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

Caracterização das funções dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺
na cromoblastomicose experimental

Maria da Glória Teixeira de Sousa

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

São Paulo
2005

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011342

Ficha Catalográfica

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

S725c Sousa, Maria da Glória Teixeira de
Caracterização das funções dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺
na cromoblastomicose experimental / Maria da Glória
Teixeira de Sousa. -- São Paulo, 2005.

~~60p.~~

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 I. T. II. Almeida, Sandro
Rogério de, orientador.

616.969 CDD

Maria da Glória Teixeira de Sousa

Caracterização das funções dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺
na cromoblastomicose experimental

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Sandro Rogério de Almeida
orientador/presidente

PROFA DRA LÍGIA FERREIRA GOMES
1º. examinador

PROF. DR. CARLOS PELLESEHI TABORDA
2º. examinador

São Paulo, 14 de 09/2005

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas com o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

A minha mãe, Maria Gomes de Sousa Corrêa, exemplo de vida. Para ela com amor, admiração e gratidão pelo carinho, paciência e incansável apoio ao longo do período de realização deste trabalho.

À doce lembrança de papai, Severo José Correa Neto.

Agradeço, com todo meu amor, a Francisco Erivaldo Vidal Barros, presente em grandes momentos da minha vida, que me apoiou e me deu todo o seu amor e carinho ao longo desta minha jornada.

A minha irmã Nádia pacheco e ao meu cunhado Luis Antônio Pacheco pela amizade, apoio, solidariedade e gentileza, essenciais na minha vinda e estada em São Paulo.

Ao orientador Profº Dr. Sandro Rogério de Almeida, por sua disponibilidade imensurável, amizade, ensinamentos e confiança, deixando-me à vontade no Laboratório, certo do meu desejo em aprender.

A Deus por sua infinita bondade e misericórdia.

A minha família, o motivo pelo qual cheguei até aqui.

Aos meus irmãos Tereza, Nádia, Nilza, Neuraci, Silvan, Sérgio, Severo Filho e Flávio, pelo amor, carinho e incentivo que sempre me deram.

A minha irmã Nilza que foi muito importante na minha escolha profissional.

A minha irmã Tereza pelo seu amor e uma amiga que sei que posso sempre contar.

Ao meu sobrinho Gú por permitir que eu sempre aprenda mais com as nossas “brincadeiras”.

A minha amiga Fabiana Érica Vilanova da Silva pela amizade, compreensão, carinho e pelo ombro amigo que muitas vezes me consolou e ajudou na superação de momentos difíceis.

À Josilene Mariz e Saulo Mariz, casal admirável, pelo apoio, carinho, amizade e pelos momentos descontraídos que compartilhamos durante essa jornada em São Paulo.

À Cláudia Maria de Castro Gomes que foi uma das primeiras pessoas que tive contato ao chegar em São Paulo e não mediu esforços para me ajudar. Muito obrigada pela a sua acolhida e seu espírito cooperativo e solidário!!!

Obrigada a todos do Laboratório de Investigação Médica (LIM-50) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial a Profª Dra.Márcia Dalastra, Prof. Dr.Carlos Corbett, Lia Negrão, Thaíse Tomokane.

Obrigada a Thaíse Tomokane pela amizade e pelos momentos descontraídos quando passei pelo LIM-50.

Aos meus amigos da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) Carlos Augusto, Cybelle Lindoso e Fabiana Vilanova pelo incentivo e momentos felizes que compartilhamos juntos.

À Andréa Arruda, sempre disposta a colaborar.

Ao Eliver Eid Bou Ghosn, pessoa que me acolheu em momentos difíceis e sempre tinha uma palavra ou um gesto amigo. Com ele aprendi a fazer ciência de uma forma “apaixonante”, ao longo desses dois anos me deu conhecimento e me ensinou a vê a Imunologia como uma ciência fascinante. É sempre um imenso prazer rir, trabalhar e aprender contigo.

À Karen Spadari Ferreira pela alegria e ajuda no início da realização desse trabalho.

À Márcia Hayakawa pelos momentos divertidos durante todo este período.

À Marina Reis de Moura Campos pela sua alegria contagiante.

À Rosana Cícera do Nascimento pelo apoio e palavra amiga nos momentos finais desse trabalho.

À Sônia Regina Caramico Burrato pela simpatia e auxílio técnico na realização desse trabalho.

À Tânia Sueli de Andrade pelos ensinamentos essenciais na micologia.

À Viviane Gimenes pela sua disponibilidade em sempre me ajudar.

