UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Análise da capacidade migratória de células dendríticas na
cromoblastomicose experimental

Telma Fátima Emidio Kimura

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

São Paulo
2012

Telma Fátima Emidio Kimura

Análise da capacidade migratória de células dendríticas na
cromoblastomicose experimental

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida
Orientador

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, Julho de 2012.

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois sem Ele eu nada seria. Em seguida, a meus pais, a meu marido e a meus filhos... Meu amor por vocês é imensurável.

Vocês são a razão do meu viver!!!

Agradecimentos...

Para realizar este trabalho e vencer os diversos obstáculos que caracterizam todo empreendimento, foi necessário o apoio, a colaboração, o incentivo e o carinho de muitas pessoas —, ou melhor: amigos. Cada um contribuiu de certa forma para que eu pudesse encontrar forças e prosseguir em meu caminho. Por isso, aqui vão meus sinceros agradecimentos a todos que me ajudaram...

A Deus, em primeiro lugar, de quem recebi o dom da vida, sem o qual nada disso seria possível, agradeço por mais esta etapa que estou vencendo e pelas muitas que virão. Que Sua constante presença ilumine sempre minha vida e meu futuro.

A meus pais, por terem sido exemplos de vida, por me apoiarem sempre, cuidando de mim com amor e dedicação; também por serem avós maravilhosos para meus filhos, vocês merecem todo o meu amor, a minha gratidão, meu respeito e minha admiração.

A meu marido, por ser meu grande amor e companheiro de todas as horas; por compreender minhas dificuldades, minhas ausências e preocupações, apoiando-me em todos os meus objetivos, como sempre... Você tem uma participação especial neste trabalho. Essa conquista não seria possível sem você. Portanto, não é só minha; é nossa! Te amo...

A meus filhos Gabriel e Yuri, por serem minha razão de viver, minha inspiração. Seus sorrisos me fortalecem! Como vocês crescem rápido e, na correria da vida, o tempo passa ainda mais veloz, e eu não tenho conseguido acompanhar esse crescimento como queria. Ficar longe de vocês quando era necessário, deixava-me um vazio enorme; mas chegar em casa, rever seus sorrisos e ganhar seus carinhos sempre foi uma grande recompensa!

A minha filha Alice, que, logo, logo, chegará ao mundo para alegrar de vez minha vida e de toda a família. Esta gravidez me deixou ainda mais completa e realizada como mãe.

A meus irmãos: Evaldo, por ter sido meu companheiro de molecagem, quando éramos crianças e íamos juntos a todos os lugares; ao Douglas, pela amizade e pelo estímulo a minhas conquistas.

Ao Oto, a Oká e à Karen, por tornarem os momentos de folga mais felizes, com suas reuniões familiares, descontraindo e relaxando a todos. Tenho grande orgulho de fazer parte dessa família!

Ao Professor Dr. Sandro Rogério de Almeida, pela orientação e pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho, bem como pela atenção dispensada e por tudo o que aprendi em laboratório.

A minha amiga Lavínia, por seu companheirismo e sua amizade; pelo apoio, pelo incentivo e pela ajuda nos experimentos; por sua companhia nos percursos longos até a USP e pelas madrugadas de trabalho! Foi sofrido, mas nos divertimos muito também. Agradeço-lhe igualmente por ter me mostrado novos caminhos a seguir, por tornar mais suaves os dias longe de minha família e por ter compartilhado comigo todas as minhas angústias, meus medos, erros e acertos. Estarei sempre torcendo por suas vitórias e conquistas, e espero que nossa amizade se mantenha mesmo com a distância... Obrigada, de coração, por tudo!

À Maria da Glória de Sousa, pela disposição constante em me ajudar, ouvir minhas dificuldades; enfim, por seus ensinamentos e conselhos e por ter me ajudado na revisão deste trabalho. Em suma, por tudo... Muito obrigada!

À Suelen Silvana dos Santos, por toda a ajuda e pelos ensinamentos; pela paciência e por dispor de seu tempo para auxiliar-me neste trabalho. Sem sua ajuda, tudo teria sido muito mais difícil... Muito obrigada!

À Karla Letícia Santiago, por sempre se mostrar pronta a ajudar e a ensinar; por ser essa pessoa cativante, meiga e carinhosa... Por todas as noites nas quais me acolheu em seu apartamento, para um merecido descanso! Nem sei como agradecer...

À Grasielle Jannuzzi, pela ajuda e pela companhia nos experimentos; por ser uma pessoa meiga, alegre e sempre amiga. Você é daquelas pessoas que, mesmo quando acabamos de conhecer, parece que conhecemos há anos! Agradeço-lhe também pelas acolhidas em seu apartamento e por sua amizade.

À Soninha, pela pessoa maravilhosa e contagiante que ela é... Deveriam existir mais pessoas como você neste mundo, pois sem dúvida ele seria mais alegre! Obrigada!

À Karen Spadari Ferreira, pela ajuda e por seus ensinamentos; pelas revisões de relatórios e pelas dúvidas sanadas. Obrigada!

À Renata Albuquerque, pelo trabalho no citômetro, pelas discussões de resultados, pela torcida para dar tudo certo sempre; enfim, por ser também um exemplo de organização e paciência. Sua ajuda não foi somente importante, mas fundamental...

A todos os amigos do laboratório que contribuíram para a realização deste trabalho, cada um ao seu modo: Fábio Seiti, Gilberto Kaihami, Lucas, Miriam, José Roberto, Pollyana e Viviane Mazzo. Muito obrigada pela amizade e por tudo!...

À Ana Dantas, pela devo toda ajuda nas questões burocráticas relacionadas a este trabalho.

Em resumo, a todos os que contribuíram, direta ou indiretamente, para a conclusão de minha pesquisa, meu muito obrigada!

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de São Paulo (USP), com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Kimura, T. F. E. Análise da capacidade migratória de células dendríticas na cromoblastomicose experimental. Dissertação para Qualificação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

RESUMO

A cromoblastomicose é uma micose subcutânea, com alto índice de morbidade, sendo *Fonsecaea pedrosoi* (*F. pedrosoi*) considerado o maior agente etiológico dessa micose, caracterizando uma doença crônica, geralmente confinada na pele e tecidos subcutâneos. Raramente os indivíduos apresentam cura dessa doença, pois as terapias contemporâneas mostram-se deficientes e poucos trabalhos relatam a relação parasito–hospedeiro. As células dendríticas (DCs) são especializadas na apresentação de antígenos para linfócitos T *naïve* induzindo respostas imunes primárias. Diante disso, propomos estudar a capacidade migratória de DCs após infecção com conídios de *F. pedrosoi*, uma vez que o processo de migração dessas células está intimamente ligado com a sua função sobre as células T, levando ao desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa protetora. O fenótipo de DCs foi avaliado através de células obtidas dos linfonodos poplíteos, inguinais e patas de camundongos BALB/c após 12, 24 e 72 horas de infecção com conídios do fungo. Células obtidas foram marcadas com anticorpos específicos e analisadas por citometria de fluxo. Após 24 e 72 horas de infecção verificamos uma diminuição significativa na porcentagem de DCs nas patas, e um aumento significativo dessas células nos linfonodos após 72 horas. A expressão de marcadores de superfície como CCR7 e moléculas co-estimulatórias, mostraram-se diminuídas nas células obtidas das patas. Como no processo de imunofenotipagem podemos analisar DCs vindas de diversos locais, para melhor avaliar a capacidade migratória das DCs, células das patas foram marcadas *in vivo* injetando-se subcutaneamente o corante CFSE juntamente com conídios do fungo. Verificamos que após 12 e 72 horas, as DCs das patas dos animais infectados, migraram para os linfonodos regionais. Assim constatamos que o fungo *F. pedrosoi* é capaz de induzir a migração de macrófagos e neutrófilos para o sítio de infecção em poucas horas, leva ao aumento de células B nos linfonodos após 12 e 72 horas de infecção, e também leva ao aumento de linfócitos T CD4⁺ tanto no local de infecção quanto nos linfonodos. Os resultados também comprovam que o fungo *F. pedrosoi* foi capaz de ativar as DCs, induzindo sua migração para os linfonodos regionais.

Palavras-Chaves: Cromoblastomicose, células dendríticas e migração celular.

Kimura, T. F. E. Analysis of the migratory ability of dendritic cells in experimental chromoblastomycosis. Dissertação para Qualificação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

ABSTRACT

The chromoblastomycosis is a subcutaneous mycosis with a high morbidity rate, *Fonsecaea pedrosoi* (*F. Pedrosoi*) being the largest etiologic agent of this mycosis, featuring a chronic disease, usually confined to the skin and subcutaneous tissues. Rarely do people have cure for this disease, because the therapies shown to be deficient contemporary and few studies report the host-parasite relationship. Dendritic cells (DCs) are specialized in presenting antigens to naïve T lymphocytes inducing primary immune responses. Therefore, we propose to study the migratory capacity of DCs after infection with conidia of *F. pedrosoi*, since the migration of these cells is intimately linked to its function on T cells, leading to development of a protective adaptive immune response. The phenotype of DCs was evaluated using cells obtained from popliteal lymph nodes, sub cutaneous tissue of BALB/c mice after 12, 24 and 72 hours of infection with conidia of the fungus. Cells were labeled with specific antibodies and analyzed by flow cytometry. After 24 and 72 hours of infection we found a significant decrease in the percentage of DCs in the sub cutaneous tissue, and a significant increase of these cells in the lymph nodes after 72 hours. The expression of surface markers such as CCR7 and costimulatory molecules, were reduced in cells obtained from the sub cutaneous tissue. Like the process of immunophenotyping we can analyze DCs coming from various locations, to better assess the migratory capacity of DCs, cells were stained paws in vivo by injecting dye subcutaneously with CFSE conidia of the fungus. We found that after 12 and 72 hours, DCs sub cutaneous tissue of infected animals migrated to regional lymph nodes. We found that the fungus *F. pedrosoi* is capable of inducing migration of macrophages and neutrophils to the site of infection within a few hours, leads to increased B-cells in lymph nodes after 12 and 72 hours of infection, and also leads to an increase of CD4 + T lymphocytes in both the site of infection and in the lymph nodes. The results also show that the fungus *F. pedrosoi* was able to activate the DCs, inducing their migration to regional lymph nodes.

Key Words: Chromoblastomycosis, dendritic cells and cell migration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Macro e micromorfologia do fungo *F. pedrosoi*.

Figura 2: Corpos escleróticos ou células muriformes do fungo *F. pedrosoi*.

Figura 3: Aspecto clássico das lesões de cromoblastomicose.

Figura 4: Porcentagem de células CD11c⁺ obtidas das patas de camundongos BALB/c após infecção subcutânea com conídios de *F. pedrosoi*.

Figura 5: Porcentagem de células CD11c⁺ obtidas de linfonodos inguinais e poplíteos de camundongos BALB/c após infecção subcutânea com conídios de *F. pedrosoi*.

Figura 6: Análise fenotípica de células CD11c⁺ obtidas das patas de camundongos BALB/c.

Figura 7: Análise fenotípica de células CD11c⁺ obtidas de linfonodos inguinais e poplíteos de camundongos BALB/c.

Figura 8: Análise de células F4/80⁺ obtidas das patas de camundongos BALB/c após infecção subcutânea com conídios de *F. pedrosoi*.

Figura 9: Análise de células F4/80⁺ obtidas de linfonodos inguinais e poplíteos de camundongos BALB/c após infecção subcutânea com conídios de *F. pedrosoi*.

Figura 10: Análise de células Ly6G⁺/CD11b⁺ obtidas das patas de camundongos BALB/c após infecção subcutânea com conídios de *F. pedrosoi*.

Figura 11: Análise de células Ly6G⁺/CD11b⁺ obtidas de linfonodos inguinais e poplíteos de camundongos BALB/c após infecção subcutânea com conídios de *F. pedrosoi*.

Figura 12: Análise de células CD45R⁺/B220⁺/CD19⁺ obtidas das patas de camundongos BALB/c após infecção subcutânea com conídios de *F. pedrosoi*.

Figura 13: Análise de células CD45R⁺/B220⁺/CD19⁺ obtidas de linfonodos inguinais e poplíteos de camundongos BALB/c após infecção subcutânea com conídios de *F. pedrosoi*.

Figura 14: Análise de células TCD4⁺/TCD8⁺ obtidas das patas de camundongos BALB/c após infecção subcutânea com conídios de *F. pedrosoi*.

Figura 15: Análise de células TCD4⁺/ TCD8⁺ obtidas de linfonodos inguinais e poplíteos de camundongos BALB/c após infecção subcutânea com conídios de *F. pedrosoi*.

Figura 16: Migração de células CFSE⁺/CD11⁺ das patas para linfonodos regionais após infecção s.c. com conídios de *F. pedrosoi*.

Figura 17: Migração de células CFSE⁺/CD11⁺ das patas para linfonodos regionais após infecção s.c. com conídios de *F. pedrosoi*.

Figura 18: Análise da expressão de CD86⁺ e MHC-II⁺ por células CFSE⁺/CD11⁺ obtidas de linfonodos regionais após 12 horas de infecção s.c. com conídios de *F. pedrosoi*.

Figura 19: Porcentagem de células T CD4⁺ obtidas das patas após 7 dias de infecção s.c. com conídios de *F. pedrosoi*.

Figura 20: Porcentagem de expressão de IFN-γ por células T CD4⁺ obtidas das patas após 7 dias de infecção s.c. com conídios de *F. pedrosoi*.

Figura 21: Porcentagem de expressão de IL-4 por células T CD4⁺ obtidas das patas após 7 dias de infecção s.c. com conídios de *F. pedrosoi*.

Figura 22: Porcentagem de expressão de IL-10 por células T CD4⁺ obtidas das patas após 7 dias de infecção s.c. com conídios de *F. pedrosoi*.

Figura 23: Porcentagem de células T CD4⁺ obtidas dos linfonodos após 7 dias de infecção s.c. com conídios de *F. pedrosoi*.

Figura 24: Porcentagem de expressão de IFN-γ por células T CD4⁺ obtidas dos linfonodos após 7 dias de infecção s.c. com conídios de *F. pedrosoi*.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

APC – *Antigen presenting cell* (Célula apresentadora de antígenos)

CD – *Cluster of Differentiation*

CEEAF/FCF - Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas

CFSE - *Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl Ester*

DCs – Células dendríticas

DC-SIGN – *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*

FACS - *Fluorescent Activated Cell Sorting* (Separação de Célula pela Atividade de Fluorescência)

Fc – Fragmento cristalizável da molécula de imunoglobulina

FITC – *Fluorescein Isothiocyanate* (Isotiocianato de Fluoresceína)

FMO – *fluorescence-minus-one*

FSc – *Foward Scatter* (Tamanho relativo)

F.p.- *Fonsecaea pedrosoi*

G - giros

h - horas

IFN-γ – Interferon-gama

IL – Interleucina

LNs - Linfonodos

MHC – *Major histocompatibility complex* (Complexo Principal de Histocompatibilidade)

PBS – *Phosphate buffered saline* (Solução Salina de Fosfato Tamponada)

P.brasiliensis – *Paracoccidioides brasiliensis*

PE – *Phicoeritrina* (Ficoeritrina)

PI - Iodeto de propídeo

rpm – Rotações por minuto

s.c - Subcutânea

SPF - *Specific Pathogen Free* (Padrão sanitário livre de patógenos específicos)

SSc – *Side Scatter* (Complexidade)

TGF β - Fator de transformação do crescimento

Th – *T helper* (Linfócito T auxiliar)

TLR – *Toll like receptor* (Receptores do tipo Toll)

TNF- α – *Tumor necrosis factor* (Fator alfa de necrose tumoral)

UEPA – Universidade Estadual do Pará

UFPA – Universidade Federal do Pará

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Fungo.....	30
3.2 Caldo batata.....	30
3.3 Obtenção dos conídios	30
3.4 Animais	31
3.5 Infecção experimental com <i>F. pedrosoi</i>	31
3.6 Imunofenotipagem de células das patas e dos linfonodos regionais após infecção subcutânea com conídios de <i>F. pedrosoi</i> por citometria de fluxo	31
3.7 Marcação de células dendríticas <i>in vivo</i> com CFSE e análise da migração de células CFSE ⁺ /CD11c ⁺ para os linfonodos poplíteos e inguinais após 12, 24 e 72 horas de infecção com conídios de <i>F. pedrosoi</i>	32
3.8 Determinação de citocinas intracelulares produzidas por linfócitos TCD4 ⁺ por citometria de fluxo	32
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
5 RESULTADOS.....	34
5.1 Determinação de células CD11c ⁺ após infecção com conídios de <i>F. pedrosoi</i>	34
5.2 Caracterização fenotípica de células CD11c ⁺ obtidas das patas após 12, 24 e 72 horas de infecção com conídios de <i>F. pedrosoi</i>	37
5.3 Caracterização fenotípica de células CD11c ⁺ obtidas dos linfonodos após 12, 24 e 72 horas de infecção com conídios de <i>F. pedrosoi</i>	40
5.4 Análise de células F4/80 ⁺ após 12, 24 e 72 horas de infecção com conídios de <i>F. pedrosoi</i>	43
5.5 Análise de células Ly6G ⁺ após 12, 24 e 72 horas de infecção com conídios de <i>F. pedrosoi</i>	46
5.6 Análise de linfócitos B após 12, 24 e 72 horas de infecção com conídios <i>F. pedrosoi</i>	49
5.7 Análise de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ após 12, 24 e 72 horas de infecção com conídios de <i>F. pedrosoi</i>	52

5.8 Análise da capacidade migratória de células CFSE ⁺ /CD11c ⁺ para os linfonodos poplíteos e inguinais após 12, 24 e 72 horas de infecção com conídios de <i>F. pedrosoi</i>	55
5.9 Perfil de citocinas expressas por linfócitos TCD4 ⁺ obtidos das patas de camundongos infectados com conídios de <i>F. pedrosoi</i> por 7 dias.....	60
5.10 Perfil de citocinas expressas por linfócitos TCD4 ⁺ obtidos dos linfonodos poplíteos e inguinais de camundongos infectados com conídios de <i>F. pedrosoi</i> por 7 dias	63
6 DISCUSSÃO	65
7 CONCLUSÕES.....	72
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
ANEXO.....	82

1. INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos diversificados, eucariotos, heterotróficos e osmotróficos. Estima-se que existam entre 100.000 e 1.000.000 de espécies fúngicas habitando o planeta. A convivência com os fungos tem levado à evolução, nos animais multicelulares de mecanismos inatos e adaptativos de defesa. Poucas espécies causam regularmente doenças invasivas em humanos, pois a maioria atua como agentes oportunistas nos indivíduos com deficiências imunes específicas (LEVITZ, 2004).

