

UNIVERSIDADE DE UBERABA
CURSO DE ODONTOLOGIA

GABRIELLE LUIZA DE CARMARGOS PESSOA

**ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO DE PROTEÍNAS DA VIA INTRÍNSECA DA
APOPTOSE (BCL-2, BAK) EM CÉLULAS DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO
DE LESÕES ORAIS DE HISTOPLASMOSE**

UBERABA, MG
2022

GABRIELLE LUIZA DE CAMARGOS PESSOA

**ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO DE PROTEÍNAS DA VIA INTRÍNSECA DA
APOPTOSE (BCL-2, BAK) EM CÉLULAS DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO
DE LESÕES ORAIS DE HISTOPLASMOSE**

Trabalho apresentado à Universidade de
Uberaba, como parte dos requisitos para
conclusão de curso de graduação em
Odontologia da Universidade de Uberaba

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Sivieri de Araújo

UBERABA, MG
2022

GABRIELLE LUIZA DE CAMARGOS PESSOA

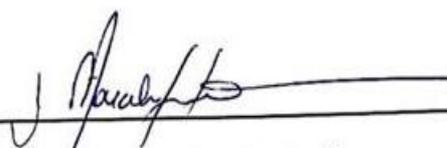
**ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO DE PROTEÍNAS DA VIA INTRÍNSECA
DA APOPTOSE (BCL-2, BAK) EM CÉLULAS DO INFILTRADO
INFLAMATÓRIO DE LESÕES ORAIS DE HISTOPLASMOSE**

Trabalho apresentado à Universidade de
Uberaba, como parte dos requisitos para
conclusão de curso de graduação em
Odontologia da Universidade de
Uberaba

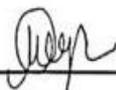
Área de concentração: Odontologia

Aprovada em: 02/07/22

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Marcelo Sivieri de Araújo



Prof.ª Maria Angelica Hueb de Menezes Oliveira

A Deus por me iluminar durante esses 4 anos me dando saúde e determinação, e a minha família, pelo carinho e apoio nessa trajetória, propiciando as condições necessárias para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Sivieri de Araújo, por me orientar desde o quarto período, por ter me dado oportunidades de participar de projetos durante a graduação, pelo estímulo e competente orientação durante a pesquisa. Obrigada pela confiança depositada em mim e por todos os ensinamentos e incentivos ao longo destes anos. Me sinto honrada por ter sido sua aluna durante a graduação. Agradeço também aos demais mestres e professores que tive ao longo da graduação, vocês foram extremamente importantes nessa caminhada.

Agradeço também a PROPEPE (Pró Reitoria de extensão e pesquisa) ao PIBIC (Programa de Iniciação Científica) ao PAPE (Programa de apoio a pesquisa) da Universidade de Uberaba pela oportunidade de ser aluna de iniciação científica, bolsista pela Uniube por um ano, e a pela oportunidade de apresentação no SEMIC (seminário de iniciação científica) em 2021. Foi uma experiência gratificante, de grande valia e aprendizado, além de um enriquecimento ao meu currículo.

RESUMO

A Histoplasmose é uma doença fúngica que envolve o pulmão, pele e mucosa oral, onde a eficácia da resposta imune contra a doença, envolve mecanismos efetores celulares e moleculares que exercem influência na defesa do hospedeiro contra o fungo. Entre os elementos imunológicos que modulam o curso da infecção está a apoptose. Estudos demonstram que a inibição da apoptose pode influenciar no resultado da infecção em patógenos intracelulares e extracelulares e/ou modular a resposta inflamatória, afetando a resistência do hospedeiro e aumentando a suscetibilidade à infecção pelo *Histoplasma Capsulatum*. As razões pelas quais a apoptose contribui para a exacerbação da micose, ainda não foram delineadas, principalmente na cavidade oral. O objetivo do trabalho foi avaliar a imunoexpressão de proteínas da via intrínseca da apoptose (Bcl-2, Bak) em lesões orais de Histoplasmose (HO), quando comparadas com a mucosa oral com características de normalidade. Foram analisadas 16 biópsias de pacientes com HO e 14 de fragmentos de mucosa oral com características histológicas de normalidade. O material foi avaliado por meio da técnica de imuno-histoquímica indireta, onde foram quantificadas de forma semi-quantitativa as células do infiltrado inflamatório imunomarcadas com aumento de 640X, com auxílio do software "Image J". A expressão *in situ* de Bak e Bcl-2 foi significativamente maior nas biópsias dos pacientes com HO, quando comparadas com o grupo controle (Mann Whitney, $p=0,0434$). Os resultados encontrados demonstram haver uma alteração da homeostasia do microambiente nas lesões de HO em relação a quantidade da Bcl-2 e Bak, expressas pelas células inflamatórias envolvidas com a micose. O que corrobora para a hipótese de haver estímulos na cinética da via intrínseca da apoptose, que podem estar exercendo influência na implantação e manutenção do fungo no tecido do hospedeiro, onde os mecanismos utilizados pelo patógeno para escapar da ação do sistema imune, podem contribuir para a evolução e agravamento da doença na cavidade oral. Há necessidade de novos estudos sobre as demais proteínas anti e pró- apoptóticas expressas pelas células inflamatórias envolvidas na resposta imune contra o fungo, para que estas hipóteses possam ser confirmadas.

Palavras-chave: Apoptose. Cavidade oral. Histoplasmose. Via intrínseca da Apoptose.

ABSTRACT

Histoplasmosis is a fungal disease that involves the lung, skin and oral mucosa, where the effectiveness of the immune response against the disease involves cellular and molecular agents that influence the defense of the host against the fungus. Among the immunological elements that modulate the course of infection is apoptosis. Studies show that inhibition of apoptosis can influence the outcome of infection in intracellular and extracellular pathogens and/or modulate the inflammatory response, affecting host resistance and increasing susceptibility to *Histoplasma Capsulatum* infection. The reasons why apoptosis contributes to the exacerbation of mycosis have not yet been delineated, especially in the oral cavity. The objective of this study was to evaluate the immunoeexpression of proteins of the intrinsic pathway of apoptosis (Bcl-2, Bak) in oral lesions of Histoplasmosis (HO), when compared with the oral mucosa with normal characteristics. We analyzed 16 biopsies of patients with HO and 14 of fragments of oral mucosa with histological characteristics of normality. The material was evaluated using the indirect immunohistochemistry technique, where the cells of the immunomarked inflammatory infiltrate were quantified semi-quantitatively with an increase of 640X, with the aid of the software "Image J". The in situ expression of Bak and Bcl-2 was significantly higher in biopsies of patients with HO, when compared with the control group (Mann Whitney, $p=0.0434$). The results show that there is a change in microenvironment homeostasis in HO lesions in relation to the amount of Bcl-2 and Bak, expressed by the inflammatory cells involved with mycosis. This corroborates the hypothesis that there are stimuli in the kinetics of the intrinsic pathway of apoptosis, which may be exerting influence on the implantation and maintenance of the fungus in the host tissue, where the mechanisms used by the pathogen to escape the action of the immune system, may contribute to the evolution and worsening of the disease in the oral cavity. There is a need for further studies on the other anti- and pro-apoptotic proteins expressed by the inflammatory cells involved in the immune response against the fungus, so that these hypotheses can be confirmed.

Keywords: Apoptosis. Oral cavity. Histoplasmosis. Intrinsic pathway of apoptosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Imunomarcção para Bak e Bcl-2 em biópsias de pacientes com mucosa oral normal (A e B) e HO (C e D). (A) Expressão de Bak foi moderada no citoplasma de células epiteliais e escassa nas células endoteliais e fibroblásticas. (B) Expressão de Bcl-2 foi intensa tanto no citoplasma de células epiteliais, como nas células endoteliais e fibroblásticas. (C e D) A expressão de Bak e Bcl-2 foi intensa no citoplasma das células do infiltrado inflamatório, principalmente no interior de macrófagos com o *H. capsulatum* em seu interior (Aumento de 630X).....24

Figura 2- Distribuição das células imunomarcadas de Bak e nas lesões de HO e no grupo controle. * Mann-Whitney, $p = 0,0003$; ** Mann-Whitney, $p = 0,0510$25

Figura 3- Distribuição das células imunomarcadas de Bcl-2 e nas lesões de HO e no grupo controle. * Mann-Whitney, $p = <0,0001$26

Figura 4- Distribuição das células imunomarcadas de Bak e Bcl2 nas lesões de HP oral e no grupo controle. * Mann-Whitney, $p = 0,0434$27

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1: Especificação dos produtos utilizados para cada anticorpo primário.....21

Tabela 2- Expressão *in situ* das proteínas Bak e Bcl-2 da via intrínseca da Apoptose na Histoplasmose oral e no grupo controle.....23

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO/REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2 OBJETIVOS	18
3 METODOLOGIA.....	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO/REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Infecções fúngicas orais têm aflingido a humanidade por milênios. A Criptococose, Aspergillose, Mucormicose, Histoplasmose, Paracoccidioidomicose e a Candidíase tem se tornado presentes na prática odontológica do dia a dia. Uma maior compreensão do funcionamento do sistema imune em humanos revelou que a imunidade da mucosa da boca fornece uma resposta única aos patógenos fúngicos. Na última década, houve avanços significativos na análise qualitativa e quantitativa dos microbiomas orais, na quantificação simultânea de células imunes, citocinas, mecanismos de morte e sinalização celular de células microbianas com sinais de infecções fúngicas orais, com a finalidade de diagnosticar e prever a suscetibilidade à doença fúngica oral (CANNON, 2022).

No Brasil e em países da América do Sul e Central, parte significativa da população é acometida por Histoplasmose em sua forma disseminada (NEVILLE *et al.*, 2016).

A Histoplasmose (HP) é uma doença sistêmica descrita primeiramente por Samuel Darling em 1905, sendo causada pelo fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum* (*H. capsulatum*), causando variadas manifestações clínicas. Os fungos são esporos de forma micélica que viajam pelo ar; entretanto no organismo humano estes se encontram na fase de levedura (GOODWIN; DES PREZ, 1978; MILLER *et al.*, 1982; BOUTROS *et al.*, 1995; NEGRONI, 1999).

É uma doença prevalente em regiões das Américas do Norte, Central, Latina e África, sendo tipicamente encontrada em áreas rurais com temperatura tropical (MIGNOGNA *et al.*, 2001).

A doença é adquirida pela inalação de partículas de poeira do solo, contaminadas por fezes de pássaros e morcegos que contém esporos na forma infecciosa do fungo em áreas quentes, úmidas e em ambientes que contém alta concentração de ureia (SOUSA; MUNERATO, 2017).

O *H. capsulatum* entra no organismo predominantemente por via inalatória, onde a quantidade de inóculo e o estado imunológico do hospedeiro influenciam na apresentação e evolução da doença. Se o indivíduo for imunossuprimido ou a exposição tiver sido maciça, serão apresentadas formas de maior severidade, como descrito em pacientes com Linfoma, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana

(HIV), transplante de órgãos e tratamento imunossupressor (FLOR *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2002; TORRES RODRIGUEZ; SEGURA-ROCA; COOL, 2009).

A doença acomete primariamente os pulmões, no entanto, pode haver o envolvimento da pele e mucosa oral, se caracterizando como uma forma de Histoplasmose Disseminada (HD) (HERNANDEZ; MORGENSTERN; WEISS, 1986). Na América Latina, sítios primários para as lesões cutâneas são os braços, face e tronco (KLEIN *et al.*, 2016).

Na HD muitas lesões orais ocorrem, podendo afetar várias áreas da cavidade oral (VIDYANATH *et al.*, 2013) mas na forma isolada, são raras (YOUNG *et al.*, 1972). Lesões de HO estão presentes em 30% a 50% dos pacientes com HD (FERREIRA *et al.*, 2002). Estas podem ocorrer em quase toda parte da mucosa oral, com a língua, palato e mucosa jugal, sendo os locais mais comum (AKIN *et al.*, 2011). Como diagnóstico diferencial das lesões orais, devem ser incluídas doenças como a Paracoccidioidomicose e o Carcinoma de Células Escamosas (YOUNG *et al.*, 1972; FERREIRA *et al.*, 2002).

A HD é mais prevalente em homens (PUTOT *et al.*, 2015), bem como, em pacientes adultos, idosos ou imunocomprometidos, como os HIV+ (COBB *et al.*, 1989; RODRIGUEZ-CERDEIRA *et al.*, 2014). É uma infecção micótica oportunista potencialmente fatal entre os pacientes com HIV em áreas de alta prevalência da infecção, especialmente em indivíduos com uma contagem de linfócitos CD4 de menos de 150 céls/mL (KAUFFMANN, 2007; SOLARI *et al.*, 2007; SAROSI; JOHNSON, 1992).

A eficácia da resposta imune contra a infecção do *H. capsulatum*, requer uma orquestração de numerosos efetores celulares e moleculares solúveis (ALLENDORFER *et al.*, 1999). Numerosas citocinas que regulam a imunidade protetora, como a IL-12, IFN- γ e o GM-CSF, exercem grande influência na defesa do hospedeiro contra o fungo (DEEPE; GIBBONS; WOODWARD, 1999). Mas de todas as citocinas, o TNF- α é essencial para a sobrevivência dos hospedeiros em trabalhos experimentais já realizados em animais infectados pelo *H. capsulatum* (WOOD *et al.*, 2003).

Na HP o exame microscópico exhibe um infiltrado difuso de macrófagos ou, na maioria das vezes, acúmulos de macrófagos organizados em granulomas. As células gigantes multinucleadas normalmente são vistas junto com a inflamação granulomatosa. O microrganismo causador é difícil de ser identificado nos cortes de

rotina corados com hematoxilina e eosina; no entanto, corantes especiais, como os métodos PAS e metamina de prata de Grocott-Gomori, demonstram imediatamente as leveduras típicas medindo de 1 a 3 μm de *H. capsulatum* (NEVILLE *et al.*, 2016).

Em organismos pluricelulares, a apoptose é indispensável para o seu desenvolvimento e homeostase (QUARLERI; CEVALLOS; DELPINO, 2021).

As primeiras observações da morte celular programada (MCP) datam de 1842, quando Karl Vogt observou que durante a metamorfose do sapo, a notocorda é eliminada por morte celular. No entanto, a pesquisa sobre a morte celular programada começou em 1972, quando o termo apoptose começou a ser usado por John Keer e colaboradores. A apoptose foi diferenciada da necrose como uma forma definida de MCP com alterações morfológicas particulares (KERR; WYLE; CURRIE, 1972).

A apoptose ocorre em várias condições fisiológicas e patológicas. Como processo fisiológico, a apoptose é fundamental para a homeostase tecidual, incluindo a remodelação tecidual e a regulação das respostas imunológicas (SING; LETAI; SAROSIEK, 2019).

Ao longo dos últimos 30 anos, os mecanismos moleculares que regulam a apoptose têm sido amplamente investigados em vários organismos. Atualmente a apoptose consiste em dois subtipos principais, chamados apoptose extrínseca e intrínseca. Em ambas as vias, os principais reguladores são as caspases, a família Bcl2, a proteína P53, a família do fator de necrose tumoral (TNF) e inibidores de proteínas de apoptose (IAPs) (QUARLERI; CEVALLOS; DELPINO, 2021).