À Alziana Moreno pelos momentos agradáveis quando dividimos o nosso ex-“muquifinho”.

À Prof^a Dra. Irene Soares pela amizade e incentivo

Ao Valdir Azevedo dos Santos e Família, pela amizade, ensinamentos, e por nunca hesitar em me ajudar.

À Dorlei pelo carinho e famoso cafezinho.

À Daniela Matto Gosso pela sua disponibilidade em sempre ajudar.

Aos professores Carlos Taborda e Lígia Gomes pelas valiosas sugestões no exame de qualificação.

A professora Vera Calich pelos camundongos C57BL/6 nocautes para CD4 ou CD8.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação pela dedicação e respeito.

À Universidade de São Paulo, especialmente à Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Departamento de Análises Clínicas e toxicológicas por contribuir com a formação de novos pesquisadores.

A todos muito obrigada!

ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
RESUMO.....	v
 I. INTRODUÇÃO	3
1. Revisão da literatura	5
1.1 Histórico.....	5
1.2 Epidemiologia e Manifestações Clínicas	6
1.3 Diagnóstico e Tratamento.....	8
1.4 Imunopatogenia	10
II. OBJETIVOS	13
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
1. Fungo.....	14
2. Caldo Batata.....	14
3. Obtenção dos conídios	14
4. Preparo dos Antígenos Fúngicos	15
4.1 Exoantígeno (Exo)	15
4.2 Fungo morto por calor (F.M.C.)	15
4.3 Antígeno Total (A.T.)	15
4.4 Dosagem de proteínas.....	16
4.5 SDS – PAGE das proteínas liberadas pela <i>F. pedrosoi</i>	16
5 Infecção experimental com <i>F. pedrosoi</i>.....	16
5.1 Infecção intraperitoneal.....	16
5.2 Infecção subcutânea (s.c.).....	18
5.2.1 Subtipagem de linfócitos T.....	19
5.2.2 Ensaio de proliferação celular.....	20
5.2.3 Determinação das citocinas: ELISA para quantificação de IL- 4, IL- 10 e IFN- γ	21
IV. RESULTADOS.....	24
2. Infecção experimental pela via s.c.	25
2.1 Cinética da evolução da doença pela via s.c.....	25
2.3 Subtipagem de linfócitos T nos linfonodos regionais de camundongos BALB/c após a infecção s.c.	27
2.4 Ensaio de proliferação celular.....	28
2.5 Análise do padrão de citocinas presentes no sobrenadante de cultura de células totais dos linfonodos dos camundongos BALB/c infectados com <i>F. pedrosoi</i> pela via s.c.	29
3. Infecção experimental via i.p.	30

3.1	Grau de infecção nos órgãos baço e fígado de animais infectados com conídios de <i>F. pedrosoi</i>	30
3.2	Resposta de Hipersensibilidade do Tipo Tardio (HTT)	31
3.3	Grau de infecção nos órgãos baço e fígado dos animais C57BL/6 "WT", C57BL/6 CD4 "KO" e C57BL/6 "KO"	32
3.4	Resposta de HTT em camundongos C57BL/6 WT, C57BL/6 T CD4 "KO" ou C57BL/6 T CD8 "KO".	34
V.	DISCUSSÃO	37
VII.	REFERÊNCIAS	47

UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comissão de Ética em Experimentação Animal

Of. CEEA nº 15/2004

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “Estudo da resposta imune celular na cromoblastomicose experimental” (Protocolo nº37), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). Maria da Glória Teixeira de Sousa e do orientador(a) Sandro Rogério de Almeida, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 05/04/2004.

São Paulo, 06 de abril de 2004.

*Prof. Assoc. Elfriede Marianne Bacchi
Coordenadora da CEEA*

LISTA DE ABREVIATURAS

BALB/c - Camundongo selvagem (controle) da linhagem BALB

C57BL/6 – Camundongo selvagem da linhagem C57BL

BSA - “Bovine Serum Albumine”

°C - Graus Celsius

CO₂ - Dióxido de carbono (gás carbônico)

CD - “Cluster of Differentiation”

DO - Densidade Óptica

ELISA - “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”

H₂SO₄ - Ácido sulfúrico

IFN- γ - Interferon-gamma

IL – Interleucina

i.p. – Intraperitoneal

Ig – Imunoglobulina

“KO” – Knockout

mL – mililitro

mg – miligrama

nm -nanograma

PBS - “Phosphate Buffered Saline”

pg - picograma

rