológicos envolvidos, pareceu-nos oportuno investigar, à luz da reação de Feulgen, a densidade de micronúcleos presentes em células inflamatórias em lesões relacionadas à esporotricose e cromomicose.

No procedimento histológico, foram contadas 1000 células dos 20 casos obtidos para estudo, onde foram contabilizados cerca de 2000 micronúcleos. Os resultados obtidos indicam uma freqüência significativamente maior de micronúcleos em células inflamatórias nas lesões subcutâneas ocasionadas pela esporotricose, quando comparada à freqüência

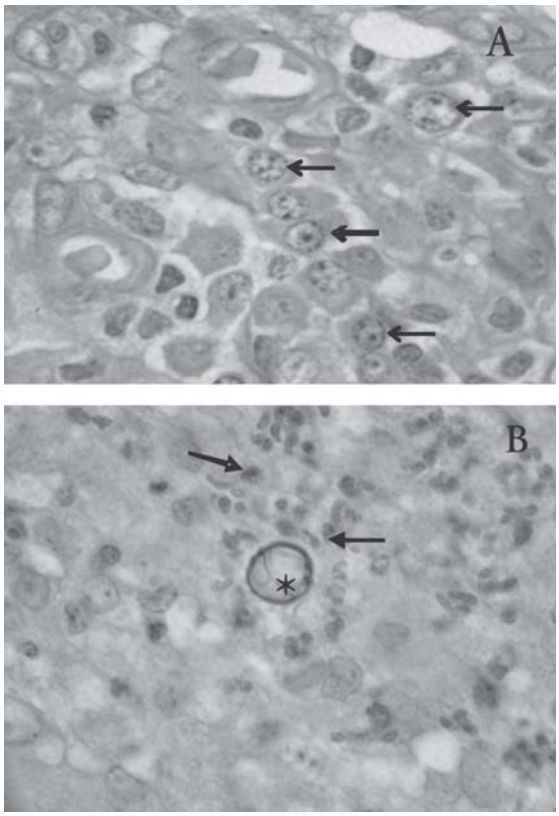

Figura 1. ***A)*** Esporotricose subcutâneas Feulgen positiva, exibindo vários micronúcleos em células imunológicas (setas). ***B)*** Lesão de pele ocasionada por cromomicose, exibindo algumas células inflamatórias aneuplóides (setas) e corpo fumagóide no centro (*). Reação de Feulgen. Magnificação 400x

apresentado nas lesões características da cromomicose (Figura 1).

Os tipos predominantes de células inflamatórias encontradas neste estudo foram polimorfonucleares, macrófagos e eventuais linfócitos reativos e plasmócitos.

Os mecanismos imunológicos de respostas aos fungos são, principalmente, de origem celular, e envolvem neutrófilos, macrófagos, linfócitos e, em menor extensão, as células NK (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 1997).

Os polimorfonucleares e os macrófagos são as células envolvidas com a fagocitose de fungos (principalmente leveduriformes). Os neutrófilos apresentam atividade fagocítica mais efetiva, enquanto que os macrófagos podem tê-la comprometida devido à composição química da parede celular do fungo, que possui quitina, lâminas insolúveis de fibrila resistentes à lise pela fagocitose ou pelo complemento, sendo responsáveis pelo desencadeamento de lesões granulomatosas (CORBELLINI; ANICET; SCROFERNEKER, 1996).

Os neutrófilos secretam substâncias que evitam o crescimento da hifa e a invasão da derme, restringindo sua localização às camadas superficiais da pele (BIER et al., 1989).

A interação inicial entre os neutrófilos e os fungos ocorre por intermédio de polímeros de manose associados a peptídeos, os peptidomananos, que constituem o principal glicano da parede celular fúngica, já que esses têm capacidade de produzir estimulação antigênica no hospedeiro. Inicialmente, o neutrófilo se liga à superfície da hifa e, posteriormente, ocorre ligação aos componentes internos das hifas, que se tornam acessíveis após terem sido danificadas. O próprio peptidomananos pode servir como fator de inibição da interação entre neutrófilos e os microorganismos, quando ele é secretado no meio (BIER et al., 1989).

Os mecanismos bioquímicos envolvidos na destruição de partículas fúngicas fagocitadas por neutrófilos compreendem processos oxidativos e não-oxidativos, que se desenvolvem nos fagolisossomas antes e após a fusão com grânulos azurofílicos ou específicos. Esses mecanismos podem envolver espécies químicas como peróxidos, superóxidos e haletos, peptídeos catiônicos e não-catiônicos, e até um complexo calcoprotéico (MURPHY et al., 1993).

O mecanismo de interação entre fungo e macrófagos é semelhante aos dos neutrófilos. Todavia os macrófagos só conferem uma resposta imune protetora após serem ativados por citocinas derivadas de linfócitos T, principalmente IFN-ã. Macrófagos normais são incapazes de inibir a replicação dos fungos, mas, ativados por IFN- ã, são competentes para lisá-los, por um mecanismo independente dos produtos do metabolismo do oxigênio (KIRKPATRICK, 1996; ZAITZ et al., 1998).