A apoptose é um padrão rigidamente controlado de morte celular, necessário para o crescimento e desenvolvimento de organismos multicelulares, possuindo características morfológicas próprias e coordenadas (WONG, 2011).

Durante a apoptose ocorre uma retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas celulares permanecem com a sua morfologia original, com exceção, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). No núcleo celular, a cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A membrana celular forma prolongamentos e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

A apoptose é caracterizada pela condensação irreversível da cromatina, fragmentação do DNA, alterações da membrana e formação de corpos apoptóticos. É

considerada uma morte celular não patológica, ou "necrose de encolhimento" (KERR, 1971). Envolve a desintegração sincronizada de células danificadas em fragmentos chamados corpos apoptóticos, sendo estes, uma pequena quantidade do conteúdo intracelular cercado por membrana, contendo os padrões moleculares associados a patógenos e a dano celular (DAMPs e PAMPs). Os receptores presentes nos macrófagos reconhecem as células apoptóticas e removem essas células danificadas para evitar uma resposta inflamatória (QUARLERI; CEVALLOS; DELPINO, 2021).

A via intrínseca da apoptose (também chamada mitocondrial ou Bcl2 regulada) requer ativação das Caspases citosólicas por meio da liberação do citocromo c mitocondrial e envolve a regulação da permeabilização da membrana mitocondrial externa por proteínas família Bcl-2. As proteínas Bcl-2 que promovem a morte celular, incluem aquelas com vários domínios de BH (Bax, Bak) ou uma única sequência BH3 (Bad, Bik, Bid, Puma, Bim, Bmf e Noxa) (MARTINOU; YOLE, 2011). Várias proteínas de Bcl-2 com domínio BH possuem ação anti-apoptóticas, estas incluem as proteínas Bcl-2, Bcl-xL e Bcl-w. Proteínas pró-apoptóticas como o Bax e o Bak, oligomerizam as mitocôndrias alterando a permeabilidade da membrana permitindo a liberação do citocromo c no citosol (PORTT *et al.*, 2011).

Durante a apoptose intrínseca, as mitocôndrias recebem danos suficientes para segregar proteínas que existem no espaço inter membranoso das mitocôndrias. Este caminho apoptótico é mediado por membros da família Bcl2 (QUARLERI; CEVALLOS; DELPINO, 2021).

A família Bcl2 regula de perto a permeabilização da membrana externa da mitocôndria. O processo envolve membros pró-apoptóticos, como o Bcl2x, Bax, Bak/Bak1, e membros anti-apoptóticos, como o Bcl2, BclxL e BclB (CZABOTAR *et al.*, 2014; SINGH; LETAI; SAROSIEK, 2019).

O Bcl-2 e Bcl-xL inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo c e são chamados de reguladores anti-apoptóticos. Por outro lado, Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas (HENGARTNER, 2000). A expressão de Bcl-2 é capaz de inibir a geração de espécies reativas do oxigênio e a acidificação intracelular, bem como estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria (VANDER HEIDEN; THOMPSON, 1999).

A apoptose mitocondrial é iniciada pela liberação de fatores pró-apoptóticos como a pró-caspase-9, o citocromo c, a *diablo IAP-binding mitochondrial protein* (DIABLO/Smac), bem como, a endonuclease G do espaço intermembranoso

mitocondrial, aumentado pela permeabilização da membrana externa mitocondrial, seguida pela ativação do iniciador caspase 9 (CASP-9) (TAIT; GRENN, 2010).

Em células saudáveis, a proteína X associada a Bcl2 ou Bax, está localizada no citosol e o seu antagonista a chamada Bak está localizada na membrana mitocondrial externa. Quando Bax e Bak são ativados, eles se unem dentro da membrana externa das mitocôndrias com aumento da permeabilização da membrana (CZABOTAR *et al.*, 2014)

Membros da família BCL2 anti-apoptóticos ou pró-sobrevivência celular, incluindo Bcl2, Bclw, Bclxl, controlam as atividades de Bax e Bak. Especificamente, os membros do Bcl2 evitam sua segmentação mitocondrial, a oligomerização e sua ativação por se unir ao Bax e Bak (UREN *et al.*, 2017).

A ativação de Bax e Bak é conhecida como um passo sem retorno, que inevitavelmente conduz à morte celular. Isso se deve, em parte, ao lançamento de citocromo c no citosol mediado por Bax e Bak. A presença de citocromo c é essencial para manter a cadeia respiratória mitocondrial e seu potencial de membrana para limpar espécies reativas de oxigênio. No citoplasma, o citocromo c ativa as vias de sinalização e as caspases (LI *et al.*, 2000; HAKEM *et al.*, 1998; ZOU *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 1996). Em seguida, a CASP-9 se ativa clivando a CASP-3, -6, e -7 entre outras, induzindo a ação de DNAses, inativando proteínas envolvidas na reparação do DNA (KUIDA *et al.*, 1998; YU *et al.*, 2002).

O desencadeamento ou a prevenção da apoptose pode ser um passo crítico no desenvolvimento de processos infecciosos (STRASSER; CORY; ADAMS, 2011). Esta tem sido observada como uma resposta a uma variedade de infecções e pode ser mediada por variedade de determinantes de virulência codificados pelos patógenos, o que favorece a eliminação de células do sistema imune ou evasão da resposta de defesa do hospedeiro, que tentam agir para eliminar a infecção (WEINRAUCH; ZYCHLINSKY, 1999).

Um grande número de patógenos podem desregular a apoptose, buscando uma ativação da morte celular programada alternativa, criando um mecanismo de “backup” que permite que células alteradas alertem as células do sistema imune para a presença de um patógeno no organismo (JORGENSEN; RAYAMAJHI; MIAO, 2017).

Mecanismos de morte celular são usados por organismos multicelulares para sacrificar células infectadas por microrganismos em benefício das células

circundantes, onde a morte celular programada, como a apoptose, é produzida como uma resposta imune inata do hospedeiro (ZITVOGEL; KEPP; KROEMER, 2010).

Por outro lado, a morte celular também pode ser vantajosa aos microrganismos patogênicos. Alguns patógenos são capazes de inibir a morte celular para sobreviver e multiplicar dentro da célula hospedeira; e outros induzem a morte celular como um mecanismo por escapar de uma célula e infectar uma célula adjacente (BEHAR; DIVANGAHI; REMOLD, 2010; LAMKANFI; DIXIT, 2010).

Em uma doença infecciosa, a apoptose extrínseca pode ser ativada pelos PAMPs e ligantes de morte secretados pelos microrganismos. Além disso, infecções também ativam a apoptose intrínseca devido a danos ao DNA, alteração na sinalização de cálcio e estresse metabólico das células infectadas (QUARLERI; CEVALLOS; DELPINO, 2021).

Em algumas circunstâncias patógenos que conseguem inibir a apoptose, podem ter como alvo, as mitocôndrias de células imunes ou epiteliais que atuam como barreira para a prevenção da infecção, induzindo a apoptose intrínseca e eliminando estas células ou paralisando suas funções. Uma vez que a apoptose geralmente não provoca respostas inflamatórias, este pode ser o caminho preferido por alguns patógenos, em vez de outras formas de morte celular programada em benefício de sua sobrevivência (BIELASZEWSKA *et al.*, 2017).

O uso da apoptose por microrganismos em benefício de sua sobrevivência, sugere uma co-evolução entre os agentes infecciosos e o sistema imune. No qual os patógenos destroem mecanismos de defesa induzindo a morte de células imunes por apoptose, enquanto o sistema imunológico tenta desenvolver mecanismos para reconhecer células danificadas pela infecção e alertar outras células para a presença de agentes infecciosos (QUARLERI; CEVALLOS; DELPINO, 2021).

