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

**Fagocitose, produção de óxido nítrico e de citocinas pró-
inflamatórias por macrófagos estimulados por diferentes
agentes de cromoblastomicose**

Márcia Hayakawa

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

São Paulo

2005

(Nota da BCQ: Não foi possível capturar fielmente a imagem das figuras desta dissertação)

18-241

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011090

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Hayakawa, Márcia
H419f Fagocitose, produção de óxido nítrico e de citocinas
pró-inflamatórias por macrófagos estimulados por diferentes
agentes de cromoblastomicose / Márcia Hayakawa. -- São
Paulo, 2005.
64p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Almeida, Sandro Rogério de

1. Cromoblastomicose : Medicina 2. Micologia médica I.
T. II. Almeida, Sandro Rogério de, orientador.

616.969 CDD

Márcia Hayakawa

Fagocitose, produção de óxido nítrico e de citocinas pró-
inflamatórias por macrófagos estimulados por diferentes agentes
de cromoblastomicose

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dr. Sandro Rogério de Almeida
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Dedico essa Tese aos meus queridos e amados pais, Arlindo e Emiko, e à minha irmã Elisangela, que acompanharam cada passo, cada angústia e também cada vitória, cada alegria.

Dedico essa Tese à minha bússola, ao meu porto seguro, companheiro de todas as horas, ao meu amor, Reinaldo. Foi quem me estimulou a buscar mais da vida e que sempre acreditou em mim, mesmo quando eu mesma duvidava. Seu apoio foi imprescindível.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer à Deus, pela arte da vida e por ter-me abençoado nessa minha jornada. Quando olho para trás, percebo sua Magia em cada instante vivido.

Ao Dr. Sandro Rogério de Almeida, que me recebeu em seu laboratório sem me testar. Você apostou em mim e sou muito grata por isso. Agradeço também pela paciência , aprendizado e apoio.

À minha sogra (Sonia), pela atenção e pelo incentivo.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas: Dorlei, Cláudia e Rose.

À Sonia, pelo auxílio, apoio e atenção.

Aos meus amigos do Laboratório de Micologia: Karen, Andréia, Viviane, Eliver e Glória em especial, pelo imenso carinho, amizade e paciência durante todos os momentos difíceis de minha vida.

Às minhas amigas Nívea e Neiva pela atenção, amizade e incentivo.

E a todos, que de uma forma ou de outra, seja pelas informações técnicas, pelo exemplo ou pelo simples sorriso, colaboraram para a realização desse trabalho.

Muito obrigado!!!!!!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	3
RESUMO	5
1 INTRODUÇÃO	7
1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS E SINÓNIMIAS	7
1.2 ETIOLOGIA.....	8
1.3 EPIDEMIOLOGIA.....	8
1.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	10
1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	10
2 IMUNOPATOGENIA.....	13
3 OBJETIVOS	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 FUNGOS	22
4.2 MEIO DE CULTURA UTILIZADO.....	22
4.3 OBTENÇÃO DE CONÍDIOS DAS ESPÉCIES FÚNGICAS CAUSADORAS DA CROMOBLASTOMICOSE	22
4.4 ANIMAIS	23
4.5 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS.....	23
4.6 OBTENÇÃO DE COMPLEMENTO	23
4.7 ENSAIOS DE FAGOCITOSE	24
4.7.1 <i>Fagocitose de conídios dos agentes de cromoblastomicose na presença de açúcares</i>	24
4.7.2 <i>Fagocitose de conídios dos agentes de cromoblastomicose na presença de complemento</i>	25
4.8 EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE DE MACRÓFAGOS	25

5	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE FUNGICIDA DOS MACRÓFAGOS.....	26
5.1	ATIVIDADE FUNGICIDA DOS MACRÓFAGOS	26
5.1.1	<i>Análise de viabilidade de conídios dos agentes da cromoblastomicose após fagocitose por macrófagos.....</i>	<i>26</i>
5.1.2	<i>Determinação da produção de óxido nítrico.....</i>	<i>27</i>
5.2	DETECÇÃO DE CITOCINAS	27
5.2.1	<i>Em sobrenadante de cultura de macrófagos</i>	<i>27</i>
5.2.2	<i>Condições da reação</i>	<i>27</i>
5.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
6	RESULTADOS	29
6.1	ENSAIOS DE FAGOCITOSE	29
6.1.1	<i>Fagocitose de conídios dos agentes etiológicos da cromoblastomicose em presença de açúcares.....</i>	<i>29</i>
6.1.2	<i>Fagocitose de conídios dos agentes etiológicos da cromoblastomicose na presença de Complemento.....</i>	<i>31</i>
6.2	EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE DE MACRÓFAGOS NA PRESENÇA DE CONÍDIOS DOS PRINCIPAIS AGENTES DE CROMOBLASTOMICOSE	33
6.3	ATIVIDADE FUNGICIDA DOS MACRÓFAGOS	36
6.4	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE FUNGICIDA DOS MACRÓFAGOS.....	37
6.4.1	<i>Determinação da produção de óxido nítrico.....</i>	<i>37</i>
6.5	DETECÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS	38
6.5.1	<i>Em sobrenadante de cultura de macrófagos</i>	<i>39</i>
7	RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS APRESENTADOS	42
8	DISCUSSÃO	43
9	CONCLUSÃO.....	49
10	REFERÊNCIAS	51

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs – Células Apresentadoras de Antígeno
BCG – Bacilo de Calmette-Guérin
B7.1 – CD80
B7.2 – CD86
BSA – “Be Serum Albumine”
°C – Graus Celsius
CFUs – Unidades Formadoras de Colônias
ELISA – “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”
GM-CSF – Fator estimulante de colônias de Granulócitos-monócitos
HLA – Molécula de Histocompatibilidade Humana
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico
IFN- γ – Interferon-gama
IL – Interleucina
iNOS – Óxido Nítrico Induzível
LPS - Lipopolissacarídeo
MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade
M – Molar
N - Nitrogênio
Nm - Nanomolar
NO – Óxido nítrico
OPD - orthophenylenediamine
PBS – Solução Salina de Fosfato Tamponada
PBS-T - Solução Salina de Fosfato Tamponada Tween
PPD - proteína purificada derivada de tuberculina
RPMI – meio de cultura “Roswell Park Memorial Institute – 1640”
SFB – Soro Fetal Bovino
SPF – “specific pathogens free”

TCR – Receptor de Célula T

Th – Linfócitos T auxiliar

TNF – Fator de Necrose Tumoral

UV – Radiação ultra-violeta

μM - Micromolar

μg - Micrograma

μL - Microlitro

RESUMO

A cromoblastomicose é infecção da pele e do tecido subcutâneo que resulta da implantação traumática transcutânea de propágulos originários de diversas espécies fúngicas. A doença é insidiosa e as lesões causadas pelos mesmos apresentam evolução lenta e os pacientes cronicamente infectados deixam de responder a alguns tratamentos.

Considerando a importância dos macrófagos na interação dos sistemas imune inato e adaptativo, bem como na ativação de células T, no presente trabalho foram realizados ensaios de fagocitose empregando conídios das principais espécies fúngicas causadoras da cromoblastomicose (*Fonsecaea pedrosoi*, *Cladophialophora carrionii*, *Rhinocladiella aquaspersa* e *Phialophora verrucosa*), viabilidade de conídios seguidos da dosagem de citocinas. Verificamos que os receptores de manose atuaram significativamente no processo de fagocitose dos fungos *Fonsecaea pedrosoi* e *Rhinocladiella aquaspersa*. Além da da manose, outros açúcares como glicose e lactose, também inibiram a fagocitose desses fungos. Já os conídios fagocitados por macrófagos, provocaram diminuição significativa na expressão de suas moléculas de superfície, tais como CD80, CD86 e MHC classe II. Foi demonstrado que os fungos *Rhinocladiella aquaspersa*, *Phialophora verrucosa* e *Cladophialophora carrionii* permaneceram viáveis após 72 horas de interação com os macrófagos no processo fagocítico. Assim como observamos que ocorreu uma produção elevada de NO no período de 12 horas principalmente na presença de *Fonsecaea pedrosoi*, entretanto, o fungo não foi eliminado pelo macrófago. Ao analisarmos a síntese de IL-1 β e IL-6, os fungos *Rhinocladiella aquaspersa* e *Cladophialophora carrionii* produziram esta citocina significativamente. Ao contrário, na síntese de TNF- α , todos os agentes da cromoblastomicose secretaram esta interleucina. Esses resultados sugerem que apesar dos diferentes fungos causarem a mesma patologia, os vários agentes

etiológicos na cromoblastomicose pode levar a uma resposta imunológica diferente e conseqüentemente alterar a evolução da doença.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS E SINONÍMIAS

A primeira publicação sobre cromoblastomicose foi atribuída à Max Rudolf (1914), que denominou “figueira” a doença causada por fungos negros em pacientes do Estado de Minas Gerais⁷⁵. Entretanto, essa micose já havia sido observada, por Alexandrino de Moraes Pedroso (1911), que denominou-a “blastomicose negra”²⁰. As características do fungo nas lesões cutâneas foram posteriormente descritas por Lane (1915) e Medlar (1915), , que tiveram o mérito de publicar, o primeiro caso de cromoblastomicose, devendo-se notar que o diagnóstico clínico da afecção era o de tuberculose verrucosa^{40,48}. Somente em 1920, Pedroso, em colaboração com Gomes, publicou seu trabalho sobre 4 casos de “blastomicose negra” ocorridos no Brasil, produzidos pela *Phialophora verrucosa*⁶¹. Negroni (1936) isolou a espécie *Fonsecaea pedrosoi* com três tipos de esporulação (tipo cladosporium, tipo rinocladiela e tipo phialophora)⁵³. Carrion (1942) separou a espécie *Fonsecaea compacta* da *Fonsecaea pedrosoi* por possuir esporulação abundante e compacta¹⁷. Trejos (1954) isolou a espécie *Cladosporium carrionii*⁹¹. Borelli (1972) isolou uma nova espécie a *Acrotheca aquaspersa*. Este mesmo autor descreveu, em 1980, um novo cromomiceto e lhe deu o nome de *Cladophialophora ajelloi*¹².

A doença foi estudada por diversos autores, recebendo várias denominações, tais como: dermatite verrucosa cromomicótica, pé musgoso, formigueiro, susina, blastomicose negra, doença de Pedroso, doença de Carrion. O termo cromoblastomicose só foi introduzido em 1922 por Terra et al.⁹⁰ e, na atualidade, é considerado apropriado e indicado segundo (ISHAM) " International Society for Human and Animal Mycology "⁵⁶. Moore & Almeida (1935), propuseram o termo cromomicose em substituição à denominação criada por Terra et al (1922), porém, essa nova denominação mostrou-se inadequada ao longo do tempo por ser empregada para definir outras infecções fúngicas também causadas

por fungos demáceos, mas não relacionados à cromoblastomicose^{50,90}. Em 1974, Ajello et al criaram o termo feohifomicose para designar infecções causadas por fungos demáceos, que diferem da cromoblastomicose em aspectos clínicos, patológicos e micológicos².

1.2 ETIOLOGIA

Os fungos classicamente envolvidos na etiologia da cromoblastomicose são: *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compacta*, *Phialophora verrucosa*, *Cladophialophora (Cladosporium) carrionii* e *Rhinocladiella aquaspersa*^{38,45,69}. Outras espécies, descritas como agentes etiológicos em alguns casos incluem *Wangiella (Exophiala) dermatitides*, *Exophiala spinifera*, *Exophiala jeanselmei* e *Exophiala castelani*^{09,,58,67}.

Alguns casos de lesões cutâneas, com características de dermatite verrucosa, podem ser determinados por manifestações de feo-hifomicose, nocardiose e levedurose. Na ilha de Madagascar, as principais espécies encontradas são *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladophialophora (Cladosporium) carrionii*²⁸. Sendo este último frequentemente encontrado na Venezuela e na África do Sul^{14,99}. *Fonsecaea compacta* é mais comum na Rússia, Porto Rico, Martinica, Tennessee, Líbia e Cuba e *Fonsecaea pedrosoi* é comum na América Latina^{03,14,69}. A *Phialophora verrucosa* foi observada nos Estados Unidos, Japão e China^{14,40}.

Na Amazônia, nos últimos 55 anos, foram diagnosticados 325 casos de cromoblastomicose, tendo sido isolados *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa*, *Cladophialophora (Cladosporium) carrionii* e raramente *Rhinocladiella aquaspersa*⁸².

1.3 EPIDEMIOLOGIA

Os fungos causadores de cromoblastomicose podem ser encontrados no solo de todo o mundo, mas as regiões tropicais e subtropicais apresentam maior frequência de casos. A doença apresenta caráter endêmico e ocorre

principalmente entre a população de zonas rurais^{3,14,82}. Os agentes da micose são ubíquos na natureza, integrando a microbiota do solo, água e matéria orgânica em decomposição. Tais agentes vivem saprofiticamente na matéria orgânica, sem exigências pedológicas específicas, do tipo, composição orgânica ou Ph³⁹.

Sabe-se que esses fungos não apresentam habitat específico, encontram-se dispersos na natureza. Algumas espécies como *Phialophora verrucosa* e *Fonsecaea pedrosoi* já foram isoladas de polpa de madeira, restos de plantas, cascas de árvores e espinhos de plantas^{67,77}. A maioria dos casos relatados de cromoblastomicose têm como agente etiológico *Fonsecaea pedrosoi* predominando-se em habitantes de regiões tropicais e subtropicais, seguido por *Cladophialophora carrionii* prevalecendo em regiões de clima árido ou semi-árido de Madagascar²⁸, Austrália⁶, Venezuela¹³, Equador e Peru⁷.

O Brasil, onde a doença já foi observada em todas as regiões, sendo um dos países que registra o maior número de casos relatados, apresentando índice elevado nas regiões Norte e Nordeste^{23,66,80}. Na cidade de Montenegro, em Rondônia, constatou-se altíssima incidência de uma doença de pele causada por fungos isolados de restos de animais e detritos da floresta e alguns casos foram confirmados como cromoblastomicose. Entre 1997 e 2001, foram detectadas dez ocorrências de doença com feridas na pele, o que proporciona uma taxa anual de 1,6 casos da doença por 10 mil habitantes, sugerindo que a cromoblastomicose deva ser de grande prevalência também nos municípios vizinhos⁶³.

A cromoblastomicose acomete principalmente indivíduos adultos, de 30 a 50 anos de idade, do sexo masculino, envolvidos em atividades rurais que mantêm contato direto com o solo e a vegetação²⁰. Não se conhece predileção racial e contágio inter-humano⁸². A doença resulta da implantação traumática transcutânea de diversas espécies de fungos da família *Dematiaceae*, através de soluções de continuidade, sobretudo nos membros inferiores, embora uma variedade de formas clínicas de cromoblastomicose e sítios anatômicos envolvidos tenham sido relatados³⁸.

1.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

O diagnóstico clínico da cromoblastomicose pode ser difícil devido à diversidade das lesões. Estas apresentam evolução crônica e podem iniciar como pápulas, verrugas ou nódulos que gradualmente aumentam de tamanho e, mais tarde, podem ulcerar. Em casos crônicos observam-se lesões nodulares, em placas infiltrativas ou eritematosas, cicatriciais, mas as verruciformes e tumorais são mais comuns. Algumas ulcerações adquirem aspecto papilomatoso, semelhante à couve-flor. As lesões se limitam à pele e ao tecido subcutâneo e a disseminação pode ocorrer por contigüidade ou por meio dos linfáticos superficiais. São bastante hemorrágicas e pode haver dor, prurido e odor desagradável³⁸.

Mais de um tipo clínico de lesão pode ser observado em um mesmo paciente. Uma característica marcante da cromoblastomicose é a presença de pequenos pontos negros nas lesões, que são a manifestação clínica do fenômeno de eliminação transepitelial do agente etiológico¹⁰. Este pontos negros ou " black dots " têm importância clínica, pois são locais ricos em parasitos, onde se consegue identificar os agentes ao exame micológico direto, porque, clinicamente, as lesões de cromoblastomicose podem se confundir com outras doenças dermatológicas infecciosas como micobacterioses, hanseníase, sífilis terciária ou não-infecciosas, como esporotricose, micetomas, feo-hifomicose e lobomicose⁶⁹.

1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial é realizado a partir da remoção de pontos negros da lesão por raspagem com lâmina de bisturi ou por biópsia. O agente causador pode ser identificado por exame direto da amostra clarificada com KOH. A observação de estruturas demáceas globosas, septadas ou não, em geral aglomeradas, denominadas corpos escleróticos ou células muriformes, no material biológico, confirma a etiologia fúngica da cromoblastomicose. Em ocasiões, observam-se hifas demáceas septadas, em amostras da epiderme⁴⁵.

O diagnóstico micológico completa-se pelo isolamento do fungo em meio de cultura ágar-Sabouraud, mantido em temperatura ambiente. As colônias suspeitas aparecem depois de 7 a 15 dias de cultivo sob a forma de pequenos pontos negros³⁹. As colônias são escuras, aveludadas, com centros elevados, porém, apenas a análise macroscópica não identifica a espécie, já que os agentes da cromoblastomicose desenvolvem colônias semelhantes.

A observação microscópica dos cultivos mostra que *Fonsecaea pedrosoi* é um fungo polimórfico com três tipos de esporulação, portanto, sofre variações na morfologia do aparelho reprodutor (conidióforo), fato que leva à identificação de gêneros e espécies diferentes, causadoras de cromoblastomicose. O aparelho reprodutor pode apresentar os seguintes tipos:

- Fialófora: apresenta célula conidiogênica denominada fiálide, em forma de ânfora ou frasco, que ocorre ao longo ou na porção terminal do micélio; os conídios, pequenos e ovais, podem se acumular na extremidade da fiálide^{27,47,78}
- Rinocladiela: apresenta conidióforos simples, com várias células conidiogênicas, onde se originam conídios geralmente ovais, com distribuição lateral ou apical^{27,47,78},
- Cladosporium: o tipo de frutificação caracteriza-se por apresentar célula alongada, lisa, fechada nas duas extremidades, apresentando facetas de articulação para se ligar com o conidióforo ou com outro conídio^{27,47,78}.

Recomenda-se o exame histopatológico para elucidar casos de resultados falso-negativos. Nos tecidos parasitados, os agentes de cromoblastomicose provocam uma resposta inflamatória de padrão misto, de natureza supurativa e granulomatosa²¹. Na epiderme, as principais características histológicas observadas são a hiperplasia pseudoepiteliomatosa ou acantose, podendo, às vezes, ocorrer hiperkeratose e abscessos queratinofílicos. Na derme, o infiltrado inflamatório contém nódulos granulomatosos confluentes, compostos por um

número variável de histiócitos, células epitelióides, células gigantes de Langerhans ou de corpo estranho, linfócitos, plasmócitos e polimorfonucleares. Os granulomas exibem um aspecto peculiar, que é a presença de polimorfonucleares neutrófilos^{43,97}. Os elementos muriformes e outras formas parasitárias podem ser encontrados no interior das células gigantes^{65,93}.

A cromoblastomicose sempre se constitui em desafio terapêutico a ser enfrentado pelo médico e paciente. Ao longo da história dessa micose, diversos foram os métodos e substâncias empregados e muitos, os fracassos. Vários medicamentos já foram utilizados no tratamento da cromoblastomicose, sendo o itraconazol e a terbinafina mais utilizados isoladamente ou em associação⁸⁹.

2 IMUNOPATOGENIA

Nas últimas décadas, na tentativa de melhor entender a patogênese desta doença, tem-se realizado estudos sobre a ultra-estrutura dos fungos, interação fungos-macrófagos, avaliação da resposta imune mediada por células, e citocinas relacionadas a esta resposta²⁵.

A apresentação dos antígenos aos linfócitos T na resposta imune específica mediada por células pode ser realizada por macrófagos, células dendríticas, células epidérmicas, incluindo células de Langerhans e possivelmente queratinócitos. Células dendríticas capturam antígenos em tecidos periféricos e migram para órgãos linfóides secundários onde adquirem a capacidade de estimular células T "naive". Por esta razão, as células dendríticas desenvolvem um papel crítico na indução de resposta de células T. Queratinócitos produzem uma variedade de citocinas incluindo IL-1, GM-CSF e TNF- α que influenciam a maturação de células dendríticas⁷².

Muitos dos microrganismos que penetram no hospedeiro são facilmente ingeridos e destruídos pelos fagócitos. Os fagócitos mononucleares, originam-se de promonócitos da medula óssea, os quais dão origem aos monócitos do sangue, que ao migrarem para os tecidos, transformam-se em macrófagos. Os macrófagos são ativados por uma variedade de estímulos durante a resposta imunológica. A fagocitose de partículas antigênicas age como um estímulo ativador inicial. As citocinas secretadas por linfócitos Th (T auxiliares) ativados, principalmente o IFN-gama, são potentes ativadores dos macrófagos. Por sua vez, os macrófagos ativados secretam citocinas que ativam linfócitos T e também expressam altos níveis de moléculas MHC-II (Complexo de Histocompatibilidade Principal II), o que aumenta sua função como célula apresentadora de antígeno. São capazes de fagocitar e digerir antígenos exógenos (microorganismos e partículas insolúveis) e endógenos (células mortas e restos celulares). Aderem-se às partículas antigênicas e emitem pseudópodos que as envolvem em fagossomos. Estes

dirigem-se para o interior da célula e fundem-se com os lisossomos, formando os fagolisossomos. A membrana celular dos macrófagos têm receptores para certas classes de anticorpos e para os componentes do complemento Fc e C3b⁷¹. Diante dos fatos, as reações granulomatosas observadas em cromoblastomicose são controladas como em muitas outras micoses⁷³, pelos fagócitos (neutrófilos polimorfonucleares e macrófagos teciduais). Estes mecanismos de defesa celular são ineficientes na eliminação do fungo, como confirmado pelas freqüentes observações de células muriformes viáveis em microambientes intracelulares (fagolisossoma de macrófagos ou citoplasma de células gigantes) ou extracelulares (abscessos de neutrófilos)¹.

Estudos prévios mostram que fungos patogênicos são capazes de sobreviver e multiplicar dentro de fagócitos. *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans* e *Blastomyces dermatitidis* foram descritos devido ao contínuo crescimento dentro de vacúolos endocíticos dos macrófagos^{26,36,44,49}, considerando que *Torulopsis glabrata* poderia sobreviver mas não se multiplicar nestes vacúolos³⁷. A virulência destes microrganismos está relacionada à habilidade de sobreviver e se multiplicar intracelularmente⁵⁶.

A persistência do fungo "in situ" é o principal fator responsável pela morbidez desta doença. Portanto, a persistência e a capacidade de multiplicação fúngica são retratadas como uma exuberante resposta inflamatória que estão relacionados à ausência do desenvolvimento de uma verdadeira reação granulomatosa. Isto é provavelmente uma consequência de fatores que inibiram a resposta Th1, com a predominância da resposta Th2²⁴.

Sabe-se que o desenvolvimento de células Th dentro dos subtipos Th1 e Th2 depende de diferentes fatores tal como o patógeno, células T, fatores derivados de células apresentadoras de antígenos (APC), diferentes categorias de células dendríticas, imunidade inata e citocinas produzidas por outras células^{51,55,57}.

Os macrófagos reconhecem os micróbios através de diversos receptores que funcionam para estimular a migração das células para o sítio da infecção, promover fagocitose dos micróbios e estimular a produção de substâncias microbidas para matar os micróbios⁹².

Karlsson e colaboradores demonstraram que, numerosos organismos apresentavam-se seletivos aos carboidratos, entretanto, aderindo as células do hospedeiro e do tecidos. A estrutura bioquímica da parede de células fúngicas têm um importante papel durante a invasão fúngica das mesmas. Verificou-se que a glicose é o maior componente da parede celular dos agentes da cromoblastomicose e que os gêneros *Fonsecaea*, *Phialophora* e *Cladophialophora* apresentam similaridade na composição celular consistindo principalmente de açúcares e proteínas^{37,88}.

Estudos demonstraram que açúcares como glicose, manose, galactose, ramnose e glucosamina eram componentes sacarídeos detectados em micélios e conídios de *Fonsecaea pedrosoi*⁸⁴. Polissacarídeos, localizados na camada externa da parede das células são responsáveis pelas reações com anticorpos⁴¹, receptores de lecitinas de plantas^{85,87} e fímbria de bactérias⁴¹.

Os lipídios da forma micelial de *Fonsecaea pedrosoi*, incluindo estruturas similares àqueles limitados pelo complexo melanina, induziu a reações granulomatosas em camundongos⁸¹. A porção peptídica do complexo pode ter um papel na quelação de cátions, competindo com outras proteínas do soro ligando metais do hospedeiro. Por outro lado, parte do carboidrato pode afetar o reconhecimento de células e a interação célula-célula importante para a sobrevivência da forma infectante fúngica. Estes aspectos ainda não foram elucidados⁴.

Segundo Rozental *et al.*, demonstrou-se que, macrófagos peritoneais murinos foram capazes de fagocitar os conídios de *Fonsecaea pedrosoi* que sobrevive e prolifera nos macrófagos dos tecidos infectados, em casos de cromoblastomicose. Entretanto, os autores verificaram que mesmo após 24 horas de interação, macrófagos foram incapazes de inativar o fungo, observando ainda

que 20% dos conídios diferenciaram-se em hifas. Os autores observaram contudo, que as alterações morfológicas do fungo (transformação conídio-hifa) bem como sua proliferação foram inibidas ou no mínimo demoradas. Estas observações indicam que os macrófagos peritoneais murinos ativados apresentavam uma ação fungistática e não-fungicida para este microrganismo. Em contraste, os neutrófilos foram capazes de matar *Fonsecaea pedrosoi* fora de células fagocíticas em períodos inferiores a 20 minutos de interação no processo fagocítico que independe da presença de anticorpos. Observações similares têm sido descritas por outros fungos^{73,74}. Van Wout *et al*, demonstrou que macrófagos residentes e macrófagos peritoneais ativados são incapazes de matar *Candida albicans*. Mas, quando os macrófagos foram pré-tratados com ambos BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) e PPD (proteína purificada derivada de tuberculina), foram capazes de matar cerca de 32% do fungo *Candida albicans*⁹⁵.

Gregório (1975) demonstrou a ultra-estrutura e as alterações patológicas causadas na membrana cório-alantóide do ovo de galinha e na pele humana que o fungo *Hormodendrum compactum* é fagocitado preferencialmente, se não exclusivamente, pelos macrófagos e células gigantes. Ele também é encontrado em situação extracelular. A fagocitose dos fragmentos dos fungos pelas células inflamatórias, como a destruição da membrana do vacúolo, com conseqüente contato direto do fungo com o citoplasma da célula inflamatória, sugeriu uma atividade de agressão recíproca, intensa, na interfase hospedeiro-parasito. Diante dos fatos, é proposto que deva existir uma constante estimulação antigênica pelo fungo, agente da cromoblastomicose, visto que, *in vivo*, ele produz grande quantidade de material através de sua parede celular³³.

A melanina apresenta pigmentos escuros de elevada massa molecular encontrada em humanos, animais, plantas e microrganismos. Este pigmento não é essencial para o crescimento ou desenvolvimento de células fúngicas, mas parece ser importante para proteção contra a influência ambiental, e aumenta a habilidade competitiva de algumas espécies em certos ambientes. Diante disso, foi descrito que os fungos com os conídios contendo melanina são mais resistentes à morte

pela radiação UV, raios-X ou radiação- γ , calor ou frio do que os conídios hialinos¹¹, constituindo-se em um dos mecanismos de escape que permite ao fungo demáceo sobreviver no ambiente hostil representado pelo meio tissular de um hospedeiro mamífero.

Schnitzeler *et al.* (1999) demonstraram que "in vitro", a melanina da parede celular de *Exophiala dermatitidis* protege o fungo da lise em fagolisossomos de neutrófilos experimentalmente infectados. O escape parasitário é baseado na capacidade do pigmento de bloquear o mecanismo oxidativo do neutrófilo, dificultando a capacidade do hospedeiro de eliminar o fungo demáceo infectante⁷⁹. Assim, melanina, lipídeos e possivelmente outros componentes da parede celular constituem fatores de virulência dos fungos demáceos^{34,55,79,98}.

Em suas pesquisas, Farbiarz *et al.* (1990) trabalhando com macrófagos do peritônio de camundongos, demonstraram que durante o processo fagocítico, partículas de melanina são liberadas pelo fungo *Fonsecaea pedrosoi*. Estas partículas podiam ser vistas no mesmo vacúolo fagocítico que continha o fungo ingerido, bem como em outros pequenos vacúolos citoplasmáticos³⁰. Portanto, a melanina presente na parede de células fúngicas, pode proteger então contra a destruição pelos fagócitos, promovendo a resistência à lise microbiana⁶⁸. Entretanto, essa mesma melanina pode induzir a produção de anticorpos antifúngicos e aumentar a eficiência da fagocitose, sugerindo que a melanina é uma estrutura imunologicamente ativa que pode ativar tanto a resposta celular quanto a humoral⁵.

A fagocitose de fungos ocorre geralmente após terem sido opsonizados. A ativação de complemento resulta no acúmulo de neutrófilos, portanto, o importante papel das opsoninas na fagocitose de células fúngicas, tais como blastoconídios de *Candida albicans*, conídios de *Aspergillus fumigatus* e dermatófitos são indiscutíveis. Entretanto, muitas áreas do organismo, como pulmão, fluido cérebro-espinhal e pele são pobres em complemento, e devido a muitos microrganismos interagirem com células fagocíticas em locais ausentes de soro, torna-se necessária a existência de outros mecanismos não-opsônicos, para a ocorrência

de fagocitose. Portanto, a proporção de vários fungos patógenos para ativar o sistema complemento é um importante pré-requisito para uma efetiva resposta imune antifúngica¹⁵.

Os poucos estudos realizados entre interação de células muriformes e fagócitos humanos, baseia-se em sistemas dependente de complemento. A fagocitose máxima de conídios de *Fonsecaea pedrosoi* ocorre em presença de complemento e anticorpos específicos. Esses achados sugerem que o complemento apresenta um importante papel na inflamação das infecções de *Fonsecaea pedrosoi* e defesa contra fungos demáceos⁹⁶. Portanto, as consequências biológicas da ativação do complemento são principalmente a defesa contra infecções piogênicas, a interação entre imunidade inata e adaptativa e a remoção de complexos-imunes e produtos da injúria tecidual, contribuindo significativamente na regulação da resposta imune⁹⁴.

Embora os mecanismos de defesa do hospedeiro contra a cromoblastomicose não sejam totalmente entendidos, estudos anteriores sugerem que a imunidade mediada pela célula têm um importante papel na proteção do hospedeiro contra os fungos³¹. Isto têm sido descrito extensivamente de modo que o óxido nítrico (NO) produzido pelos macrófagos ativados é um mecanismo de defesa primário contra muitos patógenos. Macrófagos ativados classicamente têm um importante papel na proteção contra patógenos intracelulares, aumentando explosão respiratória e a liberação de NO. Eles também exercem uma atividade anti-proliferativa e citotóxica, resultando na habilidade de secretar NO e citocinas pro-inflamatórias (TNF- α , interleucina 1- β (IL-1 β), IL-6). A produção de NO pela ativação da enzima óxido nítrico sintetase (iNOS) tem sido indicada como uma importante molécula efetora para a eliminação de uma variedade de patógenos, desde que antagonistas dessa enzima inibem a capacidade de macrófagos em eliminar patógenos "in vitro" e in vivo^{22,42,52}. Entretanto, a persistência do processo inflamatório sempre resulta em danos dos tecidos e um desafio do sistema imune: a forma de como podemos controlar a infecção contudo limitando os danos dos tecidos. Conseqüentemente, o desenvolvimento de mecanismos anti-inflamatórios

é obrigatório para sobrevivência do hospedeiro⁵⁴. Diferenças no grau de citotoxicidade mediada pelos macrófagos entre formas leveduriformes e de hifas de fungos dimórficos, haviam sido descritos em *Sporotrix schenckii*. Macrófagos peritoneais ativados *in vitro* com IFN- γ /LPS e produzindo elevados níveis de NO foram capazes de matar *Sporothrix schenckii*. Entretanto, a susceptibilidade para os efeitos microbianos de macrófagos ativados variou entre vários tipos de células fúngicas (conídios, hifas e IFN- γ /LPS)³⁴.

Philippe *et al*, demonstrou em seus experimentos “in vitro” com macrófagos alveolares murinos que, metabólitos tóxicos do oxigênio são componentes essenciais para eliminação de conídios de *Aspergillus fumigatus*. A inibição de NADPH oxidase, pela utilização de corticoesteróides é o principal fator relacionado com a redução da morte intracelular de conídios por macrófagos alveolares murinos, não alterando o processo de fagocitose. Ao contrário, a enzima óxido nítrico sintase não age na morte de conídios. Os mecanismos pelos quais os metabólitos tóxicos de oxigênio matam os conídios não estão claramente estabelecidos⁶².

Facchetti *et al*. (1999) evidenciaram a expressão da enzima sintetase óxido nítrico em células epitelióides e células gigantes multinucleadas em granulomas de etiologia infecciosa em seres humanos²⁹.

Células fagocíticas como os macrófagos alveolares e as mononucleares circulantes mostraram ter uma intensa atividade antifúngica contra *Penicillium marneffe*. A ativação destas células fagocíticas com M-CSF aumentou sua capacidade de eliminar conídios do fungo, por meio da explosão respiratória da célula⁷².

Sabe-se que após a implantação do agente no hospedeiro, a evolução da infecção deve depender de fatores inerentes ao parasita: virulência, viabilidade e quantidade de inóculo, e de fatores relacionados ao hospedeiro humano como idade, sexo, ocupação profissional, susceptibilidade genética e efetividade dos mecanismos de defesa específicos e inespecíficos. Recentemente, demonstrou-se que a maior frequência da molécula de histocompatibilidade HLA-A29 em

pacientes com cromoblastomicose sugere que a suscetibilidade genética também tenha influência na aquisição da doença. Pacientes com cromoblastomicose e portadores de maior frequência de HLA-A29, apresentam um risco estimativo 10 vezes superior para desenvolver manifestações clínicas da doença que indivíduos saudáveis pareados por raça, idade, sexo, profissão, e procedência geográfica³². Além deste fator, uma variedade de estudos indicam que pacientes neutropênicos, diabéticos, queimados, transplantados, além de outros imunocomprometidos, e os recém nascidos, também estão predispostos à aquisição de micoses⁸.