As micoses subcutâneas representam um problema de saúde frequente em países da América Latina e outras regiões tropicais e subtropicais. Embora tais infecções raramente causem doença invasiva ou disseminada, tais infecções têm um impacto importante na saúde pública e, portanto o diagnóstico oportuno e o tratamento adequado são importantes. A maioria dos agentes etiológicos é encontrada no solo, na vegetação e nas matérias em decomposição de ambientes tropicais, subtropicais e úmido (QUEIROZ-TELLES et al., 2010).

A cromoblastomicose é uma micose subcutânea crônica, os agentes etiológicos são ubíquos na natureza, integrando a microbiota do solo, da água e da matéria orgânica em decomposição. Tais agentes vivem saprofiticamente na matéria orgânica, sem exigências pedológicas específicas, como composição orgânica ou pH (QUEIROZ-TELLES et al., 1996).

As primeiras descrições dessa enfermidade fúngica datam do início do século passado. Em 1911, Pedroso a descreveu pela primeira vez na cidade de São Paulo/Brasil. A segunda referência é de Medlar e Lane, nos Estados Unidos, com menção à espécie *Phialophora verrucosa*. Doze anos mais tarde, Fonseca e Leão apresentaram o gênero *Acroteca*. Em 1936, Negrón fundiu os aspectos morfológicos de *Acroteca* e *Hormodendrum* e criou o gênero *Fonsecaea*. Uma nova espécie foi descrita em 1936 por Carrion em Porto Rico, hoje denominada *Fonsecaea compacta*. Finalmente, uma espécie foi descrita por Trejos, em 1954, *Cladosporium carrionii*, cuja particularidade é o fato de ser a única espécie que é isolada dos casos australianos dessa micose (RIBEIRO et al., 2006).

Segundo De Hoog et al. (2007), o desenvolvimento de ferramentas moleculares facilitou a identificação das espécies, sendo o gênero *Fonsecaea* composto também por outras espécies, *F. pedrosoi*, *F. nubica* e *F. monophora*. Morfologicamente essas espécies são muito semelhantes, porém, em relação à patologia diferem uma das outras, *F. pedrosoi* e *F. nubica* estão mais relacionadas com cromoblastomicose, enquanto *F. monophora* é mais oportunista, além de causar cromoblastomicose pode

também ocasionar outros tipos de infecção, afetando outros órgãos como cérebro, a vesícula biliar e os linfonodos cervicais (DE HOOG et al., 2004; YAGUCHI et al., 2007; NAJAFZADEH et al., 2009).

Os agentes de cromoblastomicose pertencem à família *Herpotrichiellaceae*, ordem Chaetothyriales, formada por organismos que apresentam história evolutiva relacionada ao parasitismo em hospedeiros vertebrados (DE HOOG, 1997). De modo geral, a doença tem natureza multietiológica e ocorre pela implantação traumática do fungo na pele e no tecido subcutâneo. A maioria dos casos de cromoblastomicose relatados tem como agente etiológico a *Fonsecaea pedrosoi* (*F. pedrosoi*), ocorrendo principalmente em habitantes de regiões tropicais e subtropicais, seguido por *Cladophialophora* (*Cladosporium*) *carrionii* que prevalece em regiões de clima árido ou semi-árido de Madagascar (ESTERRE et al., 1996), da Austrália (ANTHONY et al., 1963), da Venezuela (BORELLI et al., 1987), do Equador e do Peru (ARELLANO-OCAMPO et al., 1968). Outras espécies, em alguns casos, também podem causar cromoblastomicose: *Wangliella* (*Exophiala*) *dermatitides*, *Exophiala spinifera*, *Exophiala jeanselmei* e *Exophiala castelani* (LACAZ et al., 1998).

No Brasil foram diagnosticados entre 1985 e 1996, 71 casos no estado do Paraná (QUEIROZ-TELLES, 1997); 100 casos entre 1963-1998 no Rio Grande do Sul (MINOTTO et al., 2001) e após um estudo entre 1942-1997 com 325 casos diagnosticados a região Amazônica foi considerada endêmica (SILVA et al., 1999). No Brasil também são consideradas áreas endêmicas no país, o Rio Grande do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Rondônia (MATTE et al., 1997).

A Amazônia é considerada a principal área de ocorrência da doença, pois as condições climáticas, como a precipitação anual média de 1500-1700 mm³, a temperatura de 24°C – 26°C e a umidade anual relativa de aproximadamente 83% parecem contribuir, decisivamente, para o crescimento do fungo na natureza (MARQUES et al., 2006). Aspectos epidemiológicos semelhantes foram observados nessa região por Silva et al. (1998), cujo estudo demonstrou que o estado do Pará apresenta alta prevalência de cromoblastomicose, com mais de 325 casos em 55 anos. De 2001 a 2006, foram diagnosticados na Unidade de Referência e Treinamento em Dermatologia Sanitária “Dr. Marcelo Candia” (URE Marcello Candia), localizada no município de Marituba no estado do Pará, mais de 80 novos casos de cromoblastomicose (ARAÚJO, 2008).

O Maranhão ocupa o terceiro lugar no que se refere aos registros da doença no Brasil. A maioria dos casos ocorre na região denominada “Baixada Maranhense”, provavelmente associada à importante atividade ocupacional dos seus habitantes que é quebrar o côco babaçu (*Orbignya phalerata*) (MARQUES et al., 2006).

No Rio Grande do Sul, Minotto et al. (2001), revisaram 100 casos de pacientes entre 1963 e 1998. Os resultados obtidos mostram predominância da doença no sexo masculino, entre lavradores com lesões nos membros inferiores. A maior parte dos casos foi encontrada na região norte do estado, Matte et al. (1997), associaram a presença do fungo no Rio Grande do Sul, aos fatores climáticos, bem como ao revestimento e à composição do solo, os quais favoreceriam a proliferação dos fungos. Os autores destacam ainda, que nessa região predomina a pequena propriedade rural, na qual o agricultor tem o hábito de trabalhar diretamente na terra, descalço e, usualmente, de calças arregaçadas. O tempo médio entre o aparecimento da doença e o diagnóstico médico foi de 14 anos e *F. pedrosoi* foi encontrado em 96% dos casos.

Além dos casos relatados no Brasil, outros casos de cromoblastomicose têm sido relatados no México, nos Estados Unidos, no Sri Lanka e no Japão (MINOTTO et al., 2001; BONIFAZ et al., 2001).

As formas fúngicas envolvidas no estabelecimento do processo infeccioso ainda não são perfeitamente conhecidas, nem como tais células se adaptam do saprofitismo à fase parasitária. Hifas e conídios têm sido citados como possíveis estruturas implantadas no tecido subcutâneo após traumatismo (DE HOOG et al., 2000; CORBELLINI et al., 2006).

F. pedrosoi é considerado um fungo polimórfico por apresentar mais de duas formas de desenvolvimento, como os conídios, hifas ou micélios considerados as formas saprofíticas, e os corpos escleróticos ou células muriformes isolados ou ligados às hifas, que são considerados a forma patogênica (SILVA et al., 2002; ALVIANO et al., 1992). Como aspecto macroscópico, apresenta em ágar-Sabouraud, à temperatura de 25° C, colônia velutina, cinza-escuro-olivácea ou negra, plana, com centro elevado, convexo, e reverso negro. Como aspecto microscópico, apresenta hifas septadas, ramificadas e marrom-claras. Três tipos de esporulação são encontrados nos cultivos em lâmina, da mesma espécie: tipo *Cladosporium*, que é predominante; tipo *Rhinocladiella* e tipo *Phialophora*, que é ocasional. Os esporos são escassos nos cultivos com ágar-Sabouraud, sendo a esporulação estimulada em ágar fubá e ágar batata (LACAZ et al., 1991).

A transformação das células fúngicas em células escleróticas tem sido sugerida como o possível fator de virulência. Formas arredondadas, similares a células escleróticas, também foram verificadas em tecido medular vegetal e espinhos, sendo indicativo da existência *in natura* de estruturas fúngicas pré-adaptadas ao parasitismo (ZEPPENFELDT et al., 1994; DE HOOG et al., 2000; BADALI et al., 2008). Fatores peculiares ao hospedeiro podem estar envolvidos na transformação celular *in vivo* de *F. pedrosoi*. Fator ativador de plaquetas (PFA), um fosfolipídio produzido por

neutrófilos, macrófagos, basófilos, eosinófilos e células endoteliais, foi demonstrado como indutor da conversão de elementos micelianos de *F. pedrosoi* para células escleróticas (ALVIANO et al., 2003).

Figura 1: Macro e micromorfologia do *F. pedrosoi*. Aspectos macroscópicos da cultura do fungo (A e B), que apresenta coloração negra e aveludada. Micromorfologia, hifas que apresentam conidióforos terminais (seta preta) e conídios (seta branca) (C e D) (SALGADO et al., 2004).

Figura 2: Corpos escleróticos ou células muriformes do *F. pedrosoi*. Forma patogênica. (Seta preta, E) (SALGADO et al., 2004).

A sobrevivência de um fungo demácio no hospedeiro humano, o qual é considerado um habitat hostil, é favorecida pela presença de melanina na parede celular, pelos lipídios das diversas estruturas celulares e pela termotolerância a 37°C (RIBEIRO et al., 2006).

A doença atinge desde crianças até idosos, mas a faixa etária com maior número de casos é a compreendida entre 30 e 60 anos. Acredita-se que o paciente é

contaminado quando jovem, mas só vai desenvolver a doença em idade mais avançada. Outro fator importante é a contínua preferência do parasita por indivíduos do sexo masculino, preferência essa que independe da ocupação da pessoa contaminada. Alguns autores acreditam que fatores hormonais possam conferir proteção imunológica contra a infecção, mas até o momento nenhuma pesquisa confirma tal hipótese. Além disso, todas as raças parecem ser suscetíveis à doença (MCGINNIS, 1983; SILVA et al., 1998; SILVA et al., 1999; CASTRO, 1998).

Muitos pacientes com lesão ativa na vida adulta parecem ter se infectado em razão de algum trauma sofrido durante a infância ou a juventude. Esses fatos corroboram a explicação de que os agentes da cromoblastomicose, após sua implantação nos tecidos do hospedeiro, podem permanecer latentes por longos períodos antes de se tornarem invasivos (RIPPON, 1988; ATTAPATTU, 1997).

Embora a doença seja causada por várias espécies de fungos demácios, as manifestações clínicas, são semelhantes. A localização das lesões se dá principalmente na região podal, nas pernas, nas nádegas e com menor frequência nas mãos e nos braços. No entanto, já foram observados casos de infecção nas regiões auricular e nasal, bem como em outras partes do corpo (QUEIROZ-TELLES, 1996; ARANGO et al., 1998; BITTENCOURT et al., 1994; VYAS et al., 2000).

Inicialmente, observa-se no local da penetração do inóculo a presença de lesão papular de superfície lisa e eritematosa, que gradualmente aumenta de tamanho e passa a apresentar, superfície descamativa. A lesão inicial pode ser única ou múltipla e, tende a se transformar em nódulos superficiais que, por sua vez, podem expandir-se lateralmente, formando extensas placas. Nódulos e placas podem coalescer, originando lesão tumoral ou papilomatosa, de aspecto semelhante a uma couve-flor (CASTRO, 1998; QUEIROZ-TELLES, 1996; LACAZ et al., 2002). Frequentemente, essas lesões são associadas a infecções bacterianas secundárias (AL-DORY, 1972; RIPPON, 1988).

Figura 3: Aspecto clássico das lesões de cromoblastomicose. A) Lesão vegetante com fibrose acentuada), B) Lesão verucosa, C) Lesão tricofitóide. D) Lesão crostosa, E) Caso de cromoblastomicose cutânea disseminada.

Fonte: Laboratório de Dermato-Imunologia UEPA/UFPA/MC

O diagnóstico pode ser feito por exame direto, mediante a retirada de material das lesões, principalmente dos pontos negros e clarificados com KOH 10%, em que se observam células escleróticas ou corpos muriformes, os quais são patognomônicos da cromoblastomicose.

O diagnóstico micológico completa-se pelo isolamento do fungo em meio de cultura ágar-Sabouraud, mantido em temperatura ambiente. As colônias suspeitas aparecem após 7 a 15 dias de cultivo, sob a forma de pequenos pontos negros (LACAZ, 1998). As colônias são escuras, aveludadas e com centros elevados. A análise macroscópica, contudo, não possibilita identificar a espécie fúngica, já que os agentes da cromoblastomicose desenvolvem colônias semelhantes. Por esse motivo, é necessária a análise micromorfológica do conidióforo e da conidiogênese para a identificação do gênero e da espécie de tais organismos.

O exame histopatológico é utilizado para elucidar casos de resultados “falso-negativos”. Nos tecidos parasitados observa-se que os agentes da cromoblastomicose provocam resposta inflamatória de padrão misto, de natureza supurativa e granulomatosa (SALFETER, 1990). Na epiderme, a principal característica histológica observada é a hiperplasia pseudo epiteliomatosa ou acantose, podendo às vezes, ocorrer hiperqueratose ou abscessos. Na derme, o infiltrado inflamatório contém nódulos granulomatosos confluentes, compostos por células epitelióides, células

gigantes de Langerhans ou corpos estranhos. Os granulomas, por vezes, podem conter microabscessos com neutrófilos e restos celulares. Os elementos muriformes e outras formas parasitárias podem ser encontrados no interior das células gigantes (TIBIRIÇA et al., 1939, CHANDLER et al., 1980, URIBE et al., 1989, PURIM et al., 1991).

Os ensaios imunológicos não são empregados rotineiramente como método de diagnóstico ou acompanhamento terapêutico dos pacientes com cromoblastomicose, pois a detecção do fungo por exames micológico direto, histopatológico e isolamento em cultivo são mais vantajosos (LACAZ et al., 2002).

A doença é insidiosa e a lesão aumenta e progride lentamente, desafiando os tratamentos usuais e levando a frequentes recidivas (D'ÁVILA et al., 2002). Há relatos de lesões que se desenvolveram por períodos superiores a 30 anos (ESTERRE et al., 2000). Na maior parte dos casos a doença causa desconforto estético aos pacientes, acomete, principalmente, mãos, pernas e pés, embora não haja comprometimento das funções desses membros em grande parte dos casos (D'ÁVILA et al., 2002).

Quando não diagnosticada na fase inicial, a cromoblastomicose crônica pode causar alguns problemas graves, como a dificuldade de tratamento (em decorrência do recrudescimento da doença), associação potencial com o crescimento de carcinoma epidermóide, baixa qualidade de vida do paciente e a incapacidade deste para o trabalho (MILAM et al., 1989; USUKI et al., 1996). Nos casos em que ocorre fibrose extensa é frequente o bloqueio dos vasos linfáticos, isso favorece o aparecimento de infecções secundárias por bactérias causando um linfedema que pode incapacitar o paciente para o trabalho (OGAWA et al., 2003).

A cromoblastomicose é um importante desafio terapêutico enfrentado pelas equipes de profissionais da saúde e pelos pacientes. Diversos métodos e substâncias já foram utilizados, mas os resultados, aparentemente promissores, raramente possuem consistência suficiente que justifique sua utilização em larga escala ou fossem considerados métodos de eleição para o tratamento da cromoblastomicose (QUEIROZ-TELLES, 1997; CASTRO, 1998). Segundo Castro (1992) a existência de várias modalidades terapêuticas é a maior prova de que nenhuma delas apresenta eficácia satisfatória suficiente para ser qualificada como método de eleição.

As formas de tratamento conhecidas podem ser divididas em três grupos: cirúrgicas, quimioterápicas e físicas. Os médicos têm associado duas ou mais formas de tratamento, de modo alternado ou simultâneo, considerando a resistência da doença aos mais variados tipos de tratamento.

Os antifúngicos que vêm mostrando maior eficácia são o Itraconazol (200 – 400mg por dia) e a Terbinafina (500 – 1000mg por dia) administrados por pelo menos

6 – 12 meses, de preferência nas doses mais elevadas se toleradas pelos pacientes. Ambas as drogas demonstraram elevada atividade *in vitro* contra os agentes causadores da cromoblastomicose (BONIFAZ et al., 2001; ESTERRE et al., 1996; XIBAO et al., 2005).

Resistência de agentes fúngicos à terapia convencional, elevado custo dos antifúngicos, carência de experimentação animal com drogas mais eficazes e acentuado número de recidivas têm inviabilizado o estabelecimento de regimes terapêuticos satisfatórios para a cromoblastomicose (ELGART, 1996; DE HOOG et al., 2000; ESTERRE; QUEIROZ – TELLES, 2006).

O sistema imunológico é um notável sistema de adaptação para defesa que evoluiu nos vertebrados, protegendo-os de micro-organismos patogênicos invasores. É capaz de gerar um grande número de células e moléculas que podem especificamente ou inespecificamente eliminar uma variedade aparentemente ilimitada de agentes invasores. Essas células e moléculas agem em conjunto proporcionando uma rede dinâmica primorosamente adaptável (GOLDSBY et al., 2000; CHARALAMPOS et al., 2005). Destacam-se os neutrófilos, os macrófagos e os monócitos com papel essencial na atividade fagocítica e apresentadora de antígeno (HUFFNAGLE et al., 2003; MCCORMACK et al., 2003; ROMANI, 2004).