A resistência adquirida a infecções por fungos depende crucialmente de linfócitos T, que promovem erradicação estéril dos fungos menos patogênicos e ***clearence*** parcial e contenção, através de lesões granulomatosas dos mais patogênicos. A formação e a manutenção dos granulomas são orquestradas pelos linfócitos T, e a coordenação entre linfócitos T, macrófagos e outras células é promovida pelas citocinas (ZAITZ et al., 1998; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Os granulomas, lesões teciduais características das micoses subcutâneas originadas por agentes etiológicos de esporotricose e cromomicose, por exemplo, restringem o crescimento fúngico e confinam a infecção, conferindo proteção por efeitos de macrófagos ativados, que inibem o crescimento fúngico, pela encapsulação promovida pela fibrose e pela necrose, que reduz a oferta de nutrientes e de oxigênio (RUBIN; FARBER, 1999; ZAITZ et al., 1998; LACAZ et al., 2002).

A resposta humoral específica não está totalmente esclarecida, mas depende da produção de anticorpos por plasmócitos devidamente programados. Os fungos são pouco suscetíveis ao ataque de anticorpos, tendo eles apenas a função de opsonização. Os antígenos fúngicos estimulam a produção de anticorpos que podem ser detectados através de provas sorológicas. Essas provas, capazes de identificar e quantificar os anticorpos circulantes, têm finalidade diagnóstica e prognóstica, servindo para o controle de cura de algumas micoses profundas (ZAITZ et al., 1998; SIDRIM; ROCHA, 2004).

A partir desses dados, é possível acreditar em uma maior atividade proliferativa das células do infiltrado inflamatório nos casos de esporotricose, em relação a cromomicose. Tal dinâmica celular se reflete no número médio de micronúcleos quantificados morfometricamente nas duas entidades patológicas (Gráfico 1).

Segundo dados clínicos e histológicos (RUBIN; FARBER, 1999) já conhecidos na literatura, as lesões histopatológicas subcutâneas, relacionadas às micoses causadas pelos agentes etiológicos de esporotricose e cromomicose

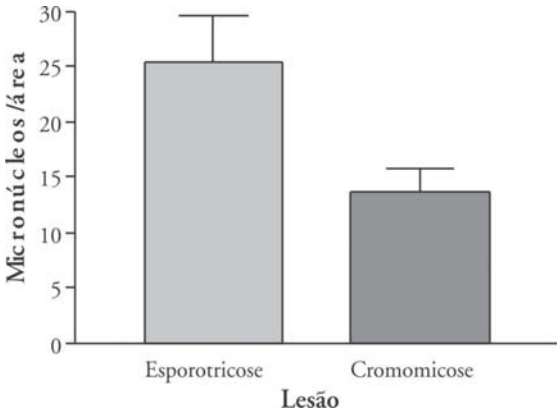

Gráfico 1. Número médio de micronúcleos em células epidérmicas com esporotricose e cromomicose

estudados, apresentam características morfológicas bastante similares (lesões granulomatosas), sendo, na maioria dos casos, necessário o isolamento do agente etiológico para se definir o diagnóstico de esporotricose ou cromomicose (KERR et al., 2006).

Parece que não existem estudos histológicos com pretensão de elucidar esse fato peculiar e buscar, ao mesmo tempo, novas ferramentas, além dos exames micológicos de rotina, que auxiliem o investigador a distinguir, em amostras de pele, que tipo de micose está ocasionando a lesão.

Dessa forma, podemos concluir que a técnica de Feulgen, com o corante reativo de Schiff, demonstrou ser satisfatória para a evidenciação de micronúcleos em tecido parafinizado de epiderme. A referida técnica possibilitou a constatação de um aumento estatisticamente significante no número médio de micronúcleos em células inflamatórias nas lesões subcutâneas ocasionadas pela esporotricose, quando comparada ao número médio evidenciado nas lesões características da cromomicos. E apesar de as lesões subcutâneas relacionadas às micoses esporotricose e cromomicose apresentarem características morfológicas semelhantes, têm perfis histopatológicos bastante diversos, no que se fere à presença de fragmentos cromossômicos resultantes de aberrações cromossômicas.