O estudo desses fatores, juntamente com as características do fungo patogênico e aspectos imunológicos do paciente, permitirá melhor conhecimento dessa relação hospedeiro-parasita nas infecções de cromoblastomicose.

Vários relatos demonstram uma grande diversidade em relação ao habitat dos agentes causadores de cromoblastomicose. Até agora na literatura é desconhecido a respeito das diferenças encontradas entre esses agentes, principalmente em relação a interação com células do sistema imune. Portanto, esse trabalho pretende avaliar se há diferenças entre os agentes causadores de cromoblastomicose do ponto de vista da interação com macrófagos peritoneais de camundongos.

3 OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da interação de macrófagos peritoneais residentes de camundongos BALB/c com os conídios dos principais agentes da cromoblastomicose, analisando as seguintes abordagens:

- Vias de fagocitose;
- Viabilidade do fungo;
- Produção de NO;
- Quantificação da secreção de citocinas;
- Expressão de moléculas co-estimulatórias e MHC-II.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 FUNGOS

Foram utilizadas as cepas dos fungos *Fonsecaea pedrosoi* (ATCC American Type Culture Collection - 46428), *Cladophialophora (Cladosporium) carrionii* (IMT Instituto de Medicina Tropical - 768), *Rhinocladiella aquaspersa* (IMT Instituto de Medicina Tropical - 691) e *Phialophora verrucosa* (FM Faculdade de Medicina - 2214). Estoques de cultura dos isolados foram mantidos em ágar Sabouraud dextrose (Merck –Darmsradt - Alemanha) à 28°C por 14 dias.

4.2 MEIO DE CULTURA UTILIZADO

O meio líquido caldo-Batata foi preparado utilizando 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. Esta mistura foi fervida até cozimento total da batata, por aproximadamente 30 minutos em banho-maria. Foram acrescentados 450 mL de água e filtrado em papel de filtro. Em seguida, acrescentou-se a glicose, o meio foi autoclavado por 15 minutos à 121° C e conservado à 4° C ¹⁶.

4.3 OBTENÇÃO DE CONÍDIOS DAS ESPÉCIES FÚNGICAS CAUSADORAS DA CROMOBLASTOMICOSE

Por analogia à técnica de microcultivo, que utiliza o ágar Batata, pobre em nutrientes, para se conseguir um número maior de conídios do fungo, foi utilizado o mesmo meio sem o ágar com a mesma finalidade, obtendo-se desta forma, grande número de conídios viáveis das espécies fúngicas causadoras da cromoblastomicose: *Cladophialophra carrionii*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Rhinocladiella aquaspersa* e *Phialophora verrucosa*.

Após crescimento do fungo, a colônia foi raspada com alça de platina em " L " e colocada em 50 mL de caldo-Batata em Erlenmeyer de 250 mL. Este inóculo

foi cultivado sob agitação constante por 4 dias, deixando em repouso por aproximadamente 30 minutos para que as hifas sedimentassem com espontaneidade e o sobrenadante, contendo os conídios foi recolhido com pipeta de bulbo. O número de conídios foi contado em câmara de Neubauer e ajustado de acordo com cada ensaio.

4.4 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 – Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em padrão sanitário livre de patógenos específicos (SPF).

4.5 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS

Os macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c através de lavagem com 3mL de meio de cultura RPMI 1640 (Sigma – Estados Unidos) contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab – Campinas, Brasil). Esta suspensão foi incubada com 1 mL do meio de cultura mantida por 1 hora em estufa (New Route - Fisher – Scientific) a 37° C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ para que os macrófagos aderissem à placa. As células não aderidas foram desprezadas e o meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino foi acrescentado à placa. As células foram mantidas por um período de 24 horas, em estufa a 37°C em 5% de CO₂, para que os macrófagos espraiassem.

4.6 OBTENÇÃO DE COMPLEMENTO

Para os ensaios de fagocitose que necessitam de complemento para opsonizar os conídios dos agentes da cromoblastomicose, utilizamos soro autólogo de camundongos BALB/c. Para obtermos o soro, os camundongos foram sacrificados e imediatamente, o coração foi exposto para punção do sangue com seringa de aplicação de insulina. Aproximadamente, 1 mL de sangue foi obtido de cada animal e imediatamente transferido para um tubo seco. Os tubos foram

mantidos por uma hora em banho-maria de 37°C. Logo em seguida, foram centrifugados por 10 minutos em 1500 rpm. O soro (sobrenadante) foi retirado e utilizado logo em seguida para não perder a atividade do complemento. O soro foi utilizado na concentração de 5% diluído em meio RPMI.

4.7 ENSAIOS DE FAGOCITOSE

4.7.1 Fagocitose de conídios dos agentes de cromoblastomicose na presença de açúcares

Para o teste de inibição de fagocitose por manana (Sigma – Estados Unidos), D-glicose (Synth – SP), L-lactose (Nuclear – SP) e D-sacarose (Reagen – RJ), macrófagos foram cultivados sobre lamínulas em placa de 24 poços (Costar 3594 – USA) por 24 horas a 37°C em 5% de CO₂. O número de células foi ajustado em câmara de Neubauer em 10⁵ macrófagos por poço. Foram incubados durante 40 minutos com diferentes concentrações de manana (25, 50 e 100 µg/mL), ou na presença de D-glicose, D-sacarose e L-lactose (25, 50 e 100 mM). Após este período, foram acrescentados à cultura os conídios na proporção de 4 conídios para cada macrófago e incubados durante 4 horas em estufa a 37°C em 5% de CO₂ e posteriormente, as lamínulas foram lavadas com Solução Salina de Fosfato Tamponada (PBS) para remoção de partículas não fagocitadas e coradas com Giemsa (NEWPROV - Paraná - Brasil). As lamínulas foram mantidas por 5 segundos em cada um dos corantes. Após a coloração, as lamínulas foram fixadas com Entellan (Merck-Alemanha) e posteriormente, analisadas em microscópio óptico comum (200x e 1000x).

Uma média de pelo menos 100 macrófagos foram contados para determinar o índice de fagocitose (IF), calculado como a média do número de células que fagocitaram vezes a média do número de conídios internalizados.

4.7.2 Fagocitose de conídios dos agentes de cromoblastomicose na presença de complemento

Para o teste de fagocitose que necessita de complemento, macrófagos foram obtidos como descritos no item 3.5. Foram acrescentados à cultura os conídios na proporção de 4 conídios para cada macrófago na presença de complemento a 5% e incubados durante 4 horas em estufa a 37°C em 5% de CO₂ e posteriormente, as lamínulas foram lavadas com PBS para remoção de partículas não fagocitadas e coradas com Giemsa (NEWPROV – Paraná - Brasil).

4.8 EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE DE MACRÓFAGOS

Macrófagos foram incubados em placas de Petri, e conídio dos fungos: *Cladophialophora carrionii*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa* e *Rhinocladiella aquaspersa*, numa relação de 4 conídios para cada macrófago. Essas culturas foram incubadas por um período de 24 horas e, posteriormente, analisadas quanto à expressão das moléculas de MHC classe II, CD80, CD86 por determinação da média de intensidade de fluorescência.

As moléculas de superfície celular analisadas foram: MHC classe II, CD80 e CD86, utilizando-se para isso os anticorpos anti-camundongo Ia^k (11-5.2) (0,2µg/mL), anti-camundongo CD80 (16-10A1) (0,2µg/mL), marcados com PE e anti-camundongo CD86 (GL1) (0,5µg/mL), marcado com FITC, todos da PHARMIGEN. Foram utilizados isotipos controle para cada anticorpo utilizado.

O número de macrófagos foi ajustado em câmara de Neubauer em 10⁶ células. Em seguida, esta quantidade de células foi transferida para duas placas de Petri, que foram incubadas respectivamente com 10⁶ conídios dos agentes de cromoblastomicose: *Cladophialophora carrionii*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa* e *Rhinocladiella aquaspersa*. As placas foram mantidas em estufa a 37°C em 5% de CO₂ por 24 horas. Após este período, foram separadas alíquotas de cada placa e adicionados os anticorpos para marcação α-MHC classe II, α-

CD80 e α -CD86). As células marcadas foram incubadas no gelo por 30 minutos e, em seguida, fixadas com solução contendo 2% de glicose, 1% de formaldeído, em PBS. As amostras permaneceram assim até análise, quando as células marcadas foram lavadas com PBS e, posteriormente, foi analisada a média de intensidade de fluorescência (MIF) por citometria de fluxo. Como controle, foram utilizadas células não estimuladas (Sigma – Estados Unidos).

Para análise por citometria de fluxo, foi utilizado o aparelho FacScalibur (Becton & Dickison – Canadá) do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Escola Paulista de Medicina. Os dados foram analisados utilizando-se o programa "Cell Quest "

5 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE FUNGICIDA DOS MACRÓFAGOS

5.1 ATIVIDADE FUNGICIDA DOS MACRÓFAGOS

5.1.1 Análise de viabilidade de conídios dos agentes da cromoblastomicose após fagocitose por macrófagos

Macrófagos foram obtidos e cultivados, como descrito anteriormente, em placas de 24 poços (Costar 3594 – USA), por 24 horas. Foram adicionadas às culturas, conídios dos agentes da cromoblastomicose em uma proporção de 4 conídios para cada macrófago e incubadas em estufa, a 37°C em 5% de CO₂ por períodos de 24, 48 e 72 horas. Após estes períodos, os sobrenadantes foram desprezados e as placas foram lavadas 3 vezes com PBS estéril para remoção de conídios não fagocitados. Em seguida, foi adicionado a cada placa, 1 mL de água destilada para lisar as células e promover a liberação de conídios que haviam sido internalizados. O conteúdo foi coletado com "cell scraper" e 100µL desta suspensão foram semeados em Sabouraud-dextrose ágar (Merck – Darmsradt –

Alemanha) e mantido a 25°C por 7 dias, para verificar unidades formadoras de colônias do fungo (CFUs).

5.1.2 Determinação da produção de óxido nítrico

Como descrito anteriormente (item 3.5.), macrófagos foram coletados e incubados com conídios de agentes da cromoblastomicose para dosagem de NO.

A produção de NO foi determinada indiretamente pela concentração de nitritos nos sobrenadantes das culturas. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA (Titertek-Multiscan), com filtro de 550nm, contra branco constituído por meio de cultura e reagente de Griess v/v. Os resultados foram expressos em μM , com base em uma curva padrão feita com concentrações conhecidas de nitrato de sódio em meio de cultura (5, 10, 30 e 60 μM de NO_2^-).

5.2 DETECÇÃO DE CITOCINAS

5.2.1 Em sobrenadante de cultura de macrófagos

Sobrenadante de cultura de macrófagos da linhagem de camundongos BALB/c, cultivados como descrito anteriormente (item 3.5.), foram coletados após 4, 12, 24 e 48 horas e testados para detecção de citocinas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α), segundo normas do fabricante (R&D System).

5.2.2 Condições da reação

A dosagem de citocinas foi feita quantitativamente pelo método de ELISA, usando como parâmetro uma curva padrão feita a partir de diluições dos padrões de citocinas recombinantes. Os poços foram sensibilizados com 0,2 μg de anticorpos monoclonais, por 12 horas, à 4°C. Em seguida, as placas (Costar 3590 – USA) foram lavadas 4 vezes com PBS-T (Solução Salina de Fosfato

Tamponada – Tween) e bloqueadas com BSA (Albumina de Soro Bovino), por 3 horas, à 4°C. Após serem novamente lavadas, foram adicionados 100µl do sobrenadante de cultura ou soros de camundongos diluídos a 1:50 e os padrões (citocinas recombinantes de camundongos–R&D), incubando-se por 12 horas, à 4°C. Após nova etapa de lavagem, anticorpo biotinilado específico (0,1µg) foi adicionado e seguido de nova etapa de incubação por 12 horas à 4°C. As placas foram lavadas novamente e os conjugados específicos adicionados (streptavidina–peroxidase–Sigma), na diluição de 1: 1000 e incubados por 30 minutos, à 4°C.

A reação foi concluída pela adição do substrato (ácido cítrico 0,03 M, fosfato de sódio 0,05 M e 10 µl de H₂O₂) contendo OPD (orthophenylenediamine – Sigma) 500µg/mL. A reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 4 N e a leitura realizada em leitor de ELISA (Multiskan MCC/340 II EIA reader) a 492 nm. As concentrações de cada citocina foram calculadas com base na equação da reta de regressão linear, da curva padrão obtida com citocinas recombinantes murinas.

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados pelo método One-Way ANOVA e múltiplas comparações pelo teste de Tukey. O nível de significância admitido foi de $p \leq 0,05$, em todas as amostras realizadas.

6 RESULTADOS

6.1 ENSAIOS DE FAGOCITOSE

6.1.1 Fagocitose de conídios dos agentes etiológicos da cromoblastomicose em presença de açúcares

Com a finalidade de verificar se a via de receptores de açúcares atua de forma significativa no processo de fagocitose, macrófagos de camundongos BALB/c foram incubados com manana em concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ ou com: D-glicose, L-lactose e D-sacarose na concentração de 100 mM durante 30 minutos. Após este período, foram acrescentados à cultura, conídios dos principais agentes da cromoblastomicose como: *Cladophialophora carrionii*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa* e *Rhinocladiella aquaspersa* em uma relação de 4 conídios para cada macrófago e avaliou-se o índice de fagocitose. Além disso, observou-se que nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de manana e 25 e 50mM de D-glicose, L-lactose e D-sacarose não apresentaram variação no índice fagocítico quando incubados com macrófagos e conídios dos fungos citados anteriormente.

A fagocitose dos principais agentes da cromoblastomicose é observada na figura 1 dos fungos *C. carrionii* (A), *F. pedrosoi* (B), *P. verrucosa* (C) e *R. aquaspersa* (D).

Como mostra a figura 2, a inibição da fagocitose dos conídios na presença dos açúcares: manana, D-glicose e L-lactose foi significativa nos agentes *Fonsecaea pedrosoi* e *Rhinocladiella aquaspersa*. Ressaltando que, a *Phialophora verrucosa* na presença de lactose obteve uma maior inibição. *Cladophialophora carrionii* foi o único fungo que não apresentou inibição na fagocitose na presença dos açúcares.

Os resultados também mostraram que o monossacarídeo sacarose não interfere no processo de fagocitose dos conídios pelos macrófagos.

Figura 1 – Macrófagos incubados com conídios dos principais agentes da cromoblastomicose.

Figura 2 – Índice de fagocitose - macrófagos incubados com conídios dos principais agentes da cromoblastomicose em 100µg/mL de manana e 100mM de D-glicose, L-lactose e D-sacarose.

Controle - Macrófagos cultivados com conídios de cada agente etiológico da cromoblastomicose em uma relação de 4 conídios para cada macrófago; na ausência de açúcares.

* $p < 0,05$ quando comparados com o controle.

6.1.2 Fagocitose de conídios dos agentes etiológicos da cromoblastomicose na presença de Complemento

Para verificar o papel dos receptores de complemento, realizamos a opsonização dos conídios dos principais agentes da cromoblastomicose empregando proteínas do sistema complemento obtido de soro autólogo de

camundongos BALB/c, o que resultou no favorecimento da fagocitose. Como mostra a figura 3, houve um aumento significativo da capacidade fagocítica dos fungos *Rhinocladiella aquaspersa*, *Phialophora verrucosa* e *Cladophialophora carrionii*. Entretanto, não observamos diferença no índice de fagocitose quando o fungo *Fonsecaea pedrosoi* foi utilizado.

Figura 3 – Índice de fagocitose de macrófagos incubados com conídios opsonizados com o complemento (5%)

Controle - macrófagos incubados com conídios na ausência de complemento

*** $p < 0,05$ quando comparados com o controle.**

6.2 EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE DE MACRÓFAGOS NA PRESENÇA DE CONÍDIOS DOS PRINCIPAIS AGENTES DE CROMOBLASTOMICOSE

Macrófagos peritoneais de camundongos foram cultivadas na presença de conídios dos principais agentes de cromoblastomicose: *C. carrionii*, *F. pedrosoi*, *P. verrucosa* e *R. aquaspersa*. Empregando-se a técnica de citometria de fluxo, a população celular obtida foi analisada avaliando-se a expressão dos marcadores CD80, CD86 e MHC-classe II, expressos na superfície destas células. Como mostra a figura 4, o perfil da população de células obtidas em cultura, caracteriza fenotipicamente a expressão das moléculas CD80, CD86 e MHC-II.

Figura 4 – Caracterização fenotípica de macrófagos peritoneais de camundongos.

Macrófagos do peritônio foram marcados com os anticorpos: anti-camundongo I-A^K, anti-camundongo CD80, marcados com o conjugado PE (MHC-II e CD80) ou anti-camundongo CD86, marcados com o FITC e analisadas por citometria de fluxo. Os histogramas acima demonstram a expressão dos marcadores de superfície dos macrófagos peritoneais murinos com os conídios dos principais agentes de cromoblastomicose.

A análise dos resultados demonstra que os macrófagos cultivados com conídios dos principais agentes de cromoblastomicose, após a fagocitose dos mesmos, diminuíram significativamente a expressão das moléculas de superfícies, tais como CD80, CD86 e MHC classe II.

Figura 5 – Média de intensidade de fluorescência (MIF) – moléculas de superfície celular de macrófagos cultivados com conídios dos principais agentes de cromoblastomicose
Controle – somente macrófagos (MO)

6.3 ATIVIDADE FUNGICIDA DOS MACRÓFAGOS

Com a finalidade de verificar por quanto tempo os conídios dos principais agentes da cromoblastomicose permaneciam viáveis no interior dos macrófagos, estas células foram incubadas em placas de 24 orifícios, com conídios do fungo em uma relação de 4 conídios para cada macrófago. As placas foram mantidas por períodos de 24, 48 e 72 horas. Em seguida, as placas foram lavadas para retirar os conídios não fagocitados e as células lisadas. A suspensão final foi semeada em Sabouraud-dextrose ágar, mantida a 37°C por 5 dias, quando as unidades formadoras de colônia dos fungos foram formadas e puderam ser contadas.

Através da análise dos resultados, verificou-se que a partir do tempo de 24h, os conídios apresentavam-se totalmente viáveis em todos os agentes da cromoblastomicose. Observando que *F. pedrosoi* foi o único que mostrou-se pouco viável no período de 72 horas. A *R. aquaspersa* no período de 48 horas apresentou uma pequena diminuição na viabilidade dos conídios. Os conídios de *P. verrucosa* mantiveram-se viáveis nos 3 diferentes tempos. O *C. carrionii* após o tempo de 24 horas, demonstrou um pequeno aumento na viabilidade de seus conídios. Entretanto, nenhum desses resultados foram estatisticamente diferentes.

Figura 6 – Unidades formadoras de colônias (CFU) dos principais agentes da cromoblastomicose obtidas após 24, 48 e 72 horas de incubação.

6.4 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE FUNGICIDA DOS MACRÓFAGOS

6.4.1 Determinação da produção de óxido nítrico

A figura 7 mostra que no tempo de 4 horas a produção de NO não foi significativa para todos os agentes da cromoblastomicose. *F. pedrosoi* mostrou um aumento significativo da produção de NO no tempo de 12 horas, ocorrendo uma queda no tempo de 24 e 48 horas. *C. carrionii* apresentou uma maior produção de NO no tempo de 12 horas. Ao contrário, *R. aquaspersa*, a produção de NO foi

intensa no tempo de 24 horas. E somente *P. verrucosa*, apresentou-se constante na produção de NO nos três diferentes tempos (4, 12 e 48 horas). Foi possível também observar que após 48 horas de incubação os níveis de NO foram significativamente inibidos para os fungos *C. carrionii*, *F. pedrosoi* e *P. verrucosa* quando comparados com os controles.

Figura 7 - Produção de óxido nítrico por macrófagos de camundongos BALB/c estimulados com conídios dos principais agentes da cromoblastomicose e IFN- γ + LPS como controle positivo de ativação.

* $p < 0,05$ quando comparado com controles negativos (apenas macrófagos).

6.5 DETECÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

6.5.1 Em sobrenadante de cultura de macrófagos

A seguir dosamos as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 no sobrenadante de cultura dos ensaios de fagocitose. A análise dos resultados mostrou que macrófagos na presença de *Fonsecaea pedrosoi* e *Rhinocladiella aquaspersa* apresentaram aumento significativo da síntese de IL-1 β principalmente após 48 horas de incubação. Ao contrário, *Cladophialophora carrionii*, houve um aumento da produção de IL-1 β após 24 horas de incubação. *Phialophora verrucosa* apresentou pequena síntese de IL-1 β no tempo de 4 horas (figura 8), porém esse aumento não foi significativo.

Figura 8 - Produção de IL-1 β por macrófagos de camundongos Balb/c cultivados com conídios dos principais agentes da cromoblastomicose.

* $p < 0,05$ quando comparados com controles negativos (somente macrófagos)

A figura 9 mostra que houve aumento significativo de IL-6 quando macrófagos foram incubados por 12 horas com o fungo *R. aquaspersa*. *F. pedrosoi* não apresentou produção significativa de IL-6 em relação ao controle, porém somente no tempo de 24 horas há uma pequena produção desta citocina. Entretanto, o fungo *C. carrionii* obteve um pico constante da síntese de IL-6 nos três diferentes tempos (4, 24 e 48 horas).

Figura 9 - Produção de IL-6 por macrófagos de camundongos BALB/c cultivados com conídios dos principais agentes da cromoblastomicose.

* $p < 0,05$ quando comparados com controles negativos (somente macrófagos)

Em relação à síntese de TNF- α , os principais agentes da cromoblastomicose apresentaram produção significativa nos 4 diferentes tempos, ressaltando que *C. carrionii* obteve maior síntese desta citocina no período de 24 horas, porém em menor quantidade nos tempos de 4, 12 e 48 horas; *F. pedrosoi*

nos tempos de 4, 24 e 48 horas permaneceram constantemente elevados; *P. verrucosa* aumentou de forma gradativa nos três diferentes tempos (4, 24 e 48 horas) e *R. aquaspersa* apresentou um pico elevado no período de 12 e 48 horas (figura 10).

Figura 10 – Produção de TNF- α por macrófagos de camundongos BALB/c cultivados com conídios dos principais agentes da cromoblastomicose.