A resposta imune compreende todos os mecanismos aos quais o hospedeiro recorre para reconhecer ou identificar aquilo que lhe é estranho, reagindo a fim de poder neutralizá-lo ou eliminá-lo, com ou sem prejuízo de seus próprios tecidos. Várias evidências nas infecções fúngicas em humanos e modelos animais indicam que a imunidade celular é crucial para a defesa do hospedeiro (ALMEIDA, 2008).

Em várias doenças fúngicas, muitos fatores podem regular a resistência e a suscetibilidade. A dose e a natureza do antígeno, o sítio de imunização, as células apresentadoras de antígenos e a co-estimulação do meio ambiente são alguns cofatores que irão determinar a polarização da resposta imune a ser ativada (BRETSCHER et al., 1992; FERREIRA et al., 2003).

A interação entre as células apresentadoras de antígenos com os patógenos de natureza fúngica é fundamental para desencadear o tipo de resposta imune. Evidências recentes sugerem que a resposta do hospedeiro contra fungo patogênico pode ser influenciada pelo tipo celular envolvido e pelo perfil de produção de citocinas (BALLOY et al., 2005; CHARALAMPOS et al., 2005).

Os fagócitos do sistema imunológico inato formam uma primeira linha de defesa contra muitos micro-organismos comuns e são essenciais para o controle das infecções. Contudo, nem sempre conseguem eliminar os organismos infectantes, e há muitos patógenos que eles não conseguem reconhecer. As células do sistema

imunológico inato desempenham papel crucial na iniciação e no posterior direcionamento das respostas imunes adaptativas. Acima de tudo, uma vez que há uma demora de quatro a cinco dias antes de a resposta imune adaptativa exercer seus efeitos, a resposta inata apresenta papel crítico no controle das infecções durante esse tempo (JANEWAY et al., 2000).

Sabe-se que a espécie *F. pedrosoi* é capaz de ativar o sistema complemento e pode mediar a quimiotaxia (TAGAMI et al., 1984). Estudos têm focado na interação parasito-hospedeiro, e mostrado predominantemente a resposta imune celular, com a ativação de macrófagos envolvendo a fagocitose. E, entretanto, sabe-se que as células escleróticas ou conídios de *F. pedrosoi* são resistentes à fagocitose e raramente se observa a morte das células fúngicas (KURITA et al., 1979). Rozental et al. (1994) demonstraram que *F. pedrosoi* foi capaz de sobreviver e proliferar em macrófagos peritoneais. Indicaram também que, quando ativadas, essas células possuem ação fungistática, e não fungicida. No entanto, os mesmos autores, em 1996, revelaram que neutrófilos haviam conseguido destruir células fúngicas em períodos inferiores a 20 minutos.

Os linfócitos são as únicas células do organismo com capacidade de reconhecer e distinguir especificamente diferentes determinantes antigênicos, possibilitando o desenvolvimento de subclasses dessas células. Funcionam como reguladores da resposta imune a antígenos proteicos, e servem como células efetoras para eliminar micro-organismos extracelulares e células neoplásicas. Os receptores das células T (TCR) reconhecem apenas antígenos peptídicos ligados a proteínas codificadas por genes do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) expressa pelas células apresentadoras de antígenos (JANKOVIC et al., 2001).

Para que ocorra uma resposta mediada por linfócitos T, é necessário que estes interajam com células apresentadoras de antígenos (APCs), proliferem e se diferenciem em células efetoras. As células dendríticas, macrófagos ou linfócitos B são células apresentadoras de antígenos capazes de fazer o processamento do antígeno e a apresentação de peptídeos a linfócitos T (UNANUE; ALLEN, 1987).

A resposta efetiva contra organismos fúngicos requer a contribuição coordenada da imunidade inata e da adaptativa. A imunidade inata consiste em um mecanismo protetor desenvolvido inicialmente e que se mantém durante a evolução dos organismos multicelulares. Assim, uma atividade efetora antifúngica origina-se com o papel de coordenar as células da imunidade adaptativa por meio da apresentação de antígenos e da produção de mediadores como as citocinas (CHARALAMPOS et al., 2005).

O sistema imune inato fornece sinais para a ativação do sistema imune adaptativo, que induz a diferenciação dos linfócitos em diferentes fenótipos com ações efetoras ou de memória. Os fenótipos Th1/Th2 refletem o resultado da ativação das células T *naive* (NOBEN-TRAUTH et al., 2000).

Na cromoblastomicose, sabe-se que os fungos chegam à derme através de uma lesão de continuidade da epiderme, provocando uma reação inflamatória com acúmulo de fagócitos no local da infecção. Os fungos não destruídos pelos neutrófilos são fagocitados por macrófagos e por células de Langerhans, desencadeando uma reação de hipersensibilidade do tipo IV, ou seja, uma reação do tipo granulomatosa (WALTER et al., 1982; URIBE et al., 1989). O tipo de granuloma formado será responsável pelos aspectos clínicos da lesão. As lesões atróficas tendem a formar um granuloma do tipo tuberculóide, compacto, com a presença de macrófagos e linfócitos, principalmente. Já as lesões mais severas, com aspecto verrucoso, desenvolvem um granuloma frouxo, com influxo no qual predominam neutrófilos e eosinófilos, de aspecto supurativo. Esse fato sugere que os fatores determinantes dessa polarização devem estar relacionados à imunidade inata, na qual têm papel determinante os fenômenos que ocorrem no microambiente onde se dá a infecção (D'AVILA, 2001).

Estudos realizados por nosso grupo de estudo, em humanos, demonstraram que os padrões de citocinas encontrados em pacientes indicam que a forma grave (placa verrucosa) da doença é caracterizada pela produção de IL-10 e TNF- α , associados a baixos níveis de IFN- γ e à proliferação de linfócitos. No entanto, pacientes com a forma leve da doença apresentaram altos níveis séricos de IFN- γ e proliferação de linfócitos, assim como baixos níveis de IL-10, sugerindo que a atividade antiinflamatória da IL-10 estava contribuindo para a evolução da doença já que essa citocina é capaz de regular negativamente as atividades dos macrófagos. Esses dados confirmam o melhor quadro clínico dos pacientes que apresentaram aumento na produção de IFN- γ , principal citocina ativadora de macrófagos (GIMENES et al., 2005).

Em consonância com os dados obtidos em nosso laboratório, D'Avila et al.(2002) avaliaram a reação imune mediada por células nas lesões cutâneas de cromoblastomicose em diferentes formas clínicas. Os resultados sugeriram que pacientes com placa verrucosa apresentaram um predomínio de citocinas do tipo Th2 (IL-10) e que pacientes com placa atrófica eritematosa secretaram uma maior quantidade de citocinas do tipo Th1 (IFN- γ).

As células dendríticas formam um grupo heterogêneo de células com localização em vários órgãos e ficam localizadas nos sítios de exposição a antígenos,

como mucosas e tecidos periféricos. Os precursores dessas células originam-se na medula óssea e constantemente migram para diversos tecidos, tais como pele (em que são denominadas de células de Langerhans), sistema gastrointestinal, respiratório, sangue e linfa. Uma das particularidades constatadas na geração de células dendríticas é a plasticidade de sua formação, são originadas por intermédio de precursores mielóides e linfóides. Nos tecidos periféricos, essas células são ineficientes na apresentação do antígeno e na ativação de células T, pois possuem fenótipo imaturo. Células dendríticas imaturas apresentam baixa expressão de moléculas co-estimulatórias e moléculas MHC de classe I e II, mas possuem grande capacidade fagocítica (MANZ, TRAVER et al., 2001; GUERMONPREZ et al., 2002; STEINMAN, 2003).

Tradicionalmente, as células dendríticas têm sido classificadas de acordo com a localização anatômica, a expressão de moléculas de superfície e a função no sistema imunológico. A importância dos vários grupos de células dendríticas tem sido atribuída principalmente à existência de diferentes capacidades de ação na resposta imunológica que envolve a produção de citocinas e quimiocinas, receptores de fagocitose de antígenos e receptores de reconhecimento de micro-organismos (LIPSCOMB E MASTEN, 2002).

As células dendríticas são agrupadas em células dendríticas convencionais (cDCs) e células dendríticas plasmocitóides (pDCs). São diferenciadas pelo marcador mielóide CD11c (KLECHEVSKY, KATO et al., 2005) e estão presentes na maioria dos tecidos na fase de diferenciação chamada “imaturo”. As células dendríticas imaturas são caracterizadas por intensa atividade endocítica e podem capturar vários tipos de antígenos como patógenos, células infectadas, células mortas e seus produtos (TASSANEETRITHEP, BURGESS et al., 2003).

Os receptores de superfície relatados como responsáveis pela ativação e pela maturação das células dendríticas podem ser receptores “Toll-like” (TLRs), receptores de lectinas do tipo C, receptores de citocinas, receptores de TNF (TNF-R) e receptores para a porção Fc. Atualmente, sabe-se que as células dendríticas de camundongos expressam receptores para a porção Fc das imunoglobulinas (FcR): Fc γ RI (CD64), Fc γ RIII e Fc γ RII (CD32) (FANGER *et al.*, 1996 e ESPOSITO-FARESE *et al.*, 1995).

Ao receber algum estímulo, a célula dendrítica imatura inicia o processo de maturação, tornando-se madura. Esse fato pode ser explicado pelas mudanças funcional e fenotípica, que abrangem a expressão de genes importantes para o transporte do antígeno à membrana e a expressão de moléculas importantes para a apresentação antigênica. Estudos também comprovam que a migração das células dendríticas ativadas para o linfonodo é muito mais eficiente quando elas se

transformam em células maduras (GUERMONPREZ et al., 2002). Durante o processo de maturação a expressão do receptor de quimiocina CCR6 diminui, ao passo que a expressão do receptor CCR7 aumenta. A expressão de CCR7 se dá em outras células além das células dendríticas, como linfócitos T e B, as quimiocinas CCL19 e CCL21 são seus únicos ligantes e estão presentes constitutivamente em células epiteliais dos órgãos linfóides secundários. Essa ligação guia a migração das células dendríticas maduras para os linfonodos e sua fixação nas áreas de células T (revisado por FOSTER et al., 2008). Dessa forma, o processo de maturação das células dendríticas integra-se ao processo de migração das tais células em direção às áreas T dos linfonodos, fazendo com que aumente a probabilidade do encontro com um linfócito T antígeno-específico.

A migração contínua de células dendríticas para os órgãos linfóides secundários, tais como os linfonodos, representa um elemento fundamental na homeostase e vigilância imunológica. Nos tecidos periféricos, essas células podem capturar antígenos, migrar através de vasos linfáticos e dentro dos linfonodos realizar subsequente apresentação desses antígenos para células T - um processo que pode resultar na indução de imunidade protetora ou contribuir para a tolerância periférica, dependendo da natureza do antígeno e das circunstâncias simultâneas de apresentação desse antígeno (YAMAZAKI et al., 2009; STEINMAN, 2011).

O processo de migração das células dendríticas é complicado, pois envolve grande número de moléculas, entre as quais: quimiocinas, receptores quimiotáticos, moléculas de adesão e metaloproteinases (CAO et al., 2010).

Estudos realizados por Santos et al. (2011), em nosso laboratório, demonstraram que interações entre o fungo *P. brasiliensis* e células dendríticas geradas de medula óssea, assim como as células dendríticas residentes no pulmão, levam à migração dessas células do sítio de infecção para os linfonodos e a um rápido recrutamento dessas células com alta expressão de MHC-II, CD80 e DEC-205.

Newman et al. (2001), em modelos de doenças fúngicas, demonstraram a eficiência das células dendríticas frente à *Candida albicans*. Essas células foram capazes de reconhecer, fagocitar e apresentar o fungo para as células T, além de apresentarem importante mecanismo fungicida. Na aspergilose experimental, de acordo com Bozza et al. (2002), as células dendríticas são capazes de internalizar tanto hifas como conídios e de produzir diferentes perfis de citocinas frente a esses antígenos.

Em vários modelos de doenças infecciosas, as células dendríticas vêm sendo estudadas por sua capacidade de servir como adjuvante e vacina, mediando proteção contra bactérias, vírus, parasitas ou fungos (MOLL; BERBERICH, 2001).

Em nosso laboratório, Sousa et al. (2009), considerando a importância das células dendríticas como potencial ferramenta para a imunoterapia, estudaram a interação dessas células frente aos conídios de *F. pedrosoi* e, avaliaram a capacidade de células dendríticas de pacientes ou de indivíduos normais, em fagocitar conídios do fungo. As células dendríticas foram capazes de fagocitar conídios após 4 horas de incubação. Após a fagocitose, algumas alterações podem ocorrer nas células dendríticas, dependendo do estado de ativação da célula e da virulência do patógeno.

Como o processo de migração está intimamente ligado à maturação das células dendríticas e, conseqüentemente, com sua função sobre as células T, falhas na migração dessas células podem interferir no desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa protetora.

2 OBJETIVOS

Os principais objetivos desta dissertação foram:

- Quantificar e determinar o fenótipo de células dendríticas nas patas e nos linfonodos inguinais e poplíteos de camundongos após infecção subcutânea com *F. pedrosoi*;
- Determinar o perfil de outras células como; linfócitos T e B, neutrófilos e macrófagos, após infecção subcutânea;
- Avaliar a capacidade de migração das células dendríticas (injetadas no coxim plantar) até os órgãos linfóides secundários (linfonodos inguinais e poplíteos), bem como, avaliar a maturação dessas células por meio da expressão de moléculas co-estimulatórias e MHC-II nessas células.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Fungo

Foi utilizada a cepa do fungo *F. pedrosoi* da *American Type Culture Collection* (ATCC) número 46428 (obtida no Laboratório de Micologia Clínica da Universidade de São Paulo - USP). A mesma foi mantida em meio semi-sólido ágar batata, em estufa a 30°C, com repiques semanais.

3.2 Caldo batata

O meio líquido caldo-batata foi preparado com 20g de batata, 5g de glicose (Merck – Alemanha) e 500 mL de água destilada. A batata foi descascada, cortada em pedaços pequenos e misturada a 50 mL de água destilada. Esta mistura foi fervida até cozimento total da batata, por aproximadamente 30 minutos. Foram, em seguida, acrescentados 450 mL de água destilada e a mistura filtrada em papel apropriado para filtração. Em seguida, acrescentou-se a glicose. O meio foi autoclavado por 15 minutos a 121°C e conservado a 4°C até o uso.

3.3 Obtenção dos conídios

Por analogia à técnica de microcultivo, que utiliza o ágar batata (pobre em nutrientes) para obter um número maior de conídios do fungo, foi utilizado o mesmo meio sem o agar. Conseguindo-se dessa forma, grande número de conídios viáveis de *F. pedrosoi*.

Após crescimento do fungo, a colônia foi submetida a raspagem com alça de platina em "L" e colocada em 50 mL de caldo batata em Erlenmeyer de 250 mL. Esse inóculo foi cultivado sob agitação constante de 200rpm a 28°C por 3 dias. Posteriormente, o meio ficou em repouso por aproximadamente 30 minutos para que as hifas sedimentassem naturalmente. Em seguida, o sobrenadante, que continha os conídios foi recolhido e centrifugado 2 vezes com PBS estéril, a 1190G por 5 minutos, com a finalidade de retirar os resíduos do caldo batata. O número de conídios foi contado em câmara de Neubauer e ajustado de acordo com cada ensaio.

3.4 Animais

Camundongos machos da linhagem BALB/c com 6 a 8 semanas de vida foram obtidos do Biotério do Instituto de Química e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – (USP). Os animais foram mantidos em padrão sanitário livre de patógenos específicos (SPF) e alimentados com ração comercial irradiada. Os camundongos foram sacrificados de acordo com critérios aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – CEEA/FCF - nº de aprovação 268 (ANEXO I).

3.5 Infecção experimental com *F. pedrosoi*

Os camundongos foram infectados via s.c. no coxim plantar, com 1×10^6 conídios de *F. pedrosoi* suspensos em 50µL de PBS estéril. Após 12, 24 e 72h de infecção os camundongos foram sacrificados para a retirada das patas e dos linfonodos poplíteos e inguinais.

3.6 Imunofenotipagem de células das patas e dos linfonodos regionais após infecção subcutânea com conídios de *F. pedrosoi* por citometria de fluxo

As células dos linfonodos de camundongos BALB/c foram purificadas, conforme descrito por Gonzalez-Juarrero e Orme (2001), após 12, 24 e 72h de infecção. Após infecção as patas ficaram incubadas por 60 minutos a 37°C na presença de tampão de digestão, com 0,7µg/mL de colagenase IV e, posteriormente maceradas. Os linfonodos foram macerados na presença de PBS estéril. As partículas maiores foram removidas passando a suspensão de células através de uma membrana de nylon. Em seguida, as células obtidas das patas, bem como dos linfonodos, foram marcadas com anticorpos específicos (CD11c, CD11b, CD8, DEC205, CCR7, CD103, CD40, CD80, CD86, MHC-II, F4/80, Ly6G, CD45R/B220, CD19, CD3, CD4 e CD8) para análise de células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, linfócitos B e linfócitos T CD4 e T CD8) e analisadas por citometria de fluxo. Como controle utilizaram-se as patas e os linfonodos de camundongos injetados apenas com PBS. A análise por citometria de fluxo foi realizada utilizando-se o aparelho FacsCanto (Becton & Dickison, CA), as subpopulações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades de FSc – *Forward Scatter* e SSc – *Side Scatter*, que avaliam o tamanho e a complexidade interna, respectivamente. Após a aquisição de dados necessários, estes foram analisados utilizando o programa FlowJo.