A entrada de um fungo nas células hospedeiras é iniciada quando estes obtenham acesso à superfície da célula, que então gera sinais para induzir sua internalização. Este processo é regulado geneticamente e bioquimicamente por meio da apoptose, estando este processo associado com a patogênese de várias doenças (THOMPSON, 1995).

A capacidade dos agentes patogênicos, como o *H. capsulatum* e outros fungos de induzir apoptose em fagócitos pode ser um fator importante na virulência, reduzindo os mecanismos de defesa do hospedeiro, e usando a apoptose do fagócito

em proveito próprio, o que permitiria sua sobrevivência intracelular em células epiteliais (DEL VECCHIO *et al.*, 2009; ASHIDA *et al.*, 2011).

O *H. capsulatum* induz a apoptose quando estes invadem as células epiteliais ou fagócitos, buscando aumentar suas vantagens quanto a sua sobrevivência intracelular (CACERE *et al.*, 2002; SOUTO *et al.*, 2003; MENDES-GIANNINI *et al.*, 2004; VERÍCIMO *et al.*, 2006; KETELUT-CARNEIRO *et al.*, 2015). Tais fatos, ainda não foram estudados nas lesões orais de pacientes acometidos pela micose induzida por estes fungos.

Em pacientes com sepse de origem bacteriana e fúngica, os linfócitos apresentam taxas de apoptose aumentada, mas também ambas CASP -8 e -9 estão aumentadas quanto a sua expressão, enquanto os níveis de Bcl-2 mostram-se reduzidos (HOTCHKISS *et al.*, 2005).

A apoptose parece exercer um importante papel dentre os muitos elementos imunológicos que modulam o curso da infecção pelo *H. capsulatum*, onde a inibição da apoptose pode influenciar o resultado da infecção com patógenos intracelulares e extracelulares e/ou modular a resposta inflamatória (GAVRILESCU; DENKERS, 2003; CARRERO; CALDERON; UNANUE, 2004).

Em 2005, Allen e Deepe Jr, demonstraram que a apoptose é uma característica proeminente em leucócitos pulmonares de camundongos infectados pelo *H. capsulatum* e que células T constituem a maioria das células apoptóticas. Este estudo, comprovou que a magnitude da apoptose foi regulada não apenas pela TNF- α mas também pela interação Fas-FasL, e a inibição das Caspases envolvidas foi associada a uma resposta imune adaptativa prejudicada, modulando assim a gravidade da HP.

Proteínas pró-apoptóticas da família Bcl2 são necessários para a cinética normal e extensão da morte de células hospedeiras como os macrófagos, durante a infecção por *H. capsulatum*. Isso decorre da secreção de proteína Cbp1 dependente da união ao cálcio celular e da ativação de Caspases mediadas por Bax e Bak (ISSAC *et al.*, 2015). A manipulação das vias de morte celular dos macrófagos, podem induzir a morte desses fagócitos, sendo este mecanismo usado pelo fungo, para aumentar a virulência em infecções pelo *H. capsulatum* (DEEPE Jr; BUESING, 2012).

Durante uma infecção, a modulação da apoptose permite que patógenos se reproduzam e sobrevivam no hospedeiro. No entanto, a morte celular programada ocorre em uma variedade de caminhos que produzem diferentes variações morfológicas e respostas imunológicas; e a apoptose é apenas uma delas. Apesar da

diversidade de padrões de morte celular, a relação evolutiva entre as vias distintas de uma célula em apoptose permanece em grande parte desconhecidos. Mais pesquisas sobre apoptose e sua interrelação com outras modalidades de morte celular são necessárias para determinar a interação entre as diferentes vias de sinalização, a definição o ponto principal de não retorno da apoptose e seu papel como morte excessiva ou deficiente em doenças infecciosas humanas. O esclarecimento dos mecanismos, receptores e fatores microbianos envolvidos na apoptose poderá revelar novos “insights” sobre o relação hospedeiro-patógeno e novos potenciais alvos terapêuticos. Espera-se que o presente trabalho possa contribuir de forma significativa no muito que ainda precisa ser estudado sobre a apoptose em infecciosas fúngicas orais.

2 OBJETIVOS

Geral:

Avaliar em biópsias de lesões orais de Histoplasmose a imunexpressão de proteínas das vias intrínseca e extrínseca da apoptose.

Específicos:

- Avaliar *in situ* a imunexpressão de proteínas da via intrínseca da apoptose (Bcl-2, Bak).
- Quantificar e comparar a imunexpressão das proteínas da via intrínseca da apoptose em lesões de HO e na mucosa oral com características de normalidade.

3 METODOLOGIA

Amostra:

Após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Uberaba (CEP-UNIUBE) (CAAE : 13675019.7.0000.5145) foram coletados os dados referentes a 16 pacientes com resultados de exame anatomopatológico com diagnóstico de HO e de 14 fragmentos de mucosa oral com características de normalidade (FMOCN) do Serviço de Anatomia Patológica do Curso de Odontologia da Universidade de Uberaba (SAPCOU), e do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Rawson da Província de Córdoba (SAPHR) e da Cátedra de Anatomia Patológica A da Faculdade de Odontologia da Universidade Nacional de Córdoba – Argentina (CAPFOUNC), no período de 1995 a 2019.

Para cada caso de HO e de FMOCN diagnosticado no SAPCOU, SAPHR e na CAPFOUNC, foram fornecidas as seguintes informações: número do prontuário, número do laboratório, idade, gênero, cor de pele, tipo de biópsia, localização e diagnóstico histopatológico, sendo que, os dados foram fornecidos, por meio de uma planilha eletrônica montada no *Software Excel®*.

De posse dos números dos prontuários dos casos de HO e de FMOCN diagnosticados no SAPCOU, SAPHR e na CAPFOUNC, os prontuários foram levantados para que fossem obtidas informações que permitissem o contato para com estes pacientes, a fim de que, estes assinassem o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) autorizando a utilização no presente projeto, do material de biópsia estocado em blocos de parafina. Após a assinatura do TCLE pelos 34 pacientes que compuseram a amostra, autorizando a utilização do material de biópsia estocado em parafina, os blocos foram então encaminhados para a realização das colorações histoquímicas.

A técnica de imunohistoquímica foi realizada nas dependências da Universidade de Uberaba, no Serviço de Anatomia Patológica do Curso de Odontologia e no Laboratório de Pesquisa em Biologia Celular e Molecular localizados no Campus Aeroporto da Universidade de Uberaba, sala 2D 31 e 52.

Os blocos de parafina selecionados foram cortados em micrótomo com cortes seriados de 5µm de espessura. Nas lâminas foram realizadas a coloração de Hematoxilina e Eosina (HE).

Imuno-histoquímica:

A técnica de imuno-histoquímica indireta foi realizada nas dependências da Universidade de Uberaba, no Serviço de Anatomia Patológica do Curso de Odontologia e no Laboratório de Pesquisa em Biologia Celular e Molecular localizados no Campus Aeroporto da Universidade de Uberaba, sala 2D 31 e 52. Inicialmente houve a preparação das lâminas que receberiam os cortes histológicos, as quais foram mergulhadas em solução de gelatina (15 g de gelatina, 1,5g de sulfato de cromo potássio e 3 litros de água destilada), por duas horas. A partir dos blocos de parafina foram obtidos cortes histológicos de 3 µm de espessura, sendo estes estendidos sobre uma lâmina previamente gelatinizadas e incubados em estufa a 37°C durante 24 horas.

As lâminas foram desparafinizadas em quatro banhos de xilol cada um por 10 minutos, em seguida passadas por dois banhos de álcool absoluto, um banho de álcool 95%, um banho de álcool 70% com tempo de 5 minutos cada banho, e depois mergulhadas por 5 minutos em água ultra pura para tirar o excesso do álcool.

Para recuperação dos antígenos, as lâminas foram colocadas em Banho Maria a 90°C em ácido cítrico 0.01 molar pH=6,0 onde permaneceram por 30 minutos, após esse tempo as lâminas foram retiradas e permaneceram por 10 minutos ainda dentro da solução de ácido cítrico. Após o resfriamento, para o bloqueio de ligações inespecíficas, as lâminas foram secas uma a uma e então acrescentados 100µl de PBS/BSA 2% em cada corte durante 30 minutos.

Após secar as lâminas uma a uma, o anticorpo primário foi diluído em PBS/BSA 2% de acordo com as especificações de cada anticorpo e colocado nas lâminas onde permaneceram em câmara úmida por 2 horas. Em seguida as lâminas foram lavadas durante 5 minutos por 4 vezes com PBS e Tween 20, a 0,05%. Após a lavagem, as lâminas foram imersas na solução de água oxigenada 30% e metanol por 10 minutos e lavadas novamente durante 5 minutos por 4 vezes com PBS e Tween 20, a 0,05%.

Em seguida as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS e Tween 20, a 0,05% durante 5 min cada para retirada do excesso do anticorpo primário, e incubadas com anticorpo secundário conjugado a biotina (REVEAL® – SRPINGBIO = Pleasanton, CA, USA) durante 30 minutos. Posteriormente, foi retirado o excesso do anticorpo secundário com lavagem em PBS e colocado um complexo de streptoavidina-biotina que foi incubado por mais 30 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas com tampão PBS e Tween 20, a 0,05%, e secas onde foi

acrescentada a solução reveladora, contendo 1 ml de tampão Tris-HCl (pH 7,2), 1 comprimido de diaminobenzidina (DAB)(Sigma, St Louis, MO-USA) e 25µl de água oxigenada. A reação foi interrompida lavando-se em água corrente.

Posteriormente foi realizada a coloração de fundo com hematoxilina e a montagem das lâminas com Entelan®, e em seguida a análise morfométrica das células positivas foi realizada. A coloração de fundo com hematoxilina e a montagem das lâminas com Entelan® foi realizada, seguida da análise morfométrica das células positivas.

Tabela 1- Especificação dos produtos utilizados para cada anticorpo primário

Anticorpo	Fabricante	Código
Anticorpo anti-Bak humano	ST JOHN'S LAB****	STJ112652
Anticorpo anti-Bcl-2 humano	BIORBYT***	ORB418681

BIORBYT*** = San Francisco, CA, USA; ST JOHN'S LAB**** = University Way , London, UK.

Identificação e estudo morfométrico da imunomarcção:

Na avaliação morfométrica das lâminas de imunohistoquímica, o número de células marcadas com positividade foi realizado de forma semi-quantitativa, conforme descrito por Fregnani e colaboradores em 2009; Kellermann e colaboradores em 2008 e por Henriques e colaboradores em 2011. Esta ocorreu a partir das imagens dos cortes histológicos capturadas por um sistema digital com aumento de 400X.

Cada campo quantificado foi capturado por meio de uma câmera acoplada ao microscópio de luz e computador para digitalização da imagem. Para auxiliar na contagem e análise das células imuno marcadas as imagens obtidas dos cortes foram analisadas como auxílio - do software "Image J" (National Institutes of Health, USA). Foi analisada a presença de células imunomarcadas no tecido epitelial e conjuntivo de cada corte capturado. Esta foi classificada como negativa (0), escassa ou < 50% de células imunomarcadas e abundante ou > 50% de células imunomarcadas.

Análise estatística:

A análise estatística foi realizada por meio do programa GraphPad Prisma 7.0. A análise de normalidade e variância foram feitas pelos testes de Mann-Whitney, onde resultados foram considerados estatisticamente significativos quando a probabilidade foi menor que 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 16 casos de HO selecionados para este trabalho, 14(87,5%) eram do sexo masculino, todos (100%) de etnia branca, com idade variando de 24 a 59 anos, onde as localizações preferenciais das lesões foram: língua (43,75%), o palato duro (37,5%), mucosa jugal (6,25%), palato mole (6,25%) e gengiva (6,25%).

Para os casos controles que tiveram diagnóstico histopatológico de mucosa oral com características de normalidade (14 casos), 57,14% eram pacientes do sexo masculino, 100% possuíam etnia branca, com idade mais prevalente variando entre 18 a 73 anos, onde as localizações preferenciais das lesões foram: língua, lábio inferior e mucosa jugal representaram individualmente 21,4% cada, palato duro e região retromolar (7,14%) e gengiva (14,28%).

Na análise dos resultados do estudo morfométrico, o teste não-paramétrico de Mann-Withney demonstrou haver diferença significativa na imunoposição de Bak e Bcl-2 em relação ao grupo controle. Os valores de *p* das proteínas testadas e a quantificação das células imunomarcadas que variou de escassa a intensa podem ser apreciados na Tabela 2.

Proteínas	n (%)			P value *
	HO	Controle	Total	
Bak				<0,0510
0%	0 (0%)	12 (85,72%)	12 (85,72%)	
1% - 50%	5 (31,25%)	2 (14,28%)	7 (23,33%)	
> 50%	11 (68,75%)	0 (0%)	11 (36,66%)	
Bcl-2				<0,0001*
0%	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
1% - 50%	0 (0%)	13 (92,85%)	13 (43,33%)	
> 50%	16 (100%)	1 (7,15%)	17 (56,66%)	

*Os valores foram significativos quando a probabilidade foi menor de 5% ($p < 0,05$). HO: Histoplasose oral. P value: valor de *p*.

Tabela 2- Expressão *in situ* das proteínas Bak e Bcl-2 da via intrínseca da Apoptose na Histoplasose oral e no grupo controle.

Nas células do grupo controle, a imunomarcagem para Bak foi moderada no citoplasma de células epiteliais e escassa nas células endoteliais e fibroblásticas (Figura 1A). Já as células coradas por Bcl-2, a imunomarcagem foi intensa tanto no citoplasma de células epiteliais, como nas células endoteliais e fibroblásticas das células da mucosa oral (Figura 1B).

No grupo de pacientes com HO, as células exibiram a expressão da proteína Bak e Bcl-2 de forma intensa no citoplasma de células mononucleares e de forma exuberante no citoplasma de macrófagos que continham o *H. Capsulatum* no seu interior (Figura 1C e 1D).

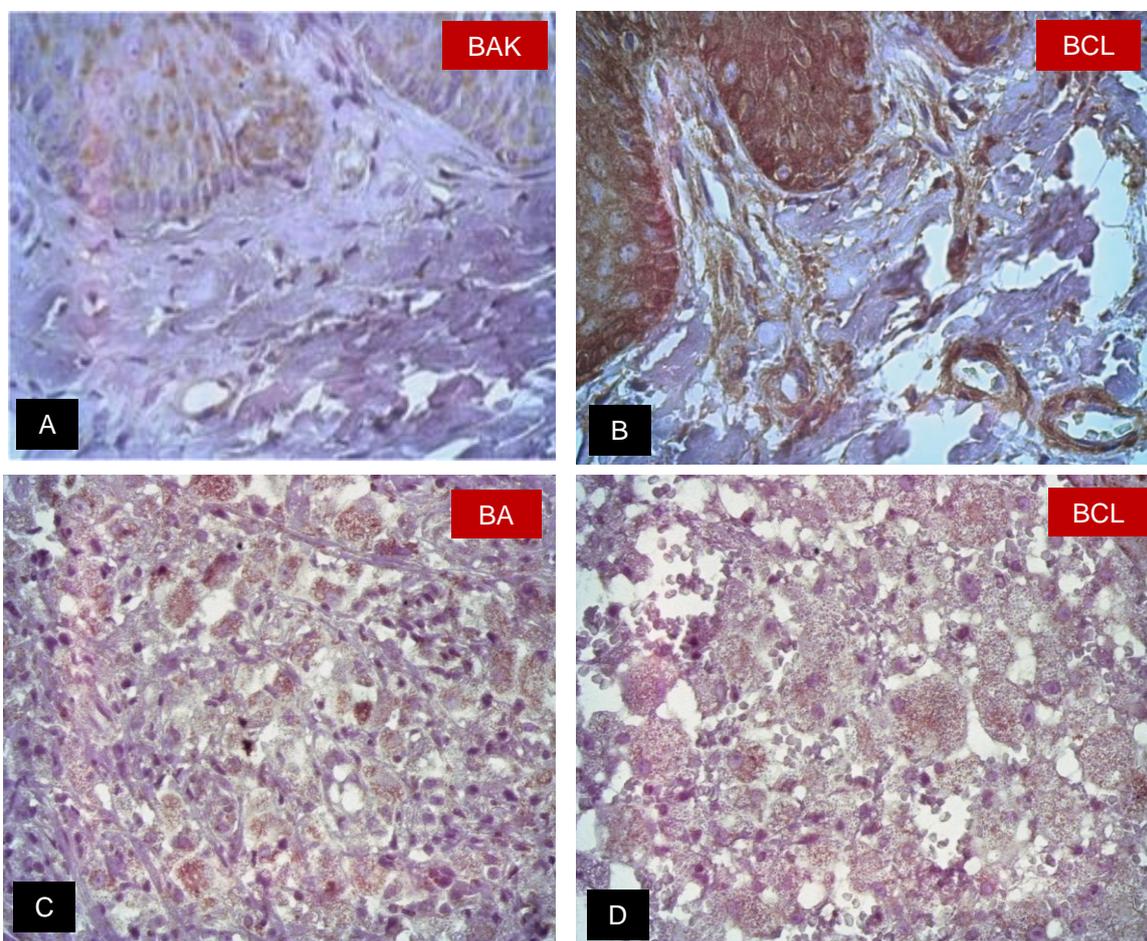


Figura 1. Imunomarcagem para Bak e Bcl-2 em biópsias de pacientes com mucosa oral normal (A e B) e HO(C e D). (A) Expressão de Bak foi moderada no citoplasma de células epiteliais e escassa nas células endoteliais e fibroblásticas. (B) Expressão de Bcl-2 foi intensa tanto no citoplasma de células epiteliais, como nas células endoteliais e fibroblásticas. (C e D) A expressão de Bak e Bcl-2 foi intensa no citoplasma da células do infiltrado inflamatório, principalmente no interior de macrófagos com o *H. capsulatum* em seu interior (Aumento de 630X).

O aumento na expressão das proteínas BAK e Bcl-2, quando comparado a mucosa oral com características de normalidade (grupo controle) e demonstrado nos gráficos das figuras 2 e 3, pode ser interpretado como uma forma encontrada pelo *H. capsulatum* de modular a apoptose pela maior expressão de moléculas apoptóticas da via intrínseca, influenciando na indução da apoptose pelo fungo, que pode sobreviver e se espalhar para outras partes do corpo conforme apresentado em trabalhos experimentais desenvolvidos por Del Vecchio e colaboradores em 2009.

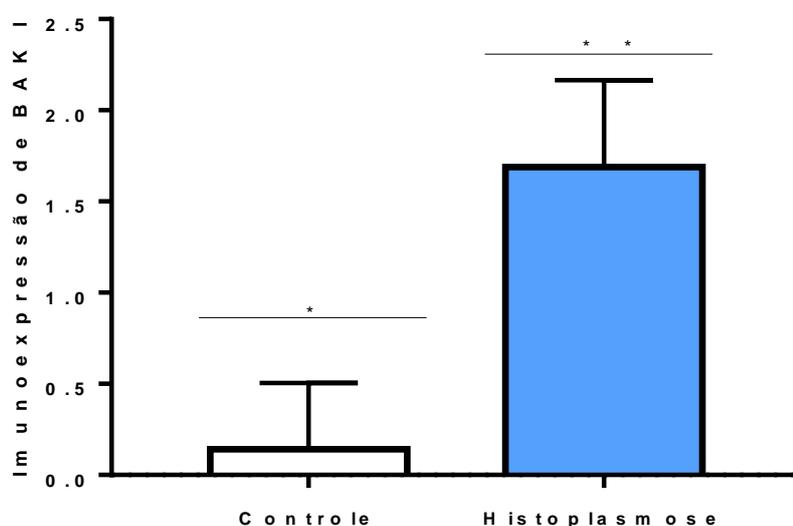


Figura 2- Distribuição das células imunomarcadas de Bak e nas lesões de HO e no grupo controle.
 * Mann-Whitney, $p = 0,0003$; ** Mann-Whitney, $p = 0,0510$.

O aumento na expressão de BCL2 quando comparado com o grupo controle encontrado neste trabalho que pode ser apreciado no gráfico da Figura 3, está em consonância com resultados encontrados por Gamradt e colaboradores em 2016, onde camundongos expressaram de forma excessiva a proteína BCL2, e a apoptose promoveu a inibição da resposta imune durante infecções.

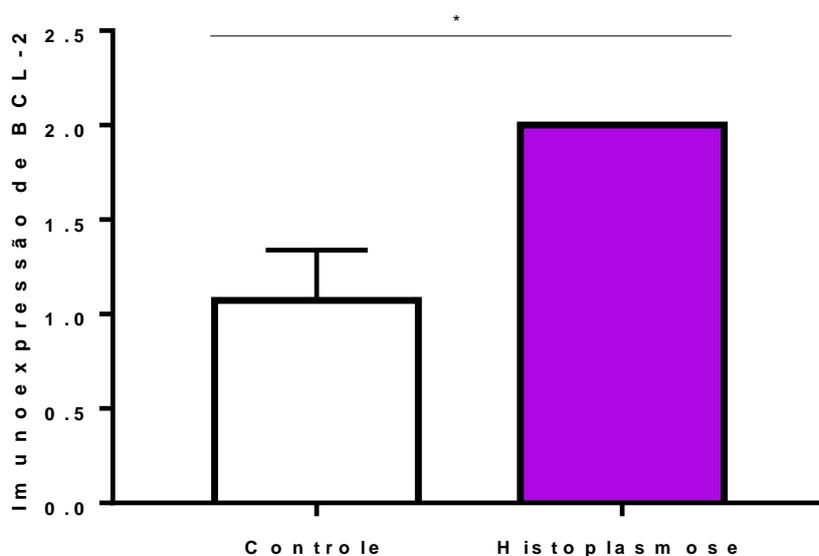


Figura 3- Distribuição das células imunomarcadas de Bcl-2 e nas lesões de HO e no grupo controle. * Mann-Whitney, $p = <0,0001$.

As diferenças encontradas na expressão das proteínas da via intrínseca da apoptose obtidas neste trabalho podem ser visualizadas no gráfico da Figura 4. O gráfico e os resultados estatísticos demonstram nítido aumento da proteína Bak e Bcl-2. Este resultado pode corroborar com afirmativa postulada por Cacere e colaboradores em 2009, onde o *H. capsulatum* pode buscar obter vantagens quanto a sua sobrevivência intracelular, e então modular a expressão de moléculas anti e pró-apoptóticas (Bcl-2 e Bak respectivamente) induzindo a apoptose, facilitando sua sobrevivência.