* $p < 0,05$ quando comparados com controles negativos (somente macrófagos)

7 RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS APRESENTADOS

Fungos	Agentes	Açúcares	Complemento	Viabilidade	Pico de Produção (horas)			
					NO (µM/mL)	IL-1β(pg/mL)	IL-6(pg/mL)	TNF-α/mL)
<i>C.carrionii</i>	(-)		(+)	Viáveis após 72 horas	12 h (-) 48 h	24 h	4 h	24 h
<i>F.pedrosoi</i>	Man/Gli/Lac		(-)	Idem	12 h (-) 48 h	48 h	(-)	24 h
<i>P.verrucosa</i>	Lac		(+)	Idem	(-) (-) 48 h	(-)	(-)	48 h
<i>R.aquaspersa</i>	Man/Gli/Lac		(+)	Idem	24 h n.h.i	48 h	12 h	48 h

C.carrionii = *Cladophialophora carrionii*

F.pedrosoi = *Fonsecaea pedrosoi*

P.verrucosa = *Phialophora verrucosa*

R.aquaspersa = *Rhinocladiella aquaspersa*

Man = manana

Gli = glicose

Lac = lactose

Sac = sacarose

n.h.i = não houve inibição

8 Discussão

Considerando a cromoblastomicose como uma micose endêmica em nosso país, com alta morbidade, até hoje pouco se conhece sobre a relação hospedeiro-parasita. Alguns estudos têm focado esta interação, demonstrando a predominância da resposta imune celular, com a ativação de macrófagos envolvendo a fagocitose dos fungos³⁶. De maneira geral, nosso sistema imunológico é capaz de eliminar ou pelo menos controlar a maioria das infecções fúngicas. As formas graves de doença quase sempre estão associadas a algum tipo de deficiência imunológica. Até agora, os trabalhos realizados são insuficientes para esclarecer a resposta inata por macrófagos. Como esta resposta representa um mecanismo de extrema importância na primeira linha de defesa do organismo, estudamos a interação dos principais agentes da cromoblastomicose com macrófagos peritoneais murinos para entendermos alguns pontos relacionados com a principal característica desta micose, a cronicidade observada nas lesões e conseqüente persistência da infecção no organismo do hospedeiro. Por outro lado, observar se há diferenças entre os vários agentes de cromoblastomicose em relação com a interação com macrófagos.

Muitos dos microrganismos que penetram no hospedeiro são facilmente ingeridos e destruídos pelos fagócitos. Os fagócitos mononucleares, ou macrófagos, nos quais persistem os microrganismos ingeridos, contribuem para a resposta imune adaptativa como células apresentadoras de antígeno profissionais³⁷.

Os mecanismos de defesa celular dos fagócitos são ineficientes na eliminação do fungo patogênico³⁵. Estudos mostram que fungos como *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans* e *Blastomyces dermatitidis* apresentaram um contínuo crescimento dentro de vacúolos endocíticos dos macrófagos^{38,39}. Sugerindo, portanto, que a persistência e a capacidade de multiplicação fúngica é retratada como uma exuberante resposta inflamatória que

estão relacionados à ausência do desenvolvimento de uma verdadeira reação granulomatosa³⁵.

O reconhecimento e a fagocitose dos microrganismos ocorrem através de uma variedade de receptores presentes nos macrófagos⁴⁴. Alguns receptores fagocíticos reconhecem açúcares comuns na parede de microrganismos, sendo denominados receptores lecitina. Entre eles estão o receptor manose e o receptor β -glucano. O receptor manose é uma proteína transmembrana de 175 kDa expresso em macrófagos e células dendríticas que reconhece oligo-manoses, α -ligadas como as presentes no zimosan e na manana. O receptor β -glucano reconhece oligossacarídeos ligados através de ligação β e em conjunto com o receptor manose participa do reconhecimento de microrganismos⁶⁶.

Neste trabalho, avaliamos a interação dos macrófagos com conídios dos principais agentes da cromoblastomicose. Verificamos que, com a inibição dos receptores de manose houve uma diminuição significativa da fagocitose para os fungos *P. verrucosa* e *C. carrionii*. Além da importância da manose, outros açúcares como glicose e lactose, também inibiram a fagocitose desses fungos. A presença de L-lactose foi capaz de inibir eficientemente a fagocitose de *P. verrucosa*. Esses resultados mostraram uma grande diversidade na interação dos diferentes agentes de cromoblastomicose com receptores de açúcares em macrófagos, sugerindo uma complexa série de interações entre o fungo ligante e os receptores dos macrófagos no processo de fagocitose⁶⁷.

Em um estudo envolvendo a adesão de fungos patogênicos às células e às proteínas do hospedeiro, verificou-se que a glicose é o maior componente da parede celular dos agentes da cromoblastomicose observando a similaridade da composição celular nos gêneros de *Fonsecaea*, *Phialophora* e *Cladophialophora*⁴⁶.

O sistema complemento é um dos principais mecanismos pelos quais o reconhecimento do antígeno é convertido em defesa efetiva contra a infecção. O complemento é um sistema de proteínas plasmáticas que pode ser ativado por anticorpos, levando a uma cascata de reações que ocorrem na superfície dos patógenos, e gera componentes ativos com várias funções efetoras. Além da lise

celular, outras funções biológicas também importantes são geradas durante o processo de ativação do complemento: produção de fragmentos protéicos que facilitarão a fagocitose de microrganismos (opsoninas); produção de fatores quimiotáticos que atrairão para o local da ativação células inflamatórias; produção de fragmentos protéicos para desgranular mastócitos (anafilatoxinas); estímulo da síntese de imunoglobulinas; etc¹.

A fagocitose de fungos ocorre geralmente após terem sido opsonizados .A ativação de complemento, resulta na acumulação de neutrófilos, portanto, o importante papel das opsoninas na fagocitose de células fúngicas tais como blastoconídios de *Candida albicans* e conídios de *Aspergillus fumigatus* é indiscutível . Entretanto, devido a muitos microrganismos interagirem com células fagocíticas em locais ausentes de soro, torna-se necessária a existência de outro mecanismos não-opsônicos, para a ocorrência de fagocitose⁵⁹.

Em outro trabalho, verificou-se a interação de células muriformes e fagócitos humanos, que baseavam-se em sistemas dependente de complemento onde a fagocitose máxima de conídios de *Fonsecaea pedrosoi* ocorria em presença de complemento. Esses achados sugerem que o complemento desempenham importante papel na inflamação das infecções de *Fonsecaea pedrosoi* e defesa contra fungos demáceos⁶⁰. Em nossos experimentos os receptores de complemento mostraram uma grande influência no processo de fagocitose, para os fungos *C. carrionii*, *P. verrucosa* e *R. aquaspersa*, onde o aumento na internalização foi observado na presença desse estímulo. Entretanto, nossos resultados entram em contradição com os achados descritos acima, visto que o fungo *F. pedrosoi* apresentou-se constante na fagocitose mesmo na presença de complemento, mostrando que essa via não deva ser a principal, para a internalização desse fungo.

Porém, a fagocitose de conídios dos principais agentes de cromoblastomicose: *C. carrionii*, *F. pedrosoi*, *P. verrucosa* e *R. aquaspersa* tiveram conseqüências funcionais para os macrófagos, pois resultou na diminuição significativa da expressão de suas moléculas de superfície, tais como CD80, CD86

e MHC classe II. É provável que o processo de ativação de linfócitos T, via apresentação de antígenos esteja prejudicado. Talvez a inibição da resposta imune adaptativa seja um mecanismo de escape utilizado pelos fungos para se adaptarem ao hospedeiro.

A viabilidade de conídios dos fungos fagocitados por macrófagos foi avaliada pela contagem do número de unidades formadoras de colônias. Observamos que *Fonsecaea pedrosoi* foi o único agente etiológico da cromoblastomicose que apresentou uma menor viabilidade no tempo de 72 horas, porém essa diferença não foi significativa. Entretanto, *Rhinocladiella aquaspersa*, *Phialophora verrucosa* e *Cladophialophora carrionii* apresentaram viabilidade constante nos três diferentes tempos (24, 48 e 72 horas), ou seja, continuavam viáveis mesmo após 72 horas de interação com os macrófagos.

Macrófagos peritoneais murinos foram capazes de fagocitar os conídios de todos os agentes de cromoblastomicose, sendo incapazes de destruí-los. Entretanto, como os níveis de CFUs foram praticamente constantes, nossos resultados são similares aos descritos por Rozental *et al* indicando que a proliferação dos fungos foram inibidas ou no mínimo demoradas, indicando que os macrófagos peritoneais murinos apresentavam um efeito fungistático e não-fungicida contra os fungos testados⁷³.

Em outro trabalho, verificou-se que macrófagos residentes e macrófagos peritoneais ativados estimulados com BCG e PPD, foram capazes de matar cerca de 32% do fungo *Candida albicans*⁵⁴.

A proteção contra infecções causadas por bactérias^{70, 72}, protozoários⁷³ ou fungos^{74, 75} relaciona-se diretamente com a expressão de resposta imune mediada por células e a atividade microbicida expressa em macrófagos ativados⁷³.

Por essa razão nosso próximo passo foi verificar a capacidade microbicida dos macrófagos associada à produção de NO. Assim sendo, a produção de NO foi quantificada no sobrenadante de cultura de macrófagos, após 4, 12, 24 e 48 horas de fagocitose. Nossos resultados mostram que os macrófagos estimulados com diferentes agentes da cromoblastomicose obtiveram uma produção elevada de NO

no período de 12 horas principalmente na presença de *Fonsecaea pedrosoi*, entretanto, o macrófago não foi capaz de eliminar o fungo. Ao contrário, no período de 24 horas ocorreu uma queda na produção de NO, a qual não sabemos ao certo quais mecanismos estariam envolvidos. Com exceção da *Rhinocladiella aquaspersa*, os demais agentes da cromoblastomicose apresentaram uma diminuição na produção de NO no tempo de 48 horas.

A produção de NO pela ativação da enzima óxido nítrico sintetase (iNOS) tem sido indicada como uma importante molécula efetora para a eliminação de uma variedade de patógenos, desde que antagonistas dessa enzima inibem a capacidade de macrófagos em eliminar patógenos *in vitro* e *in vivo*^{62, 63, 64}. Sabe-se que a produção de NO por vários tipos de células, como as endoteliais⁷⁰, os hepatócitos⁷⁸ e os macrófagos⁷⁹, ocorre pela ativação de IFN- γ ou LPS. A liberação de NO, produzido por macrófagos ativados, tem um papel importante na morte de diferentes patógenos⁸⁰. Esses experimentos *in vitro* mostraram que NO derivado de macrófagos ativados exerce uma atividade anti-proliferativa e citotóxica, contra uma variedade de patógenos como *L. major*⁸⁰, *M. bovis*⁸¹, *T. cruzi*⁸², incluindo alguns fungos, como *Cryptococcus neoformans*⁸³. Isso resulta na habilidade de secretar NO e citocinas pro-inflamatórias (TNF- α , interleucina 1- β (IL-1 β), IL-6)⁶⁵. Esses relatos sugerem que em nosso trabalho a incapacidade dos macrófagos de destruir os agentes de cromoblastomicose pode estar relacionado com a queda nos níveis de NO, principalmente após 48 horas de interação.

Demonstramos que macrófagos infectados por agentes da cromoblastomicose produziam altos níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , citocinas que possuem atividades biológicas superpostas. Esses resultados podem indicar que tanto a IL-1 β quanto o TNF- α podem aumentar a capacidade de monócitos produzirem outros mediadores inflamatórios tais como a IL-6. A IL-6, como um fator de ativação de célula T ou co-estimulante de célula T, pode fornecer, pelo menos em parte, o segundo sinal (antígeno inespecífico) que se faz necessário na ativação da célula T, além do antígeno ou do mitógeno. Não sabemos ao certo

quais atividades biológicas conferidas à IL-1 β ou ao TNF- α são, na verdade, mediadas pela IL-6¹.

O fator de Necrose Tumoral (TNF), citocina liberada por células fagocíticas mononucleares ativadas, tem um papel regulador na produção de gama interferon e outras linfocinas. Seu papel é importante para ativação T independente de macrófagos e a produção de gama interferon. O gama interferon por sua vez, ativa macrófagos que inibem a replicação do fungo, indicando que o TNF não é somente um mediador citotóxico liberado pelos macrófagos. Citotoxicidade é também mediada pelas espécies reativas do oxigênio, tal como peróxidos e NO, que podem ser induzidos pelo TNF⁸⁴. Estudos demonstram que TNF também atua na formação de granulomas promovendo o agrupamento e a diferenciação de macrófagos em células epitelióides⁶⁷.