Para distinguir células autofluorescentes de células que expressam poucas concentrações de marcadores de superfície, usou-se a metodologia de *fluorescence-minus-one* (FMO) (ROEDERER et al., 2001). Controles FMO são determinados pela marcação das células com todos os anticorpos/marcadores exceto aquele que será analisado. Os valores obtidos por meio dessa análise são considerados limite FMO, e todos os valores de fluorescência acima deste são considerados verdadeiros positivos. O nível de fluorescência da população de interesse, obtido no canal em que será medido um determinado marcador revelará a auto-fluorescência inerente àquela população alvo. O valor de tal nível permite estabelecer um limite com o qual se faz a distinção entre células auto-fluorescentes e aquelas que expressam um determinante que se ligará ao anticorpo fluorescente usado para detectá-lo. (HERZENBERG et al., 2006).

3.7 Marcação de células dendríticas *in vivo* com CFSE e análise da migração de células CFSE⁺/CD11c⁺ para os linfonodos poplíteos e inguinais após 12, 24 e 72 horas de infecção com conídios de *F. pedrosoi*

Para avaliar a capacidade de migração das células dendríticas para os linfonodos regionais após infecção com conídios de *F. pedrosoi*, uma solução de CFSE foi preparada mediante a diluição do composto a uma concentração de 25 μ M em DMSO. Posteriormente essa solução foi diluída em PBS a uma concentração de 8 μ M. Uma suspensão de 1×10^6 conídios de *F. pedrosoi* foi preparada na solução de CFSE, e injetada s.c no coxim plantar de camundongos BALB/c anestesiados. Após 12, 24 e 72 horas os linfonodos poplíteos e inguinais, bem como as patas, foram retirados e as células purificadas como descrito no item 3.6. Essas células foram marcadas com o anticorpo anti- CD11c-PerCP-Cy5-5, conforme se descreve no item 3.6. Como controle foram utilizados camundongos injetados s.c. com DMSO diluído em PBS, e em solução de 8 μ M de CFSE.

3.8 Determinação de citocinas intracelulares produzidas por linfócitos TCD4⁺ por citometria de fluxo

Os camundongos BALB/c foram infectados s.c. no coxim plantar com 1×10^6 conídios de *F. pedrosoi*. Como controle, foram utilizados animais inoculados com PBS. Após 7 dias de infecção, os animais foram eutanasiados para a retirada dos linfonodos regionais (poplíteos e inguinais), bem como das patas. Como controle positivo, adicionamos em alguns grupos de células obtidas, Concanavalina – A Sigma

(50 µl/mL). Para interromper o processo de liberação das citocinas, acumulando-as no interior do citoplasma, foi adicionada às células, por 12 horas, Brefeldina A (1µl da solução 1000x concentrada em 999 µl de R10 contendo as células).

Depois da incubação, as células foram transferidas para uma placa com fundo em “V” com 96 poços, e mantidas em gelo. Aos poços foram adicionados 30 µl de PBS contendo os anticorpos PE-CD3, APC-CD4, FITC-CD4, e realizada a marcação de superfície, de acordo com a descrição feita no item 3.6. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS 3% SFB, e fixadas com 100 µl da solução de fixação do Kit “Fixation & Permeabilization” (eBioscience Cat. 88-8823-88), durante 15 minutos, em gelo e ambiente escuro. Após a incubação realizou-se a lavagem com PBS e foram adicionados 100µl de solução permeabilizante presente no kit, sempre homogeneizando com auxílio de ponteira. A placa foi centrifugada por 5 minutos a 500G. O sobrenadante foi desprezado e deu-se início à marcação intracelular. A cada poço foram adicionados 30µl de PBS com os anticorpos conjugados aos fluorocromos (FITC-IFN- γ , FITC-IL10, APC-IL4). Após 20 minutos de incubação em gelo e ambiente escuro as células foram lavadas e ressuspensas em 100 µl da solução de fixação, depois foram transferidas para tubos específicos, a fim de ser aplicada a técnica de citometria de Fluxo. A leitura foi realizada em FACs CANTO II e a análise feita em software Flowjo.

4 Análise estatística

A análise estatística aplicada aos resultados foi feita por meio do One-Way ANOVA e de múltiplas comparações pelo teste de Tukey (ZAR, 1984). O nível de significância admitido foi de $p < 0,05$ em todas as amostras obtidas.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação de células CD11c⁺ após infecção com conídios de *F. pedrosoi*

Com o objetivo de estudar o perfil de DCs envolvidas na infecção experimental com *F. pedrosoi*, camundongos BALB/c foram infectados no coxim plantar, via s.c., com 1×10^6 conídios desse fungo. Como controle negativo, os animais receberam PBS estéril pela mesma via de inoculação. Após 12, 24 e 72h de infecção, as células obtidas das patas, bem como dos linfonodos inguinais e poplíteos, foram analisadas com base em moléculas de superfície marcadas com fluorocromos específicos e analisadas por citometria de fluxo (conforme se descreve no item 3.6). Partindo de células FSC^{high} obtidas das patas, verificamos que a porcentagem de células CD11c⁺ diminuiu após 12h de infecção, o grupo controle apresentou 9,25% de células CD11c⁺ e o grupo infectado, 5,92%. Porém, 24h e 72h depois da infecção ocorreu uma diminuição significativa dessas células nas patas; além desse evento, 24h após a infecção foram verificados 10,16% de células CD11c⁺ no grupo controle e 3,99% no grupo infectado. Depois de 72h de infecção, constatamos 8,42% de células CD11c⁺ no grupo controle e 3,54% no grupo infectado (Figura 4). Realizada análise semelhante nas células FSC^{high} obtidas dos linfonodos poplíteos e inguinais, observou-se que a porcentagem de células que expressam CD11c⁺ manteve-se semelhante 12h após a infecção: 0,32% de expressão pelo grupo controle e 0,32% pelo grupo infectado. No período de 24h, a porcentagem dessas células não apresentou alterações relevantes, havendo 0,23% de expressão de células CD11c⁺ no grupo controle e 0,26% no grupo infectado. Entretanto, após 72h de infecção houve um aumento significativo dessas células nos linfonodos: 0,32% de expressão no grupo controle e 0,62% no grupo infectado (Figura 5).

Figura 4: Porcentagem de células CD11c⁺ obtidas após infecção subcutânea com conídios de *F. pedrosoi* (F. p.): Células totais foram obtidas das patas de camundongos BALB/c depois de 12, 24 e 72h de infecção com 1×10^6 conídios de *F. pedrosoi*, contidos em 50μL de PBS. Como controle, foram utilizados animais injetados com 50μL de PBS. Após a leitura por FACS, os dados foram analisados pelo *software Flowjo* e a estratégia de *gating*, descrita nos itens **A** (análise de células FSc^{high} SSc^{high} obtidas das patas), **B** (análise somente das células CD11c⁺ da população High) e **C** (porcentagem de células CD11c⁺ obtidas das patas de camundongos BALB/c). O experimento foi realizado com 2 animais por grupo. $p^* < 0,05$ em relação ao controle.

Figura 5: Porcentagem de células CD11c⁺ obtidas após infecção subcutânea com conídios de *F. pedrosoi* (F. p.): Células totais foram obtidas dos linfonodos poplíteos e inguinais de camundongos BALB/c após 12, 24 e 72h de infecção com 1×10^6 conídios de *F. pedrosoi*, contidos em 50μL de PBS. Como controle, foram utilizados animais injetados com 50μL de PBS. Após a leitura por FACS, os dados foram analisados pelo *software Flowjo* e a estratégia de *gating*, descrita nos itens **A** (análise de células FSc^{high} SSc^{high} obtidas dos linfonodos), **B** (análise somente das células CD11c⁺ da população High) e **C** (porcentagem de células CD11c⁺ obtidas dos linfonodos de camundongos BALB/c). O experimento foi realizado com 2 animais por grupo. $p^* < 0,05$ em relação ao controle.

5.2 Caracterização fenotípica de células CD11c⁺ obtidas das patas após 12, 24 e 72 horas de infecção com conídios de *F. pedrosoi*

Considerando que as características fenotípicas das DCs encontram-se intimamente relacionadas a sua principal atividade funcional, analisamos o perfil das células CD11c⁺ obtidas das patas dos camundongos, através da expressão dos marcadores CD8, DEC205, CCR7, CD80, CD86, CD40, MHC-II e CD103 por essas células, após 12, 24 e 72h de infecção com conídios de *F. pedrosoi*. Foram comparadas as porcentagens de expressões com seus respectivos controles, inoculados com PBS (Figura 6).

A análise da expressão de CD8 pelas células CD11c⁺ obtidas das patas após 12h de infecção demonstrou 17,6% de expressão pelo grupo controle, e um aumento dessa expressão pelo grupo infectado, 26,7%. Depois de 24h, o grupo controle apresentou 23,6% de expressão de CD8, e o grupo infectado apresentou uma queda, 3,1%. Já a expressão dessa molécula pelas células CD11c⁺ após 72h, apresentou 2,95% de expressão pelo grupo controle, e um aumento dessa expressão pelo grupo infectado, sendo 12,7%.

A análise da expressão de DEC205, envolvido na captura e no processamento de antígenos, pelas células CD11c⁺ obtidas das patas, após 12h de infecção, demonstrou 9,96% de expressão pelo grupo controle, e 10,96% pelo grupo infectado. Transcorridas 24h, o grupo controle apresentou 10,96% de expressão e o grupo infectado 11,46%. A análise de DEC205 depois de 72h de infecção mostrou 15,06% de expressão pelo grupo controle, e uma queda dessa expressão pelo grupo infectado 2,75%.

Analisamos a expressão do receptor CCR7 pelas células CD11c⁺, pois ele está envolvido no processo de migração e maturação dessas células. Após 12h de infecção, observamos que o grupo controle apresentou 59,75% de expressão, e o grupo infectado, 60,75%. Decorridas 24h, o grupo controle apresentou 63,25% de expressão e o grupo infectado uma diminuição dessa expressão, 50,05%. Observamos que, passadas 72h, o grupo controle mostrou 51,45% de expressão de CCR7 e o grupo infectado, uma diminuição dessa expressão, 24,85%.

Uma vez que as moléculas co-estimulatórias são importantes na ativação da resposta imune mediada por células T, analisamos também a expressão de CD80, CD86 e CD40.

A expressão de CD80 pelas células CD11c⁺ após 12h de infecção, mostrou 32,9% pelo grupo controle e 43,6% pelo grupo infectado. Após 24h, o grupo controle apresentou 36,7% de expressão e o grupo infectado uma diminuição dessa expressão,

19,3%. Transcorridas 72h, o grupo controle expressou 14,7% da molécula CD80 e o grupo infectado 40,1%, ou seja, um aumento de expressão.

A expressão de CD86 pelas células CD11c⁺ decorridas 12h de infecção mostrou 55,8% pelo grupo controle e 59,7% pelo grupo infectado. Após 24h, o grupo controle apresentou 64,3% de expressão e o grupo infectado, uma diminuição dessa expressão 47,1%. Depois de 72h, verificou-se no grupo controle 51,7% de expressão da molécula CD86, já o grupo infectado diminuiu sua expressão para 9,5%.

A expressão de CD40 pelas células CD11c⁺ após 12h de infecção, apresentou 88,22% de expressão pelo grupo controle e 91,32% pelo grupo infectado. A análise depois de 24h mostrou 92,32% de expressão pelo grupo controle e 90,92% pelo grupo infectado. Passadas 72h, observamos 93,82% de expressão pelo grupo controle e uma diminuição no grupo infectado 60,32%.

Analisamos nas células CD11c⁺ obtidas das patas, a expressão de MHC-II. Decorridas 12h de infecção, o grupo controle apresentou 33,7% de expressão dessa molécula e o grupo infectado, 37,3%. Após 24h, observamos 43,6% de expressão pelo grupo controle e uma diminuição dessa expressão pelo grupo infectado 15,4%. No decurso de 72h, observamos 12,2% de expressão pelo grupo controle e um aumento dessa expressão pelo grupo infectado, 23,8%.

Não observamos, nas células CD11c⁺ obtidas das patas, a expressão de CD103, que também está envolvido na migração das DCs.

Figura 6: Análise fenotípica de células CD11c⁺ obtidas das patas de camundongos BALB/c: Porcentagem de expressão dos marcadores (CD8, DEC205, CCR7, CD80, CD86, CD40 e MHC-II) pelas células CD11c⁺ obtidas das patas de camundongos BALB/c, depois de 12, 24 e 72h de infecção com 1×10^6 conídios de *F. pedrosoi* contidos em 50µL de PBS. Como controle, foram utilizados camundongos injetados com 50µL de PBS.

5.3 Caracterização fenotípica de células CD11c⁺ obtidas dos linfonodos após 12, 24 e 72 horas de infecção com conídios de *F. pedrosoi*

Analizamos o perfil das células CD11c⁺ obtidas dos linfonodos poplíteos e inguinais por meio da expressão dos marcadores CD8, CD103, DEC205, CCR7, CD80, CD86, CD40 e MHC-II por essas células. Esse procedimento foi feito após 12, 24 e 72h de infecção com conídios de *F. pedrosoi*, mediante a comparação das porcentagens de expressões com seus respectivos controles, inoculados com PBS (Figura 7).

A análise da expressão de CD8 pelas células CD11c⁺ obtidas dos linfonodos transcorridas 12h de infecção, demonstrou 0,53% de expressão pelo grupo controle, e 0,41% pelo grupo infectado. Após 24h o grupo controle apresentou 2,5% de expressão dessa molécula e o grupo infectado 2,12%. Já a expressão de CD8 pelas células CD11c⁺ decorridas 72h, mostrou 2,12% de expressão pelo grupo controle e uma diminuição dessa expressão pelo grupo infectado, 0,46%.

A análise da expressão de DEC205 pelas células CD11c⁺ após 12h de infecção demonstrou 10,14% de expressão pelo grupo controle e uma diminuição 5,96% pelo grupo infectado. Após 24h o grupo controle apresentou 5,79% de expressão e o grupo infectado 5,21%. A análise de DEC205 transcorridas 72h de infecção, mostrou 4,19% de expressão pelo grupo controle e 5,37% pelo grupo infectado.

Na análise da expressão do receptor CCR7 pelas células CD11c⁺ obtidas dos linfonodos, após 12h de infecção, observamos que o grupo controle apresentou 31,37% de expressão, e o grupo infectado, 27,07%. Depois de 24h, o grupo controle apresentou 24,57% de expressão e, no grupo infectado, verificou-se um aumento dessa expressão, 34,07%. Observamos que, após 72h, o grupo controle apresentou 25,57% de expressão de CCR7 e o grupo infectado, 27,17%.

Considerando a importância das moléculas co-estimulatórias, analisamos também a expressão de CD80, CD86 e CD40 nessas células.

A expressão de CD80 pelas células CD11c⁺ após 12h de infecção, mostrou 22,17% pelo grupo controle e 28,87% pelo grupo infectado. Após 24h, o grupo controle apresentou 21,07% de expressão, e o grupo infectado apresentou uma diminuição dessa expressão, 18,87%. Passadas 72h, o grupo controle expressou 18,87% da molécula CD80 e o grupo infectado 19,07%.

A expressão de CD86 pelas células CD11c⁺ depois de 12h de infecção, mostrou 27,48% pelo grupo controle e 21,18% pelo grupo infectado. Após 24h, o grupo controle teve 21,08% de expressão e o grupo infectado apresentou um aumento desta expressão, 26,98%. Transcorridas 72h, o grupo controle demonstrou 21,78% de

expressão da molécula CD86 e o grupo infectado diminuiu sua expressão para 13,58%.

A expressão de CD40 pelas células CD11c⁺ no decurso de 12h de infecção, apresentou 51,49% de expressão pelo grupo controle e 46,89% pelo grupo infectado. A análise, após 24h mostrou 52,49% de expressão pelo grupo controle e 49,89% pelo grupo infectado. Depois de 72h, observamos 49,19% de expressão pelo grupo controle e 49,39% pelo grupo infectado.

Na análise da expressão de MHC-II pelas células CD11c⁺ obtidas dos linfonodos, após 12h de infecção, observamos que o grupo controle apresentou 45,9% de expressão desta molécula e o grupo infectado uma diminuição, 34%. Depois de 24h, verificamos 38,2% de expressão pelo grupo controle e um aumento dessa expressão pelo grupo infectado, 41,9%. Passadas 72h houve 41,6% de expressão pelo grupo controle e um aumento pelo grupo infectado 48,2%.

As células CD11c⁺ obtidas dos linfonodos, apresentaram expressão de CD103, molécula envolvida na migração das DCs. Decorridas 12h de infecção, o grupo controle apresentou 28,1% de expressão e o grupo infectado 20,8% uma redução, portanto. Após 24h, observamos 16,7% de expressão pelo grupo controle e aumento pelo grupo infectado, 19,3%. Depois de 72h de infecção, o grupo controle expressou 17,1% de CD103 e o grupo infectado 14,4%.

Figura 7: Análise fenotípica de células CD11c⁺ obtidas dos linfonodos de camundongos BALB/c: Porcentagem de expressão dos marcadores (CD8, CD103, DEC205, CCR7, CD80, CD86, CD40 e MHC-II) pelas células CD11c⁺ obtidas dos linfonodos poplíteos e inguinais de camundongos BALB/c, depois de 12, 24 e 72h de infecção com 1×10^6 conídios de *F. pedrosoi* contidos em 50µL de PBS. Como controle, foram utilizados camundongos injetados com 50µL de PBS.