Evaluation of the micronuclei from inflammatory cells into sporotrichosis and chromoblastomycosis patients

Abstract

Subcutaneous mycoses as the sporotrichosis (ST) and chromoblastomycosis (CM), possess great incidence in Latin America. Their clinical signs happen initially with the formation of nodular lesions in ST and verrucoid or warty lesions in the CM, both developing for granulomatous microabscesses merged with pseudoepitheliomatous hyperplasia, that consist of neutrophils, macrophage and Langhans'giants cells. As consequence of that immune response, the inflammatory cells intensify theirmetabolism and increase the protein synthesis, what leads the micronucleus formation. Micronuclei are chromatin fragments proceeding aberrant mitoses. The aim of this study was to assess the frequency of micronuclei of inflammatory cell in the cutaneous lesions of ST and CM. Biopsies of epidermal tissue of patient carriers of ST (n=10) or CM (n=10) were selected. Cytochemistry was carried out by staining with Feulgen reaction and the counter-stained with Fast Green. The obtained results indicate that micronuclei frequency is significantly higher in the characteristic lesions of ST, when compared to the cases of CM (p<0.05). The preliminary results suggest different cytogenetic mechanisms of response of the inflammatory cells, although the histopatologic profiles of the lesions are similar.

Keywords: Micronucleus - Sporotrichosis – Chromoblastomycosi - Feulgen; Sporotrichosis; Chromoblastomycosis..

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. ***Celular and molecular immunology***. 3.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1997.

BIER, O.G. et al. Imunologia básica e aplicada. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989.

BRUMMER, E.; CASTAÑEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. ***Clin. Microbiol. Rev.,*** Washington, DC, v.6, n.2, p.89-117, 1993.

CARRECA, I.; BALDUCCI, L.; EXTERMANN, M. Cancer in the older person. ***Cancer Treat. Rev.,*** London, v.31, n.5, p.380-402, 2005.

CHIECO, P.; DERENZINI, M. Cancer review. ***Histochem. Cell Biol.,*** Berlin, v.111, p.345–358, 1999.

COHEN, C. Image cytometric analysis in pathology. ***Hum. Pathol.,*** Philadelphia, v.27, n.5, p.482-493, 1996.

CORBELLINI, V.A.; ANICET, K.L.; SCROFERNEKER, M.L. Imunologia dos fungos. In: SCROFERNEKER, M.L. (Coord.) ***Notas de imunologia.*** Porto Alegre: Ed. UFRGS, 1996. cap.21, p.317-323.

COUNTRYMAN, P.I.; HEDDLE, J.A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. ***Mutat. Res.,*** Amsterdam, v.41, n.2/3, p.321-332, 1976.

DERENZINI, M. Ultrastructural cytochemistry. In: MOREL, G. (Ed). ***Visualization of nucleic acids.*** Boca Raton: CRC Press, 1995. p.69–93.

DIAS, V.M.; OLIVEIRA, R.M.; SANTELLI, G.M.M. Using fluorescence for improvement of the quantitative analysis of micronucleus in cell culture. ***Mutat. Res.,*** Amsterdam, v.565, p.173–179, 2005.

HAROSKE, G. et al. 1997 ESACP consensus report on diagnostic image cytometry. Part I:

basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation. ***Anal. Cell Pathol.,*** Amsterdam, v.17, n.4, p.189-200, 1998.

KERR, A. et al. Comparison of two DNA-specific staining protocols, Feulgen-Thionin and Feulgen-PAS for DNA ploidy measurements of oral epithelial cells. ***Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.***, St. Louis, v.103, n.3, p.339, 2006.

KIRKPATRICK, C.H. Immune responses to fungi. In: RICH, R.R. et al. ***Clinical immunology:*** principles and practice. Saint Louis: Mosby, 1996. v.1, p.571-578.

LACAZ, C.S. et al. ***Tratado de micologia médica.*** São Paulo: Sarvier, 2002.

MURPHY, A.R.K. et al. Calcoprotection complex. ***J. Immunol.***, Baltimore, v.151, p.62-91, 1993.

PAES, R. Marcadores prognósticos em neoplasias mamárias. In: WAKAMATSU, A. et al. ***Manual de imuno-histoquímica***. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1995. p.62-69.

REIS, S.R.A. et al. Genotoxic effect of ethanol on oral mucosa cells. ***Pesq. Odontol. Bras.,*** São Paulo, v.16, n.3, p.221-225, 2002.

RESTREPO, A.; McEWEN, J.G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of ***Paracoccidioides brasiliensis***: how far from solving the riddle? ***Med. Mycol.***, Oxford, v.39, n.3, p.233-241, 2001.

RUBIN, E.; FARBER, A.L. Fungal infections. In: _____. ***Pathology.*** Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999. p.230-236.

SHACKNEY, S.E.; SHANKEY, T.V. Genetic and phenotypic heterogeneity of human malignancies: finding order in chaos. ***Cytometry,*** New York, v.21, n.1, p.2-5, 1995.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.G.F. ***Micologia médica à luz de autores contemporâneos.*** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SPICER, S.S. ***Histochemistry in pathologic diagnosis.*** New York: Dekker, 1987.

ZAITZ, C. et al. ***Compêndio de micologia médica.*** Rio de

Recebido em / Received: 12/062008
Aceito em / Accepted: 19/082008