Estudos “in vitro” demonstraram que, macrófagos murinos infectados com *Paracoccidioides brasiliensis* liberavam níveis detectáveis de TNF- α no tempo de 48 e 72 horas, mas não no tempo de 24 horas de cultura⁸⁶. Entretanto, em nosso trabalho demonstramos que os níveis de TNF- α foram significativos nos dois diferentes tempos utilizados, principalmente para os fungos *Cladophialophora carrionii* e *Fonsecaea pedrosoi* no tempo de 24 horas e, *Phialophora verrucosa* e *Rhinocladiella aquaspersa* no tempo de 48 horas.

Um outro aspecto a ser discutido é o fato de os conídios dos principais agentes da cromoblastomicose não terem induzido os macrófagos em nossos experimentos a secretarem IL-10 e, ao contrário, induziram a secreção de uma alta quantidade de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , principalmente.

Nossos resultados permitiu-nos concluir que apesar dos diferentes fungos causarem a mesma patologia, apresentaram uma grande diversidade na interação com macrófago, tanto a nível de vias de entrada como na produção de citocinas e NO. Estes dados podem sugerir que dependendo do agente etiológico na cromoblastomicose podem levar a uma resposta imunológica diferente e conseqüentemente alterar a evolução da doença.

9 CONCLUSÃO

A análise dos resultados descritos anteriormente permite algumas conclusões, tais como:

1. Os conídios dos principais agentes de cromoblastomicose foram fagocitados por macrófagos, e verificamos que o receptor de manose foi importante para os fungos *Fonsecaea pedrosoi* e *Rhinocladiella aquaspersa*. Além da manose, outros açúcares como glicose e lactose também foram significativos na inibição da fagocitose.
2. Conídios dos principais agentes de cromoblastomicose, afetam as principais funções biológicas dos macrófagos peritoneais de camundongos, inibindo a expressão das moléculas de MHC-II e co-estimulatórias (CD80/CD86);
3. A viabilidade dos fungos foram elevados em vários períodos testados sugerindo que os macrófagos não foram capazes de eliminá-los;
4. A produção de NO foi significativa para os fungos: *Fonsecaea pedrosoi* (12 horas) e *Rhinocladiella aquaspersa* (24 horas). Observamos que após o tempo de 48 horas, os fungos *Cladophialophora carrionii*, *Fonsecaea pedrosoi* e *Phialophora verrucosa*, apresentaram diminuição da produção de NO, comprovando os resultados descritos anteriormente, visto que, os fungos após o tempo de 72 horas apresentavam-se viáveis;
5. Após fagocitarem os conídios, os macrófagos secretaram alta quantidade de IL-1 β e IL-6, para os fungos *Cladophialophora carrionii* e *Rhinocladiella aquaspersa*. Ao contrário, na síntese de TNF- α , todos os agentes

de cromoblastomicose secretaram esta citocina, porém não houve produção de IL-10.

10 REFERÊNCIAS

1. ABBAS A. K., LICHTMAN A. H., POBER J. S. **Imunologia celular & molecular**. 4^a ed. Rio de Janeiro: Ed Revinter, 2003.
2. AJELLO, L.; GEORG, L.K. A case of phaeohyphomycosis caused by new species of *Phialophora* Harlowe.v.66, p.490-498, 1974.
3. AL-DORRY, Y. **Chromomycosis**. Missoula.: Mountain Press, 1972, 203p.
4. ALVIANO, C. S.; FARBIARZ, S. R., de SOUZA, W., ANGLUSTER, J. & TRAVASSOS, L. R. Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melanin. **Journal of General Microbiology**, v.137, p.837-844, 1991.
5. ALVIANO, D.S.; FRAZEN, A.J.; TRAVASSOS, L.R.; HOLANDINO, C.; ROZENTAL, S.; EJZEMBERG, R.; ALVIANO, C.S.; RODRIGUEZ, M.L.Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of phagocytes. **Infection and Immunity**. 72 (1): 229-237, 2004.
6. ANTHONY, T.C.; McALEER R. Chromomycosis. Report of a case from West Austrália. **Australas J. Dermatol**. 7:13, 1963.
7. ARELLANO-OCAMPO F. TAMAYO PEREZ R. VICTORIA R. Cuatro casos de cromomicosis por *Cladosporium carrionii* y su tratamiento. **Der ILA**, 10:309, 1968.
8. ARMSTRONG, D. Treatment of opportunistic fungal diseases. **Rev. Infect. Dis.**, Chicago, v.1, p. 1-9, 1993.

9. BARBA-GÓMEZ, J.F.; MYORGA, J.; MCGINNIS, M.R.; GONZÁLES-MENDOZA, A. Chromoblastomycosis caused by *Exophiala spinifera*. **J. Am. Acad. Dermatol**, St. Louis, v. 26, p. 367-70, 1992.
10. BATRES E, WOLF E, RUDOLPH A. H.; KNOX, J. M. Transepithelial elimination of cutaneous chromomycosis. **Arch Dermatol**. v.114, p. 1231-1232, 1978.
11. BELL, A. A. & WHEELER, M. H. Biosynthesis and functions of melanins. *Annual Review of Phytopathology*, v.24, p.411-451, 1986.
12. BORELLI, D. *Acrotheca aquaspersa* nova species agente de cromomycosis. **Acta. Cient. Venez.**, v.23, p.193-196, 1972.
13. BORELLI D. Casual agents of chromoblastomycosis (chromycocetes) **Proceedings of the International Conference on the Mycoses**. PAHO Sc Publ 396, 334-5, 1980.
14. BRYGOO, E. R.; DESTOMBES, P. Épidémiologie de la chromoblastomycose humaine. **Bull. Inst. Pasteur.**, Paris, v. 74, p. 219-243, 1976.
15. CALICH, V.;VAZ, C. **Imunologia**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Revinter, 2001.
16. CAMPOS, M.R.M. Interação de *Trichophyton rubrum* com macrófagos peritoneais de camundongos. São Paulo. 2004. **Tese de mestrado**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
17. CARRION, A.L. Chromoblastomycosis. **Micologia**, v.34, p. 424-441, 1942.

18. CASTRO L. G. M. Chromomycosis: a therapeutic challenge (letter). **Clin Infect Dis**, Chicago, v. 15, p.553-554, 1992.
19. CASTRO, L.G.M. Tratamento da cromoblastomicose pela criocirurgia com nitrogênio líquido. São Paulo, 1998. 78p. (Tese de doutorado-Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo).
20. CLARK, I.A. & ROCKETT, K.A. Nitric oxide and parasitic disease. **Adv. Parasitol**, v.37, p.1-56, 1996.
21. CORRADO, B.; KRAMER, M.; CUMMINGS, M.; ENG, R.H. Susceptibility of dematiaceous fungi to amphotericin B, miconazole, ketoconazole, flucytosine and rifampin alone and in combination. **Sabouraudia**, v. 20, p. 109-113, 1982.
22. D'ÁVILA, S. C. G. P.; PAGLIARI, C.; DUARTE, M. I. S. The cell-mediated immune reaction in the cutaneous lesion of Chromoblastomycosis and their correlation with different clinical forms of the disease. **Mycopathologia**, v.156, p. 51-60, 2002.
23. 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 apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
24. DIAMOND, R. D. & BENNETT, J. E. Growth of *Cryptococcus neoformans* within human macrophages in vitro. **Infection and Immunity**, v.7, p.231-236, 1973.

25. ESTERRE, P.; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A.; RAMARCEL, E. R.; PECARRERE, J. L. Forty years of chromomycosis in Madagascar: a review. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 55, n.1. p.45-47, 1996a.
26. FACCHETTI, F. Expression of inducible oxide synthase in human granulomas and histiocytic reaction. **Am. J. Pathol.**, v. 154, n.1, p. 145-152, jan.1999.
27. FARBIARZ, S. R., CARVALHO, T. U., ALVIANO, C. S. & de SOUZA, W. Fine structure and cytochemistry of the interactions between *Fonsecaea pedrosoi* and mouse resident macrophages. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.28, p.375-385, 1990.
28. FUCHS J. & PECHER, S. Partial supression of cell mediated immunity in chromoblastomycosis. **Mycopathologia**. v. 119, p. 73-76, 1992.
29. GRANGER, D. L.; HIBBS, J.B.; PERFECT, J. R. & DURACK, D. T. Specific amino acid (L-arginine) requirement for the microbiostatic activity of murine macrophages. **J. Clin. Invest**, v.81, p. 1129-1136, 1988.
30. GREGÓRIO, E.A. Ultra-estrutura de *Hormodendrum compactum* e das alterações patológicas causadas em membrana cório-alantóide do ovo de galinha e na epiderme humana. Ribeirão Preto, 1975 (Dissertação de mestrado-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto).
31. HIBBS, J.B. Jr.; VAVRIN, Z.; TAINTOR, R.R. L- Arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. **J. Immunol**, v.138, p.550-565, 1987.

32. HOFFMAN, M.; WEINBERG, J.B. Tumor necrosis factor-alpha induces increased hydrogen peroxide production and Fc receptor expression, but not increased Ia antigen expression by peritoneal macrophages. **J Leukoc Biol.** V.42, n. 6, p. 704-707, 1987.
33. HOWARD, D. H. The intracellular behavior of *Histoplasma capsulatum*. **Journal of Bacteriology**, v.87, p.33-38, 1964.
34. HOWARD, D. H. The intracellular behavior of *Torulopsis glabrata*. **Sabouraudia**, v. 5, p.235-238, 1967.
35. LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. Cromomicose. In: **Micologia médica, fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**,. São Paulo: Savier., 8.ed, p. 376-386, 1991.
36. LACAZ, C.S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C, HEINS-VACARI, E.M., MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**. 1 ed. SARVIER, 2002.
37. LANE, C G. A cutaneous lesion caused by a new fungus *Phialophora verrucosa*. **J. Cutan. Dis**, v.33, p. 840-848, 1915. Apud: TELLES FILHO, F. de Q. Contribuição aos aspectos micológicos, eco-epidemiológicos, clínicos e terapêuticos da cromoblastomicose. São Paulo, 1999. **Tese de doutoramento**. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
38. LLOYD KO; TRAVASSOS LR. Immunochemical studies on arhamno-D. mannans of *Sporothrix schenckii* and related fungi by use of rabbit and human antisera. **Carb Res**. v.40, p. 89-97, 1975.
39. MACMICKING, J.D.; XIE, Q.W. & NATHAN C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol**, v.15, p.323-350, 1997.

40. MATSUMOTO, T., MATSUDA, T. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis. **Semin. Dermatol.**, v.4, p.240-251, 1985.
41. MCDANIEL, L. S. & COZED, G. C. Immunomodulation by Blastomyces dermatitidis: functional activity of murine peritoneal macrophages. **Infection and Immunity**, v. 40, p. 733-740, 1983.
42. MCGINNIS, M. R. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis, and mycology, **J. Am. Acad. Dermatol**, St. Louis, v. 8, p. 1-16, 1983.
43. MCGINNIS, M. R.; PASSARELL, L. In vitro testing of susceptibilities of filamentous ascomycetes to voriconazole, itraconazol, and anfotericina B, with consideration of philogeobiotic implications. **J. Clin. Microbiol**, Chicago, v.36, p.2353-2355, 1998.
44. MCGINNIS, M.R. **Laboratory Handbook of medical mycology**. New York: Academic Press, 661p, 1980.
45. MEDLAR, E. M. A cutaneous infection caused by a new fungus *Phialophora verrucosa* with a study of the fungus. **J. Med. Res.**, v.32, p. 507-522, 1915.
Apud: CASTRO, L.G.M. Tratamento da cromoblastomicose pela criocirurgia com nitrogênio líquido. São Paulo, 1998. **Tese de doutoramento**. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
46. MITCHELL, T. G. & FRIEDMAN, L. In vitro phagocytosis and intracellular fate of variously encapsulated strains of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 5, p.491-498, 1972.