5.4 Análise de células F4/80⁺ após 12, 24 e 72 horas de infecção com conídios de *F. pedrosoi*

Os macrófagos são fagócitos encontrados nos tecidos que se originam de monócitos circulantes. Desempenham importantes papéis nas respostas imunes inata e adaptativa, bem como na transição entre elas (ABBAS, 2007). Representam uma população celular altamente heterogênea, e tal heterogeneidade está refletida tanto em seus aspectos morfológicos e fenotípicos, como em suas características metabólicas e funcionais. Os macrófagos são caracterizados fenotipicamente pela expressão de altos níveis da cadeia CD11b da integrina Mac-1 e da glicoproteína F4/80 (GORDON, S.; TAYLOR P. R., 2005). Com o objetivo de estudar o perfil dessas células envolvidas na infecção experimental com *F. pedrosoi*, analisamos depois de 12, 24 e 72h de infecção, células obtidas das patas dos animais, bem como de seus linfonodos poplíteos e inguinais, por citometria de fluxo. Partindo de células FSc^{high} obtidas das patas, verificamos que a porcentagem de células F4/80⁺ apresentou diminuição decorridas 12h de infecção, o grupo controle apresentou 8,22% de células F4/80⁺ e o grupo infectado, 8,12%. Porém, 24h após a infecção ocorreu uma diminuição significativa dessas células nas patas, o grupo controle apresentou 9,68% de células F4/80⁺ e o grupo infectado pelo fungo, 4,25%. Além disso, decorridas 72h do processo infeccioso, constatou-se um aumento significativo dessas células nas patas, 5,66% no grupo controle e 10,26% no grupo infectado (Figura 8). Em análise semelhante nas células FSc^{high} obtidas dos linfonodos poplíteos e inguinais, observamos que a porcentagem de células que expressam F4/80⁺ 12h após a infecção foi de 0,28% de expressão no grupo controle e 0,21% no grupo infectado. No período de 24h, a porcentagem dessas células aumentou, 0,12% de expressão de F4/80⁺ no grupo controle e 0,40% no grupo infectado. Passadas 72h de infecção, também houve um aumento dessas células nos linfonodos, 0,25% de expressão no grupo controle e 0,39% no grupo infectado (Figura 9).

Figura 8: Análise de células F4/80⁺ obtidas após infecção s.c. com conídios de *F. pedrosoi* (F. p.): Células totais foram obtidas das patas de camundongos BALB/c depois de 12, 24 e 72h de infecção com 1×10^6 conídios de *F. pedrosoi* contidos em 50 μ L de PBS. Como controle, foram utilizados animais injetados com 50 μ L de PBS. Após a leitura por FACS, os dados foram analisados pelo *software Flowjo* e a estratégia de *gating*, descrita nos itens **A** (análise de células FSc^{high} SSc^{high}), **B** (análise somente das células F4/80⁺ da população High) e **C** (porcentagem de células F4/80⁺ obtidas das patas de camundongos BALB/c). O experimento foi realizado com 2 animais por grupo. $p^* < 0,05$ em relação ao controle.

Figura 9: Análise de células F4/80⁺ obtidas após infecção s.c. com conídios de *F. pedrosoi* (F. p.): Células totais foram obtidas dos linfonodos poplíteos e inguinais de camundongos BALB/c depois de 12, 24 e 72h de infecção com 1×10^6 conídios de *F. pedrosoi* contidos em 50μL de PBS. Como controle, foram utilizados animais injetados com 50μL de PBS. Após a leitura por FACS, os dados foram analisados pelo *software Flowjo* e a estratégia de *gating*, descrita nos itens **A** (análise de células FSc^{high} SSc^{high}), **B** (análise somente de células F4/80⁺ da população High) e **C** (porcentagem de células F4/80⁺ obtidas dos linfonodos de camundongos BALB/c). O experimento foi realizado com 2 animais por grupo. $p^* < 0,05$ em relação ao controle.

5.5 Análise de células Ly6G⁺ após 12, 24 e 72 horas de infecção com conídios de *F. pedrosoi*

Os neutrófilos representam células do sistema imune inato, que desempenham papel chave na defesa contra a invasão de patógenos. São rapidamente recrutados para os locais de inflamação ou infecção, onde podem destruir bactérias e fungos por intermédio de diversos mecanismos, entre os quais a fagocitose direta e a liberação de enzimas e espécies reativas de oxigênio (LI et al., 2012). Essas células podem ser identificadas por meio da alta expressão do marcador Ly6G (ROSE SHAWN et al., 2012), juntamente com a expressão da integrina CD11b, que exerce função importante para as etapas de captura e adesão dos neutrófilos (LI et al., 2012).

Com o objetivo de estudar o perfil dessas células envolvidas na infecção experimental com *F. pedrosoi*, estudamos, após 12, 24 e 72h de infecção, células obtidas das patas, bem como dos linfonodos poplíteos e inguinais de camundongos BALB/c, por citometria de fluxo. A partir de células FSc^{high} obtidas das patas, verificamos que houve aumento significativo na expressão de Ly6G⁺ nos grupos infectados com conídios do fungo em todos os períodos de infecção quando comparados aos seus controles. Decorridas 12h o grupo infectado apresentou 46,67% de expressão e o grupo controle 10,52%; depois de 24h, o grupo infectado apresentou 68,92% de expressão e o grupo controle 9,37%. Transcorridas 72h de infecção, constatamos 66,22% de expressão de Ly6G⁺ pelo grupo infectado e 10,52% pelo grupo controle (Figura 10). Realizada análise similar nas células FSc^{high} obtidas dos linfonodos poplíteos e inguinais, observou-se que a porcentagem de células que expressam Ly6G⁺ 12h após a infecção, não apresentou alterações significativas: 2,25% no grupo infectado e 2,28% no grupo controle. No período de 24h, no entanto, a porcentagem dessas células aumentou de forma significativa: 3,28% no grupo infectado e 0,97% no grupo controle. Já 72h após o início do processo infeccioso, houve uma diminuição na expressão de Ly6G⁺ pelo grupo infectado, 1,35% e pelo grupo controle 1,84% (Figura 11).

Figura 10: Análise de células Ly6G⁺ / CD11b⁺ obtidas após infecção s.c. com conídios de *F. pedrosoi* (F. p.): Células totais foram obtidas das patas de camundongos BALB/c depois de 12, 24 e 72h de infecção com 1×10^6 conídios de *F. pedrosoi* contidos em 50 μ L de PBS. Como controle, foram utilizados animais injetados com 50 μ L de PBS. Após a leitura por FACS, os dados foram analisados pelo *software Flowjo* e a estratégia de *gating*, descrita nos itens **A** (análise de células FSc^{high} SSc^{high}), **B** (análise somente das células Ly6G⁺ da população High), **C** (análise da expressão de CD11b pelas células Ly6G⁺) e **D** (porcentagem de células Ly6G⁺ obtidas das patas de camundongos BALB/c). O experimento foi realizado com 3 animais por grupo. p* < 0,05 em relação ao controle.

Figura 11: Análise de células Ly6G⁺ / CD11b⁺ obtidas após infecção s.c. com conídios de *F. pedrosoi* (F. p.): Células totais foram obtidas dos linfonodos poplíteos e inguinais de camundongos BALB/c depois de 12, 24 e 72h de infecção com 1×10^6 conídios de *F. pedrosoi* contidos em 50μL de PBS. Como controle, foram utilizados animais injetados com 50μL de PBS. Após a leitura por FACS, os dados foram analisados pelo software *Flowjo* e a estratégia de *gating*, descrita nos itens **A** (análise de células FSc^{high} SSc^{high}), **B** (análise somente das células Ly6G⁺ da população High), **C** (análise da expressão de CD11b pelas células Ly6G⁺) e **D** (porcentagem de células Ly6G⁺ obtidas dos linfonodos de camundongos BALB/c). O experimento foi realizado com 3 animais por grupo. p* < 0,05 em relação ao controle.

5.6 Análise de linfócitos B após 12, 24 e 72 horas de infecção com conídios de *F. pedrosoi*

O desenvolvimento da resposta imune a antígenos pode depender da interação entre células B e células T. Assim como as células apresentadoras profissionais de antígenos macrófagos e células dendríticas, os linfócitos B maduros também desempenham papel crucial na imunidade como células apresentadoras de antígenos, essas células podem ativar linfócitos T CD4 efetores e, ampliar as respostas por células T, manifestando assim o seu potencial patogênico (YU et al., 2006).

Considerando o papel dos linfócitos B no sistema imune, observamos o perfil dessas células envolvidas na infecção experimental com *F. Pedrosoi*. Após 12, 24 e 72h de infecção, células obtidas das patas bem como dos linfonodos poplíteos e inguinais foram analisadas por citometria de fluxo. Partindo de células FSc^{Low} obtidas das patas, verificamos que houve diminuição significativa na expressão de células CD45R/B220⁺ nos grupos infectados com conídios do fungo em todos os períodos de infecção, quando comparados aos seus controles. Decorridas 12h, o grupo infectado apresentou 4,73% de expressão e o grupo controle 20,65%; depois de 24h o grupo infectado mostrou 2,81% de expressão e o grupo controle 17,15%; e transcorridas 72h de processo infeccioso, constatamos 5,95% de expressão de CD45R/B220⁺ pelo grupo infectado e 21,5% pelo grupo controle (Figura 12). Em análise similar nas células FSc^{Low} obtidas dos linfonodos poplíteos e inguinais, verificamos que a porcentagem de células que expressam CD45R/B220⁺ 12h após a infecção, apresentou aumento significativo no grupo infectado 25,50%, em relação ao seu controle 15,9%. No período de 24h a porcentagem dessas células diminuiu de expressão no grupo infectado, 14,45% e no grupo controle 20,45%. Após 72h de infecção, houve aumento significativo na expressão dessas células pelo grupo infectado, 23,45% e pelo grupo controle 15,8% (Figura 13).

Figura 12: Análise de células CD45R⁺/B220⁺/CD19⁺ obtidas após infecção s.c. com conídios de *F. pedrosoi* (F. p.): Células totais foram obtidas das patas de camundongos BALB/c depois de 12, 24 e 72h de infecção com 1×10^6 conídios de *F. pedrosoi* contidos em 50μL de PBS. Como controle, foram utilizados animais injetados com 50μL de PBS. Após a leitura por FACS, os dados foram analisados pelo software *Flowjo* e a estratégia de *gating*, descrita nos itens **A** (análise de células FSc^{low} SSc^{low}), **B** (análise somente das células CD45R/B220⁺ da população Low), **C** (análise da expressão de CD19 pelas células CD45R/B220⁺) e **D** (porcentagem de células CD45R/B220⁺ obtidas das patas de camundongos BALB/c). O experimento foi realizado com 3 animais por grupo. p* < 0,05 em relação ao controle.

Figura 13: Análise de células CD45R⁺/B220⁺/CD19⁺ obtidas após infecção s.c. com conídios de *F. pedrosoi* (F. p.): Células totais foram obtidas dos linfonodos poplíteos e inguinais de camundongos BALB/c depois de 12, 24 e 72h de infecção com 1×10^6 conídios de *F. pedrosoi* contidos em 50μL de PBS. Como controle, foram utilizados animais injetados com 50μL de PBS. Após a leitura por FACS, os dados foram analisados pelo *software Flowjo* e a estratégia de *gating*, descrita nos itens **A** (análise de células FSc^{low} SSc^{low}), **B** (análise somente das células CD45R/B220⁺ da população Low), **C** (análise da expressão de CD19 pelas células CD45R/B220⁺) e **D** (porcentagem de células CD45R/B220⁺ obtidas dos linfonodos de camundongos BALB/c). O experimento foi realizado com 3 animais por grupo. p* < 0,05 em relação ao controle.

5.7 Análise de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ após 12, 24 e 72 horas de infecção com conídios de *F. pedrosoi*

As ações locais e sistêmicas de linfócitos podem ter diferentes características na cromoblastomicose. A infecção por *F. pedrosoi* em camundongos atímicos com maior suscetibilidade, regrediu após a transferência adaptativa de linfócitos, demonstrando assim a importância dessas células no controle de fungos (AHRENS et al., 1989).

Considerando o papel dos linfócitos T CD4 e T CD8 no sistema imune, observamos o perfil dessas células envolvidas na infecção experimental com *F. pedrosoi*. Transcorridas 12, 24 e 72h de infecção, células obtidas das patas, bem como dos linfonodos poplíteos e inguinais, foram analisadas por citometria de fluxo. Partindo de células FSc^{Low} obtidas das patas, verificamos que houve diminuição na porcentagem de células T CD8⁺ nos grupos infectados com conídios do fungo em todos os períodos de infecção, quando comparados aos seus controles. Já a porcentagem de células T CD4⁺ aumentou nos grupos infectados, quando comparados aos seus controles, 12 e 24h após a infecção. Decorridas 72h de infecção, não houve alteração na porcentagem dessas células no grupo infectado e no seu controle (Figura 14). Por análise semelhante das células FSc^{Low} obtidas dos linfonodos poplíteos e inguinais, observamos que a porcentagem de células T CD8⁺ 12 e 24h após a infecção, diminuiu no grupo infectado, em relação ao seu controle, entretanto, essa porcentagem depois de 72h aumentou no grupo infectado. Quanto às células T CD4⁺, no decurso de 12 e 24h de infecção com conídios do fungo, ocorreu um aumento na porcentagem em relação ao controle; porém, 72h após a infecção, não houve alterações na porcentagem dessas células entre o grupo infectado e seu controle (Figura 15).

Patas

Figura 14: Análise de células TCD4⁺/ TCD8⁺ obtidas 12, 24 e 72 horas após infecção s.c. com conídios de *F. pedrosoi* (F. p.): Células totais foram obtidas das patas de camundongos BALB/c depois de 12, 24 e 72h de infecção com 1×10^5 conídios de *F. pedrosoi* contidos em 50 μ L de PBS. Como controle, foram utilizados animais injetados com 50 μ L de PBS. Após a leitura por FACS, os dados foram analisados pelo software *Flowjo* e a estratégia de *gating*, descrita nos itens **A** (análise de células FSC^{low} SSC^{low}), **B** (análise de células CD3⁺ da população Low) e **C** (análise da expressão de CD4 e CD8 pelas células CD3⁺). O experimento foi realizado com 3 animais por grupo.

LNs

Figura 15: Análise de células TCD4⁺ TCD8⁺ obtidas 12, 24 e 72 horas após infecção s.c. com conídios de *F. pedrosoi* (F. p.): Células totais foram obtidas de linfonodos poplíteos e inguinais de camundongos BALB/c depois de 12, 24 e 72h de infecção com 1×10^6 conídios de *F. pedrosoi* contidos em 50 μ L de PBS. Como controle, foram utilizados animais injetados com 50 μ L de PBS. Após a leitura por FACS, os dados foram analisados pelo software *Flowjo* e a estratégia de *gating*, descrita nos itens **A** (análise de células FSC^{low} SSC^{low}), **B** (análise de células CD3⁺ da população Low) e **C** (análise da expressão de CD4 e CD8 pelas células CD3⁺). O experimento foi realizado com 3 animais por grupo.

5.8 Análise da capacidade migratória de células CFSE⁺/CD11c⁺ para os linfonodos poplíteos e inguinais após 12, 24 e 72 horas de infecção com conídios de *F. pedrosoi*

Com a finalidade de avaliar a capacidade das DCs de migrar até os órgãos linfóides secundários (linfonodos inguinais e poplíteos), bem como de, avaliar a maturação dessas células, camundongos BALB/c foram infectados no coxim plantar, via s.c. com 1×10^6 conídios de *F. pedrosoi*, juntamente com CFSE; como controle negativo, os animais receberam DMSO / PBS estéril pela mesma via de inoculação. Decorridas 12, 24 e 72h de infecção, os linfonodos poplíteos e inguinais bem como as patas, foram retirados e as células obtidas foram marcadas com fluorocromos específicos e analisadas por citometria de fluxo (como descrito no item 3.7).

A partir de células FSC^{high} obtidas das patas, verificamos que a porcentagem de células CFSE⁺/CD11c⁺ diminuiu significativamente após 12h no grupo infectado, 58,17% de expressão e no grupo controle 81,57%. Depois de 24h, o grupo infectado apresentou 79,16% de expressão e o grupo controle, 66,81%. Transcorridas 72h, ocorreu uma diminuição significativa de expressão dessas células no grupo infectado 56,10% e no grupo controle 79,05% (Figura 16). Por intermédio de análise semelhante nas células FSC^{high} obtidas dos linfonodos poplíteos e inguinais, constatamos que a porcentagem de células CFSE⁺/CD11c⁺ aumentou significativamente no grupo infectado 12h após a infecção, apresentando 3,22% de expressão; e o grupo controle apresentou 0,36%. No período de 24h após a infecção, não verificamos expressão de células CFSE⁺/CD11c⁺ pelo grupo infectado, mas o grupo controle mostrou 0,27% de expressão. No entanto, transcorridas 72h de processo infeccioso, houve novamente aumento significativo de CFSE⁺/CD11c⁺ nos linfonodos; o grupo infectado apresentou 1,58% de expressão, e o grupo controle 0,33% (Figura 17).

Para avaliar a maturação das células em questão após migração até os linfonodos regionais, observamos a expressão de MHC-II e da molécula co-estimulatória CD86 pelas células CFSE⁺/CD11c⁺. Foi possível verificar um aumento na expressão de MHC-II pelo grupo infectado, em 12h 77,8%, e que o grupo controle apresentou 25% de expressão. Após 24h de infecção, não foi possível realizar uma comparação, pois não houve expressão de células CFSE⁺/CD11c⁺ pelo grupo infectado.

Já depois de 72h de infecção, verificamos aumento na expressão de MHC-II pelo grupo infectado, 63,8% e pelo grupo controle 48,1%. Constatamos também que o grupo infectado, após 12h, apresentou 32,2% de expressão de CD86, mas não se

observou expressão dessa molécula pelo grupo controle. Após 72h, o grupo infectado apresentou 54,8% de expressão de CD86, e o grupo controle 55,6% (Figura 18).

Figura 16: Migração de células CFSE⁺/CD11⁺ das patas para linfonodos regionais após infecção s.c. com conídios de *F. pedrosoi*. (A) Células totais foram obtidas das patas de camundongos BALB/c depois de 12, 24 e 72h de infecção com 1×10^6 conídios de *F. pedrosoi* contidos em 50 μ l de uma suspensão de 8 μ M de CFSE em PBS. Como controle, foram utilizados animais injetados com 50 μ l de uma suspensão de 8 μ M de CFSE em PBS e animais injetados apenas com 50 μ l de PBS. Após a leitura por FACS, os dados foram analisados pelo software *Flowjo* e a estratégia de *gating* descrita nos itens B (demonstra a análise de células FSC^{high} SSC^{high} obtidas das patas após 12h de inoculação com PBS, CFSE ou CFSE com fungo), C (análise de células da população High após 12h de inoculação com PBS, CFSE ou CFSE com fungo) e D (análise somente das células CD11c⁺ da população High após 12h de inoculação com PBS, CFSE ou CFSE com fungo). O experimento foi realizado com 2 animais por grupo, e foi utilizada a mesma estratégia de análise em todos os períodos de infecção. $p^* < 0,05$ em relação ao controle.

Figura 17: Migração de células CFSE⁺/CD11⁺ das patas para linfonodos regionais após infecção s.c. com conídios de *F. pedrosoi*. (A) Células totais foram obtidas dos LN regionais de camundongos BALB/c depois de 12, 24 e 72h de infecção com 1×10^6 conídios de *F. pedrosoi* contidos em 50 μ l de uma suspensão de 8 μ M de CFSE em PBS. Como controle, foram utilizados animais injetados com 50 μ l de uma suspensão de 8 μ M de CFSE em PBS e animais injetados apenas com 50 μ l de PBS. Após a leitura por FACS, os dados foram analisados pelo *software Flowjo* e a estratégia de *gating* descrita nos itens **B** (demonstra a análise de células FSC^{high} SSC^{high} obtidas dos LN após 12h de inoculação com PBS, CFSE ou CFSE com fungo), **C** (análise de células da população High após 12h de inoculação com PBS, CFSE ou CFSE com fungo) e **D** (análise somente das células CD11c⁺ da população High após 12h de inoculação com PBS, CFSE ou CFSE com fungo). O experimento foi realizado com 2 animais por grupo, e foi utilizada a mesma estratégia de análise em todos os períodos de infecção. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Linfonodos regionais

Figura 18: Análise da expressão de CD86⁺ e MHC-II⁺ por células CFSE⁺/CD11⁺ obtidas de linfonodos regionais após 12 horas de infecção s.c. com conídios de *F. pedrosoi*. Análise da expressão dos marcadores CD86 e MHC-II pelas células CFSE⁺/CD11⁺ obtidas dos linfonodos poplíteos e inguinais de camundongos BALB/c, depois de 12h de infecção com 1×10^6 conídios de *F. pedrosoi* contidos em 50 μ l de uma suspensão de 8 μ M de CFSE em PBS. Como controle, foram utilizados animais injetados com 50 μ l de uma suspensão de 8 μ M de CFSE em PBS. O experimento foi realizado com 2 animais por grupo, e utilizou-se a mesma estratégia de análise em todos os períodos de infecção.

5.9 Perfil de citocinas expressas por linfócitos TCD4⁺ obtidos das patas de camundongos infectados com conídios de *F. pedrosoi* por 7 dias

Para a detecção de citocinas intracelulares após maior período de infecção, os camundongos BALB/c foram submetidos à eutanásia depois de 7 dias de infecção com conídios de *F. pedrosoi*. Como controle negativo foi utilizado animais inoculados com PBS, e como método de controle positivo foi adicionado Concanavalina – A.

A partir de células FSc^{low} obtidas das patas, verificamos que a porcentagem de linfócitos T CD4⁺ diminuiu no grupo inoculado com o fungo, apresentando 5,09% de células, já o grupo controle inoculado com PBS, mostrou 7,58% de células. Nos grupos nos quais foi adicionada Concanavalina – A, encontramos resultados semelhantes, porém, no grupo inoculado com o fungo houve diminuição significativa de linfócitos T CD4⁺ 5,22%, e no grupo inoculado com PBS, observou-se 8,59% dessas células (Figura 19).

A partir das células T CD4⁺ obtidas das patas, verificamos a produção das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10. Foi possível observar que a porcentagem de expressão de IFN- γ diminuiu no grupo inoculado com o fungo, 1,24% e que o grupo inoculado com PBS apresentou 16,41% de expressão. Resultados semelhantes foram observados nos grupos em que foi adicionada a Concanavalina – A, o grupo inoculado com o fungo mostrou diminuição significativa na expressão de IFN- γ 0,47%, enquanto o grupo inoculado com PBS apresentou 19,61% de expressão dessa citocina (Figura 20).

A expressão de IL-4 diminuiu significativamente no grupo inoculado com o fungo, 12,45% e o grupo inoculado com PBS apresentou 36,05% de expressão dessa citocina. Verificamos resultados similares nos grupos nos quais se adicionou Concanavalina – A, o grupo inoculado com o fungo apresentou 14,95% de expressão, enquanto o grupo inoculado com PBS apresentou 42,7% de expressão da citocina (Figura 21).

Analizamos também nas células T CD4⁺ obtidas das patas a expressão de IL-10 e, verificamos que essas células apresentaram diminuição significativa na expressão dessa citocina no grupo inoculado com o fungo, 1,36%, enquanto que o grupo inoculado com PBS demonstrou 12,95%. Novamente verificamos resultados semelhantes nos grupos em que se acrescentou Concanavalina – A, o grupo inoculado com o fungo apresentou 1,16% de expressão e o grupo inoculado com PBS, 12,55% (Figura 22).

Figura 19: Porcentagem de células T CD4⁺ obtidas das patas após 7 dias de infecção s.c. com conídios de *F. pedrosoi*. Análise da expressão de CD4⁺ por células CD3⁺ obtidas das patas de camundongos BALB/c depois de 7 dias de infecção com conídios de *F. pedrosoi* contidos em 50µL de PBS. Como controle, foram utilizados animais injetados com 50µL de PBS. Para controle positivo adicionou-se Concanavalina – A a alguns grupos de células obtidas. Após a leitura por FACS, os dados foram analisados pelo *software Flowjo*. O experimento foi realizado com 4 animais por grupo. p* <0,05 em relação ao controle.

Figura 20: Porcentagem de expressão de IFN- γ por células T CD4⁺ obtidas das patas após 7 dias de infecção s.c. com conídios de *F. pedrosoi*. Análise da expressão de IFN- γ por células T CD4⁺ obtidas das patas de camundongos BALB/c depois de 7 dias de infecção com conídios de *F. pedrosoi* contidos em 50µL de PBS. Como controle, foram utilizados animais injetados com 50µL de PBS. Para controle positivo adicionou-se Concanavalina – A a alguns grupos de células obtidas. Após a leitura por FACS, os dados foram analisados pelo *software Flowjo*. O experimento foi realizado com 4 animais por grupo. p* <0,05 em relação ao controle.

Figura 21: Porcentagem de expressão de IL-4 por células T CD4⁺ obtidas das patas após 7 dias de infecção s.c. com conídios de *F. pedrosoi*. Análise da expressão de IL-4 por células T CD4⁺ obtidas das patas de camundongos BALB/c depois de 7 dias de infecção com conídios de *F. pedrosoi* contidos em 50µL de PBS. Como controle, foram utilizados animais injetados com 50µL de PBS. Para controle positivo adicionou-se Concanavalina – A a alguns grupos de células obtidas. Após a leitura por FACS, os dados foram analisados pelo *software Flowjo*. O experimento foi realizado com 4 animais por grupo. $p^* < 0,05$ em relação ao controle.

Figura 22: Porcentagem de expressão de IL-10 por células T CD4⁺ obtidas das patas após 7 dias de infecção s.c. com conídios de *F. pedrosoi*. Análise da expressão de IL-10 por células T CD4⁺ obtidas das patas de camundongos BALB/c depois de 7 dias de infecção com conídios de *F. pedrosoi* contidos em 50µL de PBS. Como controle, foram utilizados animais injetados com 50µL de PBS. Para controle positivo adicionou-se Concanavalina – A a alguns grupos de células obtidas. Após a leitura por FACS, os dados foram analisados pelo *software Flowjo*. O experimento foi realizado com 4 animais por grupo. $p^* < 0,05$ em relação ao controle.

5.10 Perfil de citocinas expressas por linfócitos TCD4⁺ obtidos dos linfonodos poplíteos e inguinais de camundongos infectados com conídios de *F. pedrosoi* por 7 dias

Para a detecção de citocinas intracelulares após um período maior de infecção, os camundongos BALB/c foram submetidos à eutanásia após 7 dias de infecção com conídios de *F. pedrosoi*. Como controle negativo foi utilizado animais inoculados com PBS, e para controle positivo adicionou-se Concanavalina – A.

A partir de células FSc^{low} obtidas dos linfonodos poplíteos e inguinais, verificamos que a porcentagem de linfócitos T CD4⁺ diminuiu significativamente no grupo infectado com o fungo, 59,01%, comparados ao controle inoculados com PBS 67,72% de linfócitos T CD4⁺. No grupo em que se acrescentou Concanavalina – A, encontramos resultados semelhantes, o grupo inoculado com o fungo apresentou 62,71% de linfócitos T CD4⁺, e o grupo inoculado com PBS, 67,81% dessas células (Figura 23).

Mediante a análise das células T CD4⁺ obtidas dos linfonodos regionais, observamos a produção de IFN- γ . Não detectamos a produção dessa citocina no grupo inoculado com o fungo, mas o grupo inoculado com PBS apresentou 0,44% de expressão. Nos grupos que receberam Concanavalina – A, constatamos diminuição significativa na expressão de IFN- γ , o grupo inoculado com o fungo apresentou 0,02% de expressão, e o grupo inoculado com PBS 0,65% (Figura 24). A produção de IL-4 e IL-10 não foram detectadas em nosso ensaio (dados não mostrados).

Figura 23: Porcentagem de células T CD4⁺ obtidas dos linfonodos após 7 dias de infecção s.c. com conídios de *F. pedrosoi*. Análise da expressão de CD4⁺ por células CD3⁺ obtidas dos linfonodos poplíteos e inguinais de camundongos BALB/c depois de 7 dias de infecção com conídios de *F. pedrosoi* contidos em 50µL de PBS. Como controle, foram utilizados animais injetados com 50µL de PBS. Para controle positivo adicionou-se Concanavalina – A a alguns grupos de células obtidas. Após a leitura por FACS, os dados foram analisados pelo *software Flowjo*. O experimento foi realizado com 4 animais por grupo. p* <0,05 em relação ao controle.

Figura 24: Porcentagem de expressão de IFN- γ por células T CD4⁺ obtidas dos linfonodos após 7 dias de infecção s.c. com conídios de *F. pedrosoi*. Análise da expressão de IFN- γ por células T CD4⁺ obtidas dos linfonodos poplíteos e inguinais de camundongos BALB/c depois de 7 dias de infecção com conídios de *F. pedrosoi* contidos em 50µL de PBS. Como controle, foram utilizados animais injetados com 50µL de PBS. Para controle positivo adicionou-se Concanavalina – A a alguns grupos de células obtidas. Após a leitura por FACS, os dados foram analisados pelo *software Flowjo*. O experimento foi realizado com 4 animais por grupo. p* <0,05 em relação ao controle.

6 DISCUSSÃO

A função mais explorada das DCs, ao longo dos anos, e apoiada amplamente por um número cada vez mais crescente de pesquisas, é certamente o seu papel como célula apresentadora de antígeno (APC) para os linfócitos T (STEINMAN et al., 2003). As DCs podem ser subdivididas em diferentes subpopulações, que possuem como característica fenotípica comum a expressão da molécula CD11c. As DCs caracterizadas pela alta expressão de CD11c são denominadas “células dendríticas convencionais” (cDC) e, subdividem-se em células CD8 positivas e CD8 negativas, sendo que as células CD8 negativas expressam a molécula CD11b (SHORTMAN; LIU, 2002; SHORTMAN; NAIK, 2007). Estudos têm demonstrado que CD11c é um alvo extremamente efetivo na geração de resposta por anticorpos *in vivo*. Devido ao seu padrão de expressão, CD11c pode fornecer um alvo eficaz para a entrega de antígenos a DCs para a geração de imunidade mediada por linfócitos TCD4 e CD8.

Pela análise das células CD11c⁺ obtidas das patas dos animais submetidos ao experimento, observamos que essas células diminuíram gradativamente em todos os períodos de infecção. Essa diminuição foi significativa após 24 e 72 horas de infecção. Observamos, contudo, que nos linfonodos após 12 e 24 horas de infecção não houve alterações na porcentagem dessas células, as quais, no entanto, aumentaram de maneira significativa após 72 horas.

As DCs estão presentes em praticamente todos os tecidos, permitindo contato com diversos antígenos. Após esse contato, migram para as zonas de células T. Com a finalidade de verificar as mudanças fenotípicas dessas células depois do contato com conídios de *F. pedrosoi*, analisamos a expressão de moléculas envolvidas na captura, na fagocitose, na migração e na maturação de tais células, após 12, 24 e 72 horas de infecção.

Segundo Xie et al. (2005), as células diferenciadas podem ser caracterizadas fenotipicamente, por meio de marcadores de membranas, e é possível considerar DCs as que se mostrarem positivas para alguns marcadores, como CD11c, CD205 e CD209, entre outros. A internalização de micro-organismos pelas DCs ocorre por diferentes receptores (POLLARD; LIPSCOMB, 1990; COEHAND et al., 1999; VERMAELEN et al., 2001), e é sabido que, dependendo do receptor envolvido no processo de fagocitose, pode-se determinar o tipo de resposta imune (Th1/Th2) (BROWN, 2003). O receptor DEC205, também conhecido como CD205, foi identificado pela primeira vez em camundongos e é responsável pela captação e pelo processamento de antígenos (JIANG et al., 1995). Esse receptor é expresso em DCs imaturas, e sua expressão aumenta com a maturação da célula (VERMAELEN et al.,

2001). Observamos ainda, neste trabalho, que as células dos linfonodos apresentaram diminuição na expressão de DEC205 quando comparadas a seu controle, após 12 e 24 horas de infecção, havendo um aumento dessa expressão após 72 horas, o que sugere um perfil de maturação das DCs que chegaram até os linfonodos nesse período, considerando que sua expressão aumenta com a maturação dessas células. Nas células obtidas das patas, verificamos uma maior expressão dessa molécula após 12 e 24 horas de infecção, provavelmente porque DEC205 está envolvido na captura do antígeno.

Na ausência de sinais inflamatórios ou de infecção, as DCs possuem um fenótipo caracterizado pela baixa expressão de moléculas MHC-II e de moléculas co-estimuladoras. Quando sinais inflamatórios estão presentes ou as DCs são expostas a componentes derivados de patógenos, seu fenótipo sofre uma alteração significativa, com aumento da expressão de MHC-II e de moléculas co-estimuladoras (GUERMONPREZ et al., 2002).

As células CD11c⁺ obtidas das patas, apresentaram baixa expressão de MHC-II, após 24 horas de infecção. Vimos, porém, que a expressão dessa molécula nas células dos linfonodos aumentou após 24 e 72 horas de infecção. A ativação das DCs pode ocorrer quando são expostas a componentes derivados de patógenos, mas, o aumento na expressão de MHC-II também pode estar relacionado com a perda na capacidade fagocítica. Nesse estágio, as DCs atingem a maturidade, pois, segundo Banchereau e Steinman (1998) e Guernonprez et al. (2002), DCs imaturas apresentam baixa expressão de moléculas co-estimuladoras e moléculas MHC de classe I e II, nessa etapa, porém, possuem grande capacidade fagocítica. Durante a maturação, as DCs perdem sua capacidade de capturar e processar o antígeno, aumentando a expressão de moléculas de classe II e tornando-se eficientes células ativadoras de linfócitos T (LANZAVECCHIA; SALLUSTO, 1994; BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; GUERMONPREZ et al., 2002).

Analisamos também, nas células CD11c⁺ das patas e dos linfonodos, a expressão de CCR7 e de CD103, as quais são moléculas requeridas para a migração e a maturação de DCs. Nas células obtidas das patas não observamos a expressão de CD103, e a expressão de CCR7 mostrou uma diminuição gradativa com o aumento do tempo de infecção. Já nos linfonodos a expressão de CD103 mostrou-se aumentada apenas depois de 24 horas de infecção, diminuindo nos demais períodos de tempo. Além disso, a expressão de CCR7 elevou-se somente 24 horas após a infecção, diminuindo após esse período. Durante o processo de migração, a expressão do receptor de quimiocina CCR7 é aumentada nas DCs e estas adquirem capacidade de responder ao CCL21 e ao CCL19 (MIP-3 β), entre outros receptores de quimiocinas

linfóides (LIPSCOMB; MASTEN, 2002). Essas quimiocinas são produzidas pelas células T dos órgãos linfóides e também pelas DCs residentes nesses órgãos. Assim, as DCs ativadas passam a migrar através da corrente linfática para os linfonodos proximais e entram na área paracortical, onde entram em contato com as células T (WALLET, SEN et al., 2005). Como as DCs de camundongos *knockout* para o receptor CCR7 não conseguem migrar para os linfonodos, a interação entre o citado receptor e seus ligantes parece ser essencial ao funcionamento adequado do processo de migração das DCs periféricas para os linfonodos (FORSTER, SCHUBEL et al., 1999).

A diminuição na expressão do receptor CCR7 nas células obtidas das patas 24 e 72 horas após o processo infeccioso, a ausência da expressão de CD103 em todos os períodos de infecção, juntamente com a diminuição na expressão das moléculas co-estimulatórias CD40 e CD86, nos levam a sugerir que o fungo *F. pedrosoi* não teve a capacidade de estimular as DCs nas patas, modulando a expressão dessas moléculas importantes para a ativação das DCs. Tal fato sugere que o fungo possa estar inibindo algumas das funções importantes e fundamentais exercidas por estas células.

Foi possível observar que, transcorridas 72 horas de infecção, além do aumento significativo das células CD11c⁺ nos linfonodos, essas células também apresentaram um aumento na expressão de MHC-II quando comparadas às de seu controle, o que poderia indicar a maturação destas células. Nesse mesmo período, no entanto, não observamos nenhum aumento na expressão das moléculas co-estimulatórias CD40, CD80 e CD86, que são moléculas importantes para a ativação das células T e para a indução da resposta imune adaptativa.

Como, por meio do processo de imunofenotipagem, podemos analisar também DCs que possam ter chegado aos linfonodos migradas de outros locais, para compreender melhor o processo em estudo, marcamos as células *in vivo* com CFSE. Desse modo, pôde-se verificar qual a porcentagem de DCs que realmente saem das patas e conseguem migrar até os linfonodos. Foi possível observar que, após 12 e 72 horas de infecção com o fungo, essas células diminuem de forma significativa nas patas, e aumentam de forma significativa nos mesmos períodos de infecção nos linfonodos. Tal aumento é maior transcorridas 12 horas de infecção. Constatamos também, que nos períodos nos quais ocorre aumento significativo das células CFSE⁺/CD11c⁺ nos linfonodos regionais, há também aumento na expressão de MHC-II. Em 12 horas de infecção, observa-se também aumento na expressão da molécula CD86, o que sugere que essas células apresentam fenótipo de células maduras, podendo levar à ativação das células T.

Os resultados que relatamos, nos leva a sugerir que, apesar de observamos uma diminuição da expressão de alguns marcadores como o CCR7, induzidos pelo fungo nas patas (conforme visto na primeira etapa deste trabalho), as DCs foram capazes de migrar para os linfonodos, portanto, o fungo *F. pedrosoi* foi capaz de ativar a migração das DCs do local da infecção para os linfonodos, onde essas células podem interagir com células T. Visto que, as DCs são muito importantes na ativação destas células, a compreensão dos eventos envolvidos em sua migração, torna-se fundamental, pois, falhas na migração dessas células podem interferir no desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa protetora, o que pode constituir um dos fatores que levam à cronicidade desta doença aqui enfocada.

Os macrófagos são populações heterogêneas de células residentes em diversos tecidos, nos quais iniciam a resposta imune por meio do reconhecimento de padrões moleculares de patógenos. Essas células são essenciais para o funcionamento do sistema imune. Dentre suas funções, destacam-se a fagocitose e a destruição de micro-organismos, a apresentação de antígenos para linfócitos T, a remoção de células apoptóticas, a resolução de processos inflamatórios, a angiogênese, reparo e remodelamento tissular (LEIBOVICH et al., 1975; POLVERINI et al., 1977; WERB; GORDON, 1975). Considerando a importância de tais células na defesa do hospedeiro, analisamos, após 12, 24 e 72 horas de infecção com conídios de *F. pedrosoi*, a presença de macrófagos nas células obtidas das patas e dos linfonodos dos camundongos. Os macrófagos foram caracterizados pela expressão da molécula F4/80, e por apresentarem as expressões de CD11b^{High} e CD11c^{Low}. Nas patas, a análise dessas moléculas apresentou uma diminuição significativa após 24 horas, e um aumento significativo após 72 horas de infecção. Tal aumento, nesse período, indica o recrutamento dessas células até o local da infecção para auxiliar no controle da mesma. Não vimos, portanto, nenhuma alteração significativa destas células nos linfonodos.

Os neutrófilos são essenciais para a resistência a infecções fúngicas, mas sua capacidade e o mecanismo empregado para eliminar organismos extracelulares não estão totalmente caracterizados. A migração de neutrófilos para o local de inoculação de conídios de *F. pedrosoi*, pode estar ligada à resistência à infecção (NISHIMURA et al., 1981).

Alguns trabalhos realizados em sistemas *in vitro*, demonstraram que os neutrófilos e as DCs podem interagir diretamente, resultando em maturação destas últimas. No entanto, essa questão não tem sido enfocada no contexto de infecções *in vivo* (MEGIOVANNI et al., 2006).

Foi possível, ainda, verificar que houve aumento significativo na expressão da molécula Ly6G⁺ nas células obtidas dos linfonodos regionais 24 horas após a infecção, e aumento significativo dessas células nas patas pelo grupo infectado, em todos os períodos de infecção, sugerindo que o fungo leva ao recrutamento de tais células até o local de infecção.

A cromoblastomicose é uma micose crônica caracterizada por uma resposta inflamatória granulomatosa, entretanto, pouco é conhecido a respeito do padrão dos subtipos de linfócitos e dos modos de recrutamento dessas células em associação com a persistência dos fungos nos locais dos infiltrados celulares das lesões provocadas pela doença (GIMENES et al., 2005).

As DCs apresentam um papel crucial na ativação direta dos linfócitos B por meio da interação das moléculas CD40-CD40L (BANCHEREAU e STEINMAN, 1998). A partir dessa interação, ocorre a regulação da maturação e a diferenciação dos linfócitos B *naïve* em plasmócitos e, conseqüentemente, secreção de imunoglobulinas (BAYRY et al., 2011).

Foi possível observar diminuição significativa dos linfócitos B nas patas em todos os períodos de infecção nos grupos infectados com o fungo, quando comparados aos seus controles. Já nos linfonodos, houve um aumento significativo dessas células 12 e 72 horas após a infecção no grupo infectado. Esse aumento pode ter uma relação com a migração das DCs nos mencionados períodos de tempo, como demonstrou o experimento com CFSE, o que seria favorável para posteriores maturação e diferenciação dos linfócitos B.

Os linfócitos são as únicas células do organismo com capacidade de reconhecer e distinguir especificamente diferentes determinantes antigênicos, possibilitando o desenvolvimento de subclasses dessas células. Funcionam como reguladores da resposta imune a antígenos proteicos e servem como células efetoras para eliminar micro-organismos extracelulares e células neoplásicas. Os receptores das células T (TCR) reconhecem apenas antígenos peptídicos ligados a proteínas codificadas por genes do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) expressa pelas células apresentadoras de antígenos (JANKOVIC et al., 2001).

Observamos que houve diminuição na porcentagem de células T CD8⁺ obtidas das patas nos grupos infectados com conídios do fungo em todos os períodos de infecção, já nas células obtidas dos linfonodos regionais, verificamos que a porcentagem dessas células 12 e 24 horas após a infecção, diminuiu no grupo infectado em relação a seu controle, embora tal porcentagem tenha aumentado após 72 horas no grupo infectado. A porcentagem de células T CD4⁺ obtidas tanto das patas quanto dos linfonodos regionais aumentou nos grupos infectados, quando comparados

aos seus controles, 12 e 24 horas depois da infecção, mas não houve alteração na porcentagem dessas células após 72 horas de infecção.

Estudos realizados por nosso grupo de estudo, para caracterizar melhor o papel desempenhado pelas células T na infecção por cromoblastomicose, mediante o emprego de camundongos deficientes em células T CD4 e T CD8, demonstrou que a ausência de células T CD4 induz a uma forma mais grave da doença, em comparação com camundongos deficientes em células T CD8 (SOUZA et al., 2006).

O mecanismo de defesa do hospedeiro em infecções fúngicas ainda não é bem compreendido, embora na última década muitos estudos tenham sido feitos para avaliar a resposta imune mediada por células, relacionando essa resposta às citocinas, e à interação fungo-hospedeiro (CALDERONE et al., 1993; NETEA et al., 1999).

O desenvolvimento predominante de uma subpopulação de células T (Th1 ou Th2) durante uma infecção é extremamente importante, pois certos patógenos são mais efetivamente controlados por uma resposta do tipo celular (Th1) e outros mais bem controlados por uma resposta do tipo humoral (Th2) (SHER; COFFMAN, 1992). Em algumas doenças crônicas, a resposta inapropriada de células CD4⁺ pode exacerbar a doença, levando a uma inabilidade do hospedeiro para erradicar o micro-organismo.

Com a finalidade de verificar o perfil de citocinas induzidas pelas células T CD4⁺ após a infecção pelo fungo *F. pedrosoi*, realizou-se um ensaio utilizando-se 7 dias de infecção s.c. com o fungo, para determinação de células CD4⁺/IFN- γ ⁺, CD4⁺/IL-4⁺ e CD4⁺/IL-10⁺. Constatamos que a porcentagem de células TCD4⁺ diminuiu nos grupos infectados pelo fungo, tanto nas patas quanto nos linfonodos quando comparados aos seus controles. Resultados semelhantes foram observados em relação à produção das citocinas, pois houve diminuição dessas nos grupos infectados pelo fungo. Nas células obtidas dos linfonodos, conseguimos detectar somente a produção de IFN- γ . Dessa forma, não foi possível determinar uma polarização para Th1 ou Th2, o que torna, necessária a realização de novos ensaios ou um maior tempo de infecção.

Em resumo, verificamos que o fungo *F. pedrosoi* é capaz de ativar macrófagos e neutrófilos para o sítio de infecção em poucas horas, leva ao aumento de células B nos linfonodos após 12 e 72 horas de infecção, e provoca aumento de linfócitos T CD4⁺ tanto no local de infecção quanto nos linfonodos, também após poucas horas de infecção. Já em relação às DCs, constatamos que o fungo é capaz de ativar a migração dessas células do sítio de infecção para os linfonodos, igualmente nas primeiras horas de infecção, levando ao aumento de MHC-II e de CD86. Assim, os

resultados indicam que as DCs são capazes de migrar depois do contato com *F. pedrosoi*. A indução de células T CD4⁺ mostrou-se, no entanto, limitada após o contato com o fungo.

7 CONCLUSÕES

A infecção subcutânea com *F. pedrosoi* altera o fenótipo de células dendríticas:

Patas:

- ✓ As células CD11c⁺ diminuíram gradativamente em todos os períodos de infecção, essa diminuição foi significativa após 24 e 72 horas;
- ✓ Houve maior expressão da molécula DEC205 decorridas 12 e 24 horas de infecção;
- ✓ Ocorreu diminuição gradativa na expressão de CCR7 com o aumento do tempo de infecção;
- ✓ Diminuiu a expressão das moléculas co-estimulatórias CD40 e CD86.

Linfonodos:

- ✓ Não houve alterações na porcentagem de células CD11c⁺ após 12 e 24 horas de infecção, porém, ocorreu um aumento significativo dessas células depois de 72 horas do processo infeccioso;
- ✓ Diminuiu a expressão de DEC205 decorridas 12 e 24 horas de infecção, e houve um aumento dessa expressão após 72 horas;
- ✓ Ocorreu um aumento na expressão de MHC-II após 24 e 72 horas de infecção;
- ✓ Aumentou a expressão de CD103 e CCR7 após 24 horas de infecção, diminuindo nos demais períodos de tempo.

Ativação de macrófagos, neutrófilos, linfócitos B e T após infecção subcutânea com *F. pedrosoi*:

- ✓ O fungo *F. pedrosoi* é capaz de ativar macrófagos e neutrófilos para o sítio de infecção em poucas horas e, leva ao aumento de células B nos linfonodos após 12 e 72 horas de infecção, além disso, provoca o aumento de linfócitos T CD4⁺ tanto no local de infecção quanto nos linfonodos, também poucas horas depois de iniciado o processo infeccioso.

Capacidade migratória das células dendríticas após infecção subcutânea com *F. pedrosoi*:

- ✓ O fungo foi capaz de ativar a migração das células dendríticas do sítio de infecção para os linfonodos regionais nas primeiras horas de infecção, levando ao aumento de MHC-II e de CD86.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia básica**: funções e distúrbios do sistema imunológico. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2007.
- AHRENS J.; GRAYBILL J. R; ABISHAWL A.; TIO F. O.; RINALDI M.G. Experimental murine chromomycosis mimicking chronic progressive human disease. **Am J Trop Med Hyg**; 40:651-8, 1989.
- AL-DORRY, Y. Chromomycosis. **Missoula**: Mountain Press, 1972, 203p.
- ALMEIDA, S. R. Micologia – **Ciências Farmacêuticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- ALVIANO, C. S.; FARBIARZ, S. R.; TRAVASSOS, L. R.; AUGLUSTER, J.; SOUZA, W. Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propranolol. **Mycopathologia**, 119(1), 17-23, Jul, 1992.
- ALVIANO, D.; KNEIPP, L.; LOPES, A.; TRAVASSOS, L.; MEYER-FERNANDES, J.; RODRIGUES, M.; ALVIANO, C. Differentiation of *Fonsecaea pedrosoi* mycelial forms into sclerotic cells is induced by platelet-activating factor. *Res. Microbiol.*; 154:689-695. 2003.
- ANTHONY T. C.; McALEER R. Chromomycosis. Report of a case from West Austrália. **Australas J. Dermatol.** 7:13, 1963.
- ARANGO, M.; JARAMILO, C.; CORTÉS, A.; RESTREPO, A. Auricular chromoblastomycosis by *Rhinocladiella aquaspersa*. **Med. Mycol.**, Plymouth. 36:43-45, 1998.
- ARAÚJO, D. P. Determinação das concentrações plasmáticas e teciduais de itraconazol em pacientes com cromoblastomicose. **Dissertação de Mestrado**. Belém-Pará, 2008. Universidade Federal do Pará.
- ARELLANO-OCAMPO F.; TAMAYO PEREZ R.; VICTORIA R. Cuatro casos de cromomycosis por *Cladosporium carronii* y su tratamiento. **Der ILA**, 10:309, 1968.
- ATTAPATTU, MC. Chromoblastomycosis – a clinical and mycological study of 71 cases from Sri Lanka. **Mycopathologia**, 137: 145-151, 1997.
- BADALI, H.; GUEIDAN, C.; NAJAFZADEH, M. J.; BONIFAZ, A. DE HOOG, G. Biodiversity of the genus *Cladophialophora*. **Stud Mycol.**, 61: 175-191, 2008.
- BALLOY, V.; HUERRE, M.; LATGE, J.P.; CHIGNARD, M. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. **Infect. Immun.**, v.73, p. 494-503, 2005.
- BANCHEREAU. J.; STEINMAN, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v.392, n.6673, p.245-52, 1998.
- BAYRY, J.; FOURNIER, E. M.; MADDUR, M. S.; VANI, J.; WOOTLA, B.; SIBÉRIL, S.; DIMITROV, J. D.; LACROIX-DESMAZES, S.; BERDAH, M.; CRABOL, Y.; OKSENHENDLER, E.; LÉVY, Y.; MOUTHON, L.; SAUTÈS-FRIDMAN, C.; HERMINE, O.; KAVERI, S. V. Intravenous immunoglobulin induces proliferation and

immunoglobulin synthesis from B cells of patients with common variable immunodeficiency: a mechanism underlying the beneficial effect of IVIg in primary immunodeficiencies. **J. Autoimmun.** 36(1):9-15, 2011.

BITTENCOURT, A.L.; LONDERO, A.T.; ANDRADE, J.F. Chromoblastomycosis auricular. Relato de um caso. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** 36:381-383, 1994.

BONIFAZ, A.; CARRASCO-GERARD, E.; SAL, L. A. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. **Mycoses.** 44: 1–7, 2001.

BORELLI, D. Casual agents of chromoblastomycosis (chromycocetes) **Proceedings of the International Conference on the Mycoses.** PAHO Sc Publ 396, 334-5, 1987.

BOZZA, S.; R. GAZIANO, A. SPRECA, A. BACCI, C. MONTAGNOLI, P. di FRANCESCO e L. ROMANI. Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymphonodes and initiate disparate Th responses to the fungus. **J. Immunol.** 168: 1362-1371, 2002.

BRETSCHER, P. A.; WEI, G.; MENON, J. N.; BIELEFELDT-OHMANN, H. Establishment of stable cell-mediated immunity that makes susceptible mice resistant to *Leishmania major*. **Science.** V.257, n.5069, p.539-542, 1992.

BROWN, G. D.; GORDON, S. ungal beta-glucans and mammalian immunity. **Immunity.** 19: 311-315, 2003.

CALDERONE, R. A. Molecular interactions at the interface of *Candida albicans* and host cells. **Arch Med Res.** 24(3): 275–279, 1993.

CAO, Q.; JIN, Y.; JIN, M.; et al. Therapeutic effect of MIP-1alpha-recruited dendritic cells on preestablished solid and metastatic tumors. **Cancer Lett.**; 295:17–26, 2010.

CASTRO, L. G. M. Chromomycosis: a therapeutic challenge (letter). **Clin Infect Dis,** Chicago, v. 15, p. 553-554, 1992.

CASTRO, L. G. M. Tratamento da cromoblastomicose pela criocirurgia com nitrogênio líquido. São Paulo, 1998. **Tese de doutorado.** Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

CHANDLER, F. W.; KAPLAN, W.; AJELLO, L. A. A colour atlas and textbook of the histopathology of mycotic diseases: London, **Wolfe Med**, p. 47-49, 1980.

CHARALANPOS, A.; ROILIDES, E. Cytokines and fungal infections. **J. Hematol.**, v. 129, p. 583-596, 2005.

COEHAND, L.; ISLER, P.; SONGEON, F.; NICOD, L. P. Human lung dendritic cells have an immature phenotype with efficient mannose receptors. **Am. J. Cell. Mol. Biol.** 21: 547, 1999.

CORBELLINI, V. A.; SCROFERNEKER, M. L.; CARISSIMI, M.; SANTOLIN, L. D. Delayed-type hypersensitivity response to crude and fractionated antigens from *Fonsecaea pedrosoi* CMMI 1 grow in different culture media. **Mycopathologia**, 162(1), 51-55, Jul, 2006.

D'AVILA, S. C. G. P. Avaliação da reação tecidual mediada por células em lesões cutâneas da cromoblastomicose e sua correlação com as diferentes formas clínicas da

doença. São Paulo. 2001. **Tese de doutorado**. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

D'AVILA, S. C. G. P.; PAGLIARI, C.; Duarte, M. I. The cell-mediated immune reaction in the cutaneous lesion of chromoblastomycosis and their correlation with different clinical forms of the disease. **Mycopathologia**. 156(2):51-60, 2002.

DE HOOG, G. Significance of fungal evolution for the understanding of their pathogenicity, illustrated with agents of phaeohyphomycosis. **Mycoses**. 40 Suppl. 2:5-8. 1997.

DE HOOG, G.; QUEIROZ-TELLES, F.; HAASE, G.; FERNANDEZ-ZEPPEFELDT, G.; ATTILI, A. D.; GERRITS, V. E. A.; MATOS, T.; PELTROCHE-LLACSAHUANGA, H.; PIZZIRANI-KLEINER, A.; RAINER, J.; RICHARD-YEGRES, N.; VICENTE, V.; YEGRES, F. Black fungi: clinical and pathogenic approaches. **Med Mycol.**, 38 Suppl 1: 243-250, 2000.

DE HOOG, G.; ATTILI-ANGELIS, D.; VICENTE, V.A.; et al. Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* species. **Med Mycol**. 42: 405–416, 2004.

DE HOOG, G.; NISHIKAKU, A. S.; FERNANDEZ-ZEPPEFELDT, G.; et al. Molecular analysis and pathogenicity of the *Cladophialophora carrionii* complex, with the description of a novel species. **Stud Mycol.**; 58: 219-234, 2007.

ELGART, G. Chromoblastomycosis. **Dermatol Clin**, 14: 77-83, 1996.

ESPOSITO-FARESE, M. E.; SAUTES, C.; DE LA SALLE, H.; LATOUR, S.; BIEBER, T.; DE LA SALLE, C.; OHLMANN, P.; FRIDMAN, W. T.; CAZENAVE, J. P.; TEILLAUD, J. L. Membrane and soluble Fc gamma RII/RIII modulate the antigen-presenting capacity of murine dendritic epidermal Langerhans cells for IgG-complexed antigens. **Journal of Immunology**, v. 155, p.1725-1736, 1995.

ESTERRE, P.; INZAN C. K.; RAMARCEL, E. R.; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A.; RATSIOHARANA, M.; PECARRERE, J. L.; ROIG, P. Treatment of chromomycosis with terbinafina: preliminary results of an open pilot study. Br. J. **Dermatol.**, Oxford. v. 134, supl. 46, p. 33-36, 1996.

ESTERRE, P.; JAHEVITRA, M.; . ANDRIANTSIMAHAVANDY, A. Humoral immune response in chromoblastomycosis during and after therapy. **Clin Diagn Lab Immunol**. May; 7(3): 497–500, 2000.

ESTERRE, P.; QUEIROZ-TELLES, F. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. **Curr Opin Infect Dis**, 19: 148-152, 2006.

FANGER, N. A.; WARDWELL, K.; SHEN, L.; TEDDER, T. F.; GUYRE, P. M. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 157, p.541-548, 1996.

FERREIRA, M. A. Cytokine expression in allergic inflammation: systematic review of in vivo challenge studies. **Mediators Inflamm.**, v. 12, p. 259-267, 2003.

FÖRSTER, R.; SCHUBEL, A.; BREITFELD, D.; KREMMER, E.; RENNER-MÜLLER, I.; WOLF, E.; LIPP, M. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. **Cell**. Oct 1;99(1):23-33, 1999.

FÖRSTER, R.; DAVALOS-MISSLITZ, A. C.; ROT, A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. **Nature Reviews Immunology**, v.8, p.362-371, 2008.

GIMENES, V. M. F.; SOUZA, M. G.; FERREIRA, K. S.; MARQUES, S. G.; GONÇALVES, A. G.; SANTOS, D. V. C. L.; PEDROSO e SILVA, C. M.; ALMEIDA, S. R. Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. **Microbes and Infection**, 7(4), 708-713, Apr, 2005.

GONZALEZ-JUARRERO, M.; ORME, M. I. Characterization of murine lung dendritic cell infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 69:1127, 2001.

GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B.A.W.H. **Kuby immunology**. New York: W.H. Freeman and company, 4ed., p.670, 2000.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat. Rev. Immunol.** 5(12):953-64, 2005.

GUERMONPREZ, P.; VALLADEAU, J.; ZITCOGEL, L.; THÉRY, C.; AMIGORENAS, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 20:621-67, 2002.

HERZENBERG, L. A.; TUNG, J.; MOORE, W. A.; PARKS, D. R. Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. **Nature Immunology**, v.7, p. 681-685, 2006.

HUFFNAGLE, G. B.; DEEP, G.S. Innate and adaptive determinants of host susceptibility to medically important fungi. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 6, p. 344-350, 2003.

JANEWAY, C.A. *et al.* **Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença**. 4ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.

JANKOVIC, D.; LIU, Z.; GAUSE, W. C. Th-1 and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. **Trends in Immunology**. v.22, n.8, p.450-457, 2001.

JIANG, W.; SWIGGARD W. J.; HEUFLER, C.; PENG, M.; MIRZA, A.; STEINMAN, R. M. *et al.* The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cell is involved in antigens processing. **Nature**, 375: 151-5, 1995.

KLECHEVSKY, E.; KATO, H. *et al.* Dendritic cells star in Vancouver. **J Exp. Med.**, v.202, n.1, Jul. p. 5-10, 2005.

KURITA, N. Cell-mediated immune responses in mice infected with *Fonsecaea pedrosoi*. **Mycopathologia**. 68: 9-15, 1979.

LACAZ, C. S. **Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 8. ed. rev. e ampl. São Paulo: Sarvier, 1991.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Guia para identificação: fungos, actinomicetos, algas de interesse médico**. São Paulo: Savier, p. 232-237, 1998.

LACAZ, C. S. Imunidade humoral e celular nas micoses. In: Lacaz C. da S., Porto E. Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. **Tratado de Micologia Médica**. São Paulo: Savier, 2002: 830-863.

LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells in maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. **J. Exp. Med.**, v. 1, 1794, p. 1109-18, 1994.

LEIBOVICH, S. J.; ROSS, R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. **Am J Pathol.** 78(1): 71-100. 1975.

LEVITZ, S.M. Interactions of Toll-like receptors with fungi. **Microbes and Infection**, v.6, p. 1351-1355, 2004.

Li, J.L.; NG LG. Peeking into the secret life of neutrophils. **Singapore Immunology, Network**. Singapore, 138648, 2012.

LIPSCOMB, M. F.; MASTEN B. J. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. **Physiol. Rev.** Jan:82(1):97-130, 2002.

MANS, M. G.; TRAVER, et al. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myelo progenitors. **Blood**, v.97, n.11, Jun. 1, p. 3333-21, 2001.

MARQUES, S. G.; SILVA, C. M. P.; SALDANHA, P. C.; REZENDE, M. A.; VICENTE, V. A.; QUEIROZ-TELLES, F.; COSTA, J. M. L. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the Shell of the Babassu Cocconut (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon Region of Maranhão Brazil. *Jpn J. Mycol*, 47(4), 305-311, Jul 26, 2006.

MATTE, S. M, W; LOPES, J, O; MELO, I, S; ESPADIM, L. E, R; PINTO, M, S. Cromoblastomicose no Rio Grande do Sul : Relato de 12 casos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 30, n. 4, p. 309 - 311, 1997.

MEGIOVANNI, A. M., F. SANCHEZ, M. ROBLEDO-SARMIENTO, C. MOREL, J. C. GLUCKMAN, AND S. BOUDALY. Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells. **J Leukoc Biol.**, 79:977–988, 2006.

MCCORMACK, F. X.; GOBBONS, R.; WARD, S. R.; KUZMENKO, A.; WU, H.; DEEP, G. S. Macrophage-independent fungicidal action of the pulmonary collectins. **J. Infect. Dis.**, v.278, p. 36250-36256, 2003.

MCGINNIS MR - Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis. New concepts, diagnosis and treatment. **J Am Acad Dermatol**, 8:1-16, 1983.

MILAM, C. P.; FENSKE, N. A. Chromoblastomycosis. **Dermatol. Clin.**, 7 p. 219–225, 1989.

MINOTTO, R; BERNARDI, C. D. V; MALLMANN, L. P; EDELWEISS, M. I. A; SCROFERNEKER, M. L. Chromoblastomycosis: A review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **J Am. Acad Dermatol**, v. 44, n. 4, p. 585 - 592, 2001.

MOLL, H., BERBERICH, C. Dendritic cell-based vaccination strategies: induction of protective immunity against leishmaniasis. **Immunobiology**. 204 (5): 659-66, 2001.

NAJAFZADEH, M. J.; GUEIDAN, C.; BADALI, H.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; LIAN, X. ; DE HOOG, G. S. Genetic diversity and species delimitation in the opportunistic genus *Fonsecaea*. **Med. Mycol.** v. 47, N. 1, p.17-25, 2009.

NETEA, M. G.; VANDERMEER, J. W.; MEIB, J.F.; KULLBERG, B.J. Fas-fas L interactions modulate host defense against systemic *Candida albicans* infection. **J Infect Dis.** 180(5): 1648–1655, 1999.

NEWMAN, S.L.; HOLLY, A. *Candida albicans* is phagocytosed, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells. **Infect Immun.**; 69 (11): 6813-22, 2001.

NISHIMURA K.; MIYAJI M. Defense mechanisms of mice against *Fonsecaea pedrosoi* infection. **Mycopathologia**, **76**: 155–66, 1981.

NOBEN-TRAUTH, N. Conventional naive CD4+ T cells provide an initial source of IL-4 during Th2 differentiation. **J. Immunol.**, v. 165, p.3620-3625, 2000.

OGAWA, M. M.; ALCHORNE, M. M. A.; BARBIERE, A.; CASTIGLIONI, M. V.; PENNA, A. P. B.; TOMIMORI-YAMASHITA, J. Lymphoscintigraphic analysis in chromoblastomycosis. **International Journal of Dermatology**, 42(8), 622-625, Aug, 2003.

POLLARD, A. M.; LIPSCOMB, M. F. Characterization of murine lung dendritic cells: similarities to Langerhans cells and thymic dendritic cells. **J. Exp. Med.** 172: 159, 1990.

POLVERINI, P. J.; COTRAN, P. S.; GIMBRONE, M. A. JR.; UNANUE, E. R. Activated macrophages induce vascular proliferation. **Nature**. 269(5631):804-6, 1977.

PURIM, K. S. M. Cromoblastomicose. Aspectos histológicos e micológicos durante o tratamento com itraconazol. Curitiba. 1991. **Tese de Mestrado**. Universidade Federal do Paraná.

QUEIROZ-TELLES, F.; WANKE, B.W.; MONTEIRO, P.C.F.; BORDIGNON, G.F.; RAMOS, L.R.; LONDERO, A.T. Chromoblastomycosis caused by different species of Exophiala. In: XXXII Congresso da Soc. Bras. Med. Trop., 1996. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 29: 117.

QUEIROZ-TELLES, F. A cromoblastomicose no Estado do Paraná: etiologia, epidemiologia, clínica e terapêutica com itraconazol. **Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.**, Brasília, v.30, n.4, p. 345-346, 1997.

QUEIROZ-TELLES, F.; NUCCI, M.; COLOMBO, A. L.; TOBÓN, A.; RESTREPO, A. Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Med Mycology**, 1-12, 2010.

RELLOSO, M.; PUIG-KROGER, A.; PELLO, O. M.; RODRIGUEZ- FERNANDEZ, J.L.; DE LA ROSA, G.; LONGO, N.; NAVARRO, J.; MUNOZ-FERNANDEZ, M.A.; SANCHEZ-MATEOS, P.; CORBI, A. L. DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents. **J. Immunol.** 168, 2634–2643, 2002.

RIBEIRO, E. L. *et al.* Cromoblastomicose, Doença presente na realidade populacional brasileira. **RBAC**, vol. 38(3): 189-192, 2006.

RIPPOM, J. M. Medical Mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. 3^a ed., Philadelphia, **W. B. Saunders Co.**, 1988.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Rev. Immunol.**, v.4, p. 1-23, 2004.

ROEDERER, M. Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. **Cytometry**. 45:194-205, 2001.

ROSE S.; MISHARIN A.; PERLMAN H. A novel Ly6C/Ly6G-based strategy to analyze the mouse splenic myeloid compartment. **Cytometry A.**, Apr;81(4):343-50, 2012.

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

SALFEDER, K. **Atlas of fungal pathology**. Dordrecht. Kluwer, 1990. p: 154-50.

SALGADO, C. G.; SILVA, J. P.; DINIZ, J. A. P.; SILVA, M. B.; COSTA, P. F.; TEIXEIRA, C.; SALGADO, U. I. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 46(1), 33-36, Jan-Feb, 2004.

SANTOS, S. S.; FERREIRA, K. S.; ALMEIDA, S. R. *Paracoccidioides brasiliensis*-Induced Migration of Dendritic Cells and Subsequent T-Cell Activation in the Lung-Draining Lymph Nodes. **PLoS ONE**, 6(5), 2011.

SHER, A.; COFFMAN, R. L. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell derived cytokines. **Annual Review of Immunology**, v.10, p.385-398, 1992.

SHORTMAN, K.; LIU, Y. J. Mouse and human dendritic cells subtypes. **Nat. Rev. Immunol.**, 2(3): 151-61, 2002.

SHORTMAN, K.; NAIK, S. H. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. **Nat. Rev. Immunol.**, 7 (1): 19-30, 2007.

SILVA, J. P.; DINIZ, J. A. P.; ROZENTAL, S. **Chromoblastomicose no Estado do Pará: uma revisão (de 1942 a 1997) dos últimos 55 anos**. In: II Congresso Brasileiro de Micologia, Rio de Janeiro, 1998.

SILVA, J. P.; SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Chromoblastomycosis: A retrospective study of 325 cases on Amazonian region (Brasil). **Mycopathologia. The Hague**, v. 143, p. 171-175, 1999.

SILVA, J. P.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; SOUZA, W.; TRAVASSOS, L. R.; DINIZ, J. A. P.; ROZENTAL, S. Comparison of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells obtained in vivo and in vitro: ultrastructure and antigenicity. **FEMS Immunology Medical Microbiology**. 33(1), 63-69, Mar 25, 2002.

SOUZA, M. G.; GHOSH E.; ALMEIDA S. Absence of CD4⁺ T cells impairs host defence of mice infected with *Fonsecaea pedrosoi*. **Scand J Immunol.**, 64:595-600, 2006.

SOUZA, M. G. *et al.* Monocyte-derived dendritic cells from patients with severe form of chromoblastomycosis induces CD4⁺ T cell activation in vitro. **Clin Exp. Immunol.**, 156 (1): 117-25, 2009.

STEINMAN, R. M.; HAWIGER, D.; NUSSENZWEIG, M. C. Tolerogenic dendritic cells. **Annu Rev. Immunol.**, 21: 685-711, 2003.

STEINMAN, R. M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. **Annu. Rev. Immunol.** 2011.

TAGAMI, H.; TORINUKI, W.; OKOHCHI, K.; TAKEMATSU, H.; Activation of the alternative complement pathway by *Fonsecaea pedrosoi*. **The Journal of investigative dermatology**. 83: 308-310, 1984.

TASSANEETRITHEP, B.; BURGESS, T. H., et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v.197, n.7, Apr 7, p.823-9, 2003.

TIBIRIÇÁ, P. Q. T. Anatomia patológica da dermatide verrucosa cromomycótica. São Paulo. 1939. **Tese**. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

UNANUE, E. R.; ALLEN, P. M. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. **Science**, 236: 551-557, 1987.

URIBE, F.; ZULUACA, A. I.; LEON, W.; RESTREPO, A. Histopathology of Chromoblastomycosis. **Mycophatology**, 105: 1-6, 1989.

USUKI, K. S. YOTSUMOTO, H. HAMADA, T. SHIMADA, K. FUKUMITSU, T. KANZAKI. A case of chromomycosis with tumor-like growth. **J. Dermatol.**, 23, p. 643–647, 1996.

VERMAELEN, K. Y.; CARRO-MUINO, I.; LAMBRECHT, B. N.; PAUWELS, R. A. Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. **J. Exp. Med.** 193, 51-60, 2001.

VYAS, M.C.; JOSHI, Y.R.; BHARGAVA, N.; JOSHI, K.R.; TANWAR, R. K. Cerebral chromoblastomycosis – a rare case report of cerebral abscess and brief review of literature – a case report. **Indian J. Pathol. Microbiol**, 43: 81-5, 2000.

WALLET, M. A.; SEN, P.; TISCH, R. Immunoregulation of dendritic cells. **Clin. Med. Res.** Aug: 3(3):166-75, 2005.

WALTER, P.; GARIN, Y.; RICHARD-LENOBLE, D. Chromoblastomycosis: A morphological investigation of the host-parasite interactions. *Wirschows. Arch. (Pathol. Anat.)*, v.397, p.203-214, 1982.

WERB, Z.; GORDON, S. Secretion of a specific collagenase by stimulated macrophages. **J Exp Med**. 142(2):346-60, 1975.

XIBAO, Z.; CHANGXING, L.; QUAN, L.; YUQING, H. Treatment of chromoblastomycosis with terbinafine: a report of four cases. **J Dermatolog Treat**. 16: 121–4, 2005.

XIE, J.; QIAN, J.; YANG, J.; WANG, S.; FREEMAN, M. E.; YI, Q. Critical roles of Raf/MEK/ERK and P13K/AKT signaling and inactivation of p38 MAP kinase in the differentiation and survival of monocyte-derived immature dendritic cells. **Exp. Hematol.**, 33: 564-72, 2005.

YAGUCHI, T.; TANAKA, R.; NISHIMURA, K.; UDAGAWA S. Molecular phylogenetics of strains morphologically identified as *Fonsecaea pedrosoi* from clinical specimens. **Mycoses**, Jul;50(4):255-60, 2007.

YAMAZAKI, S.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells as controllers of antigen-specific Foxp3⁺ regulatory T cells. **J. Dermatol. Sci.**, 54, p. 69–75, 2009.

YU S.; MAITI P. K.; DYSON M.; JAIN R.; BRALEY-MULLEN H. B cell-deficient NOD.H-2 h4 mice have CD4+CD25+ T regulatory cells that inhibit the development of spontaneous autoimmune thyroiditis. **J Exp Med.**; 203:349-58, 2006.

ZAR, J. H.. Biostatistical analysis. **New Jersey**, Prentice Hall. 718p., 1984.

ZEPPENFELDT, G.; RICHARD-YEGRES, N.; YEGRES, F. *Cladosporium carrionii*: hongo dimórfico en cactáceas de la zona endémica para la cromomycosis en Venezuela. **Rev. Iberoan Micol.**, 11: 61-63, 1994.