Os resultados apresentados na tabela 1 e nas figuras 1,2,3 e 4 demonstram haver uma alteração da homeostasia do microambiente nas lesões de HP oral em relação a quantidade de proteínas intrínsecas anti-apoptótica (Bcl-2) e pró-apoptótica (Bak), expressas pelas células inflamatórias envolvidas com a micose.

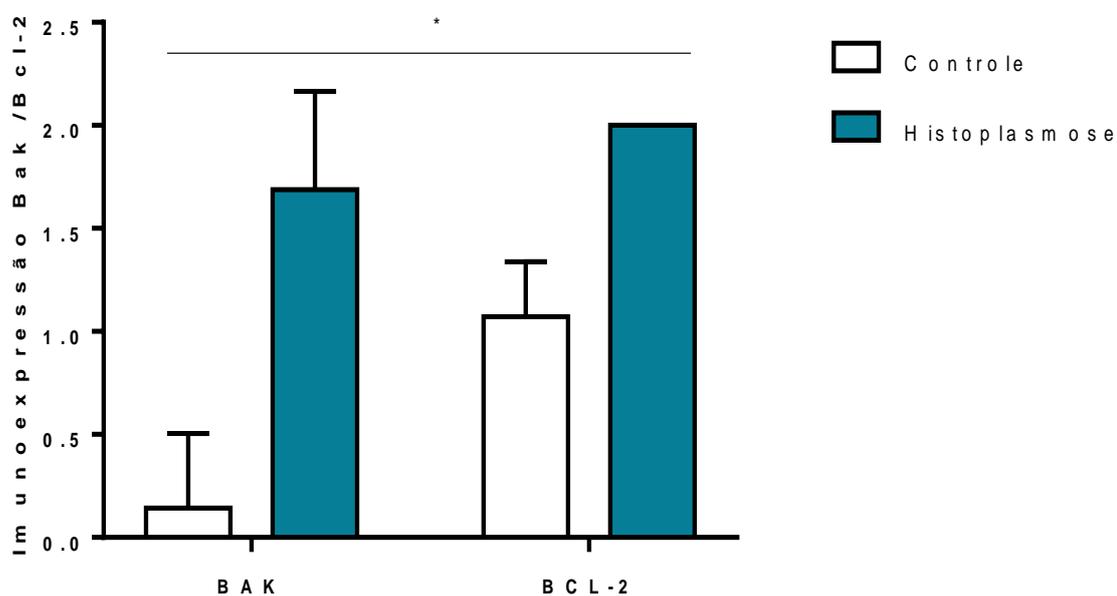


Figura 4- Distribuição das células imunomarcadas de Bak e Bcl2 nas lesões de HP oral e no grupo controle. * Mann-Whitney, $p = 0,0434$.

As alterações encontradas neste trabalho, demonstrando mudanças na expressão das proteínas Bak e Bcl-2, corrobora para a hipótese de haver estímulos na cinética da via intrínseca da apoptose, que podem estar exercendo influência na implantação e manutenção do fungo no tecido do hospedeiro, conforme demonstrado por Behar; Divangahi; Remold (2010); Lamkanfi e Dixit (2010) e Quarleri; Cevallos; Delpino (2021).

5 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

As alterações encontradas neste trabalho, corrobora para a hipótese de haver estímulos na cinética da via intrínseca da apoptose, que podem estar exercendo grande influência na implantação do *H. capsulatum* no tecido do hospedeiro, esse mecanismo utilizado pelo fungo para escapar da ação do sistema imune, pode contribuir para a evolução e agravamento da doença na cavidade oral, pois houve um desequilíbrio na expressão de proteína anti e pró-apoptóticas (Bcl-2 e Bak respectivamente) na amostra de HO quando comparadas ao grupo controle.

Há necessidade de concluirmos os estudos sobre as demais proteínas anti e pró-apoptóticas expressas pelas células inflamatórias envolvidas na resposta imune contra o fungo, previstas para o segundo ano deste trabalho, para que estas hipóteses possam ser confirmadas.

REFERÊNCIAS¹

- AKIN, L. et al. Oral Presentation of Disseminated Histoplasmosis: A Case Report and Literature Review. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 69, p. 535-54. 2011.
- ALLEN, H.L.; DEEPE JR, G.S. Apoptosis modulates protective immunity to the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. **J Clin Invest**, v.115, n.10, p.2875-85. 2005.
- ALLENDORFER, R. et al. Complex requirements for nascent and memory immunity in pulmonary histoplasmosis. **J Immunol**. v.162, p.7389–7396. 1999.
- ASHIDA, H. et al. Cell death and infection: a double-edged sword for host and pathogen survival. **J Cell Biol**, v.195, p. 931–942. 2011.
- BEHAR, S. M; DIVANGAHI, M; REMOLD, H. G. Evasion of innate immunity by Mycobacterium tuberculosis: Is death an exit strategy? **Nature Reviews. Microbiology**, v. 8, n.9, p.668–674. 2010.
- BIELASZEWSKA, M. et al. Host cell interactions of outer membrane vesicle-associated virulence factors of enterohemorrhagic Escherichia coli O157: Intracellular delivery, trafficking and mechanisms of cell injury. **PLoS Pathogens**, v.13, n.2, p.2-51. 2017.
- BOUTROS, H.H. et al. Oral histoplasmosis masquerading as an invasive carcinoma. **J Oral Maxillofac Surg**, v.53, p.1110–1114. 1995.
- CACERE, C. R. et al. The role of apoptosis in the antigen-specific T cell hyporesponsiveness of paracoccidioidomycosis patients. **Clin Immunol**, v. 105, p.215–222. 2002.
- CANNON, R. D. Oral Fungal Infections: Past, Present, and Future. **Front Oral Health** v.3. 2022.
- CARRERO, J.A.; CALDERON, B.; UNANUE, E.R. Type I interferon sensitizes lymphocytes to apoptosis and reduces resistance to listeria infection. **J Exp Med**, v.200, p.535–540. 2004.
- COBB, C.M. et al. Chronic pulmonary histoplasmosis with an oral lesion. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 67, p. 737-6. 1989.
- CZABOTAR, P. E. et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v.15, n.1, p. 49–63. 2014.

¹De acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Disponível em: https://www.uniube.br/biblioteca/novo/arquivos/2019/manual_normatizacao2019.pdf.

- DEEPE JR, G.S.; BUESING, W.R. Deciphering the Pathways of death of *Histoplasma capsulatum* – infected Macrophages: Implications for the immunopathogenesis of early infection. **J Immunol**, v.188, n.1, p.334-344. 2012.
- DEEPE JR, G.S.; GIBBONS, R.; WOODWARD, E. Neutralization of endogenous granulocytemacrophage colony-stimulating factor subverts the protective immune response to *Histoplasma capsulatum*. **J Immunol**, v. 163, p.4985–4993.1999.
- DEL VECCHIO, A. et al. Induction of apoptoses in A549 pulmonary cells by two *Paracoccidioides brasiliensis* samples. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 749–754. 2009.
- FERREIRA, O.G. et al. Oral histoplasmosis in Brazil. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.93, p. 654-658. 2002.
- FLOR, A. et al. Histoplasmosis pulmonar aguda en un viajero español a Nicaragua: ejemplo de enfermedad importada. **Rev Iberoam Micol**, v.20, p. 24-28. 2003.
- FREGNANI, E.R. et al. Presence of myofibroblasts and expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in ameloblastoma correlate with rupture of the osseous cortical. **Pathol Oncol Res**, v. 15, p. 231-40. 2009.
- GAVRILESCU, L.C.; DENKERS, E.Y. Apoptosis and the balance of homeostatic and pathologic responses to protozoan infection. **Infect Immun**, v. 71, p.6109–6115. 2003.
- GOMES, F.O. et al. Oral histoplasmosis in Brazil. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 93, p. 654-9.2002.
- GOODWIN, R.A.; DES PREZ, R.M. Histoplasmosis. State of the art. **American Review of Respiratory Disease**, v.117, p. 929–56.1978.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte Celular por Apoptose. **Rev Bras Cancerol**, v.53, n.3, p.335-343. 2007.
- HAKEM, R. et al. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. **Cell**, v.94 n.3, p.352. 1998.
- HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p.770-76. 2000.
- HENRIQUES, A.C.G. et al. Comparative analysis of the immunohistochemical expression of collagen IV, MMP-9, and TIMP-2 in odontogenic cysts and tumors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 112, p. 468-475. 2011.
- HERNANDEZ, D.E.; MORGENSTERN, J.; WEISS, E. Cutaneous lesions of disseminated histoplasmosis in a Haitian man with the acquired immunodeficiency syndrome. **Int J Dermatol**, v. 25, p.117-8. 1986.
- HOTCHKISS, R. S. et al. Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways. **J Immunol**, v. 174, p.5110– 5118. 2005.

- ISAAC, D. T. et al. Macrophage cell death and transcriptional response are actively triggered by the fungal virulence factor Cbp1 during *H. capsulatum* infection. **Molecular Microbiology**, v.98 n.5, p.910–929. 2015.
- JORGENSEN, I; RAYAMAJHI, M; MIAO, E. A. Programmed cell death as a defence against infection. **Nature Reviews Immunology**, v.17 n.3, p.151–164. 2017.
- KAUFFMAN, C.A. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. **Clin Microbiol Rev**, v.20, n .1, p.115–32. 2007.
- KELLERMANN, M. G. et al. Mutual paracrine effects of oral squamous cell carcinoma cells and normal oral fibroblasts: Induction of fibroblast to myofibroblast transdifferentiation and modulation of tumor cell proliferation. **Oral Oncology**, v. 44, p. 509–517. 2008.
- KERR, J. F. Shrinkage necrosis: A distinct mode of cellular death. **The Journal of Pathology**, v.105 n.1, p.13–20. 1971.
- KERR, J. F; WYLLIE, A. H; CURRIE, A. R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v.26 n.4, p.239–257. 1972.
- KETELUT-CARNEIRO, N. et al. IL-18 triggered by the Nlrp3 inflammasome induces host innate resistance in a pulmonary model of fungal infection. **J Immunol**, v.194, p. 4507–4517. 2015.
- KLEIN, I.P. Et al. Diagnosis of HIV infection on the basis of histoplasmosis-related oral ulceration. **Spec Care Dentist**, v. 36, n.2, p. 99-103.2016.
- KUIDA, K. et al. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. **Cell**, v.94 n.3 p.325–337.1998.
- LAMKANFI, M; DIXIT, V. M. Manipulation of host cell death pathways during microbial infections. **Cell Host & Microbe**, v.8 n.1, p.44–54. 2010.
- LI, K. et al. Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apo- ptosis. **Cell**, v.101 n.4, p.389–399. 2000.
- LIU, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c. **Cell**, v.86 n.1, p.147–157. 1996.
- MARTINO, J.C.; YOULE, R.J. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. **Dev Cell**, v.21, n.1, p.92–101. 2011.
- MENDES-GIANNINI, M. J. et al. Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. **Microbes Infect**, v.6, p.882–891. 2004.
- MIGNOGNA, M.D. et al. A case of oral localized histoplasmosis in an immunocompetent patient. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 20, p.753-5. 2001.

MILLER, R.L. et al. Localized oral histoplasmosis: a regional manifestation of mild chronic disseminated histoplasmosis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 53, p.367–74. 1982.

NEGRONI, M. **Microbiología Estomatológica Fundamentos y guías prácticas. Médica Panamericana**, Buenos Aires, p.373. 1999

NEVILLE, B. W. et al. **Patología Oral & Maxilofacial**. Rio de Janeiro (RJ): Elsevier, p.972. 2016.

PORTT L. et al. Anti-apoptosis and cell survival: a review. **Biochim Biophys Acta**, v.1813, n.1, p. 238–59. 2011.

PUTOT, A. et al. HIV-associated disseminated histoplasmosis in western French Guiana, 2002–2012. **Mycoses**, v.58, p.160-6. 2015.

QUARLERI, J.; CEVALLOS, C.; DELPINO, M.V. Apoptosis in infectious diseases as a mechanism of immune evasion and survival. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 125, p. 1- 24. 2021.

RODRÍGUEZ-CERDEIRA, C. et al. Systemic fungal infections in patients with human immunodeficiency virus. **Actas Dermosifiliog**, v.105, p.5-17. 2014.

SAROSI, G.A.; JOHNSON, P. Disseminated histoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus. **Clin Infect Dis**, v.14(Suppl 1), p.60–67.1992.

SING R; LETAI, A; SAROSIEK, K. Regulation of apoptosis in health and disease: The balancing act of BCL-2 family proteins. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v.20 n.3, p.175–193. 2019.

SOLARI, R. et al. Disseminated histoplasmosis with lesions restricted to the larynx in a patient with AIDS Report of a case and review of the literature. **Rev Iberoam Med**, v. 24, p.164–66. 2007.

SOUTO, P. C. et al. Programmed cell death in thymus during experimental paracoccidioidomycosis. **Med Microbiol Immunol**, v. 192, p. 225–229. 2003.

SOUZA, B.C.; MUNERATO, M.C. Oral manifestation of histoplasmosis on the palate **An Bras Dermatol**, v.92, n.5 (Suppl 1), p.107-9. 2017.

STRASSER, A.; CORY, S.; ADAMS, J. M. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of câncer and other diseases. **EMBO J**, v. 30, p. 3667–3683. 2011.

TAIT, S. W; GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v.11 n.9, p.621–632. 2010.

THOMPSON, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, v. 267, p. 1456-1462. 1995.

- TORRES RODRIGUEZ, J.M.; SEGURA-ROCA, G.; COLL, J. Histoplasmosis en un varón inmunocompetente manifestada 45 años después de la infección. **Rev Iberoam Micol**, v. 26, n.4, p.244-246. 2009.
- UREN, R. T. et al. Disordered clusters of Bak dimers rupture mitochondria during apoptosis. **eLife**, v.6, p.1–23. 2017.
- VANDER HEIDEN, M.G.V.; THOMPSON, C.B. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? **Nat Cell Biol**, v.1: p.209-16. 1999.
- VERÍCIMO, M.A. et al. Increased apoptosis during the early phase of experimental paracoccidioidomycosis as a phenotypic marker of resistance. **Microbes Infect**, v. 8, p. 2811–2820. 2006.
- VIDYANATH, S. et al. Disseminated Histoplasmosis with oral and cutaneous manifestations. **J Oral Maxillofac Pathol**, v.17, p.139-42. 2013.
- WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. The induction of apoptosis by bacterial pathogens. **Annu Rev Microbiol**, v. 53, p.155–187. 1999.
- WONG, R.S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 30, p.87- 92. 2011.
- WOOD, K.L. et al. Histoplasmosis after treatment with anti-tumor necrosis factor- α therapy. **Am J Respir Crit Care Med**, v.167 p.1279–1282. 2003.
- YOUNG, L, L. et al. Oral manifestations of of histoplasmosis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 33, p.191-194. 1972.
- YU, S. W. et al. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. **Science**, v.297 n.5579, p.259–263. 2002.
- ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiol Sci**, v. 19, p. 124-28. 2004.
- ZITVOGEL, L; KEPP, O; KROEMER, G. Decoding cell death signals in inflammation and immunity. **Cell**, v.140 n.6, p.798–804. 2010.
- ZOU, H. -1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. **Cell**, v.90 n.3, p.405–413. 1997.