47. MOORE, M.; ALMEIDA, F. Ethologic agents of chromomycosis (Chromoblastomycosis of Terra, Torres, Fonseca and Leão, 1992) of North and South America. **Rev. Biol. Hyg**, v.6, p. 94-97, 1935. Apud: ALDOORY, Y. Chromomycosis. Missoula: Mountain Press, 1972, 203p.
48. MOSMANN TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1 and Th2 and more. **Immunol Today**; v. 17, p. 138-146, 1996.
49. NATHAN, C. Natural resistance and nitric oxide. **Cell**, v.82, p.873-876, 1995.
50. NEGRONI, P. Estudio micológico del primer caso argentino de cromomicosis Fonseca (n.g.) pedrosoi (Brumpt, 1921). **Rev. Inst.Bact. Malbran**, v.7, p.419-426, 1936.
51. NOEL, W.; RAES, G.; GHASSABEH, G.H.; BAETSELIER, P.; BESCHIN, A. Alternatively activated macrophages during parasite infections. **Trends in Parasitology**, v.20, n.3, p.126-133, 2004.
52. O'GARRA N. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cells subsets. **Immunity**, v.8, p. 275-283, 1998.
53. ODDS, F.C.; ARAI, T.; DISALVO, A. F.; EVANS, E. G.V.; HAY, R. J.; RANDAHAWA, H. S.; RINALDI, M. G.; WALSH, T. J. Nomenclatura of fungal disease: a report and recommendations from a sub-committee of the International Society for Human and animal Mycology (ISHAM). **J. Med. Vet. Mycol.**; Dorchester, v. 30, p. 1-10, 1992.
54. OKAMURA H; TSUTSI H, KOMATSU T, YUTSUDO M, HAKURA A, TANIMOTO T, et al. Cloning a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. **Nature**, v. 378, p. 88-91, 1995.

55. PADHYE, A. A., HAMPTON, M.T.; HUTTON, N. W.; PREVOST-SMITH, E.; DAVAS, M.S. Chromoblastomycosis caused by *Exophiala spinifera*. **Clin. Infect. Dis. Chicago**. V.22, p. 331-335, 1996.
56. PARHAM, P. **O sistema Imune**. 1ª ed. Porto Alegre: Ed Artmed, 2001.
57. PEARSALL, N. N. & WERSER, R. S. The macrophages. **Lea and Febiger**, Philadelphia, PA, 1970.
58. PEDROSO, A.; GOMES, J. M. Sobre quatro casos de dermatite verrucosa produzida pela *Phialophora verrucosa*. **Ann. Paulistas de medicina e Cirurgia**, São Paulo, v.11. p. 53-61, 1920.
59. PHILIPPE B., IBRAHIM-GRANET O, PREVOST M.C., GOUGEROT-POCIDALO M.A., SANCHEZ PEREZ M., VAN DER MEEREN A., LATGE J.P. Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. **Infect Immun.**, 71 (6): 3034-42, 2003.
60. PIVETA, M. Da malaria às doenças emergentes. **Ciência Medicina. Pesquisa Fapesp**, n.73, p.31-39, 2002.
61. POLAK, A. Melanin as a virulence factor in pathogenic fungi. **Mycoses**, v.33, p.215-224, 1990.
62. 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. Méd. Trop., 1996. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 29: 117.

63. QUEIROZ-TELLES, F.; PURIM, K.S.FILLUS, J.N.BORDIGNON, G.F.; LAMEIRA, R.P.; CUSTEM, J.V. CAUWENBERGH, G. Itraconazole in the treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*. **Int. J. Dermatol.**, Philadelphia, v.31, p.805-812, 1992.
64. 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 SBMT, 1996. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 29. supl 1. p. 117.
65. REISS, E. & NICKERSON, W. Control of dimorphism in *Phialophora verrucosa*. **Sabouraudia**, v.12, p. 202-213, 1971.
66. RIPPON, J.W. The subcutaneous mycoses-Chromoblastomycosis. In: Rippon, J. W. **Medical Mycology. The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, p. 276-296, 1982.
67. ROILIDES E., LYMAN C.A., SEIN T., PETRAITIENE R., WALSH T.J. Macrophage colony-stimulating factor enhances phagocytosis and oxidative burst of mononuclear phagocytes against *Penicillium marneffei* conidia. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 15;36(1-2):19-26, 2003.
68. ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunology**. 5.ed. London: Mosby, 1998.
69. ROMANI, N., KANIPGEN, E., KOCH, F., HEUFLE C., & SCHULER G. Dendritic cell production of cytokines and responses to cytokines. **Int. Rev. Immunol.**, v. 6, p. 151-161, 1990.

70. ROZENTAL, S. ; ALVIANO, C.S. & SOUZA, W. Fine structures and cytochemical study of the interaction between *Fonsecaea pedrosoi* and rat polymorphonuclear leukocyte. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.34, p.323-330, 1996.
71. ROZENTAL, S.; ALVIANO, C. S. & SOUZA, W. The in vitro susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* to activated macrophages. **Mycopathologia**. V.126, p.85-91, 1994.
72. RUDOLPH, M. Uber die Brasilianische "Figuera"(Vorlaufige Mitteilung). *Arch. Schiffs-Tropenhyg.*, v.18, p. 498-499, 1914. Apud: CASTRO, R.M.; CASTRO, L.G.M. On the priority of Description of chromomycosis. **Mycosen**. Berlin. V.30, n.9. p. 397-403, 1987.
73. SALFELDER, K. **Atlas of fungal pathology**. Dordrecht. Kluwer, p.145-150, 1990.
74. 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, 2004.
75. SCHELL, W.A.; PASARELL, L.; SALKIN, I.F.; MCGINNIS, M.R. *Bipolares, Exophiala, Scedosporium, Sporothrix*, and other dematiaceous fungi. In Murray, P.R.; Baron, E.J.; PFALLER, M.A.; Tenover, F.C and Yoken, R.H. (eds), **Manual of Clinical Microbiology**, 7. ed. Washington: American Society of Microbiology, AMS Press, 1999, p.1295-1313.
76. SCHNITZLER, N.; PELTROCHE-LLCSAHUANGA, H.; BESTIER et al. Effect of melanin and carotenoids of *Exophiala* (*Wangiella*) dermatitis on

phagocytosis, oxidative burst, and killing by human neutrophils. **Infect.Immun.**, v.67, p.94-101, 1999.

77. SILVA, A. C. C.M.; NETO, A. S.; GALVÃO, C.E.S.; MARQUES, S.G.; SALDANHA, A. C.R.; SILVA, C.M.P.; FISCHMAN, O.; SILVA, R.R.; COSTA, M.R.S.R.; COSTA, J.M.L. Cromoblastomicose produzida por *Fonsecaea pedrosoi* no Estado do Maranhão. I - Aspectos clínicos, epidemiológicos e evolutivos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 25(1). p. 37-44, 1992.

78. SILVA, C.L. & EKIZLERIAN, S.M.-Granulomatous reactions induced by lipids extracted from *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compactum*, *Cladosporium carrionii* and *Phialophora verrucosa*. **J. gen. Microbiol.** v. 131, p. 187-194, 1985.

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

80. SILVA, J.S.; VESPA, G.N.R.; CARDOSO, M.A.G.; ALIBERTI, J.C.S & CUNHA, F. Q. Tumor necrosis fator alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon activated macrophages. **Infect. Immun**, 63(12), p.4862-4867, 1995.

81. SOARES, R.M.; ANGLUSTER, J.; SOUZA, W. ALVIANO, C.S.-Carbohydrate and lipid components of hyphae and conidia of human pathogen *Fonsecaea pedrosoi*. **Mycopathologia** (Den Haag). V. 132, p. 71-77, 1995.

82. SOUZA, ET; SILVA-FILHO FC; SOUZA W;ALVIANO CS; ANGLUSTER J; TRAVASSOS LR. Identification of sialic acids on the cell surface of hyphae and conidia of the human *Fonsecaea pedrosoi*. **J Med Vet Mycol.** v.24, p.145-153, 1986.
83. SPETH, C.; RAMBACH, G.; LASS-FLORL, C.; DIERICH, M.P.; WURZNER,R. The role of complement in invasive fungal infections. **Mycoses**, v.47, p.93-103, 2003.
84. STROBEL G; VAN ALFEN H; HAPNER KD; McNINEIL M; ALBERSHEIM P. Some phytotoxic glycopeptides from *Ceratocystis ulmi*, the Dutch Elm disease pathogen. **Biochim Biophys Acta.** v. 538, p. 60-75, 1978.
85. SZANIZZLO PJ; COOPER BH; VOGES HS. Chemical composition of the hyphal walls of three chromomycosis agents. **Sabouraudia.** V.10, p. 94-102, 1972.
86. TELLES-FILHO, F. de Q. Contribuição aos aspectos micológicos, eco-epidemiológicos, clínicos e terapêuticos da cromoblastomicose. São Paulo, 1999. **Tese de doutoramento.** Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
87. TERRA F.; TORRES M.; FONSECA F. O.; ARÊA L. A. E. Novo tipo de dermatite verrucosa; micose por *Acrotheca* com associação de leishmaniose. **Brasil Médico**, v.36; p. 363 -368, 1922.
88. TREJOS, A. *Cladosporium carrionii* n. sp. and problem of Cladosporia isolated from chromoblastomycosis. **Rev. Biol. Trop.** V.2, p.75-112, 1954.

89. TSUNETO, L. T.; ARCE-GOMEZ, B.; PETZL-ERLER, M. L.; QUEIROZ-TELLES FILHO, F. HLA 29 and genetic susceptibility to Chromoblastomycosis. **J Med Vet Mycol**, v. 27, p. 181-185, 1989.
90. UNDERHILL, D.M., OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annu Rev Immunol**, v.20, p.825-852, 2002.
91. URIBE, F.; ZULUACA, A.I.; LEON, W.; RESTREPO, A. **Histopathology of Chromoblastomycosis**. *Mycopathology*, 105: 1-6, 1989.
92. UTIYAMA, S.R.R.; REASON, I.T.M. & KOTZE, L.M.S. Conceitos atuais na ativação do sistema complemento e suas propriedades biológicas. **RBAC**, 36(3), p. 183-188, 2004.
93. VAN WOUT, J.W.; POELL, R.; VAN FURTH, R. The role of BCG/PPD-activated macrophages in resistance against systemic candidiasis in mice. **Scand J Immunol**. V.36, p. 713-719, 1992.
94. WAKIO TORINUKI, M.D.; KYOKO OKOHCHI, M.D.; HIDEAKI TAKEMATSU, M.D.; HACHIRO TAGAMI, M.D. Activation of the Alternative Complement Pathway by *Fonsecaea pedrosoi*. **The Journal of Investigative Dermatology**. v.83, p.308-310, 1984.
95. WEEDON, D. et al. **The Skin**. London: Churchill Livingstone, 1992.
96. WHEELER, M.H.; BELL, A. A. Melanin and their importance in pathogenic fungi. In; MCGINNIS, M.R. ed. **Current topics in medical mycology**, v. 2. New York: Spindler-Verlag, p.338-387, 1987.

97. ZEEPPENFELDT, G. RICHARD-YEGRES, YEGRES, F.; HERNÁNDEZ. R.
Cladosporium carrionii: hongo dimórfico em caractáceas de la zona
endêmica para la cromomycosis em Venezuela. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.
11, p. 61-63, 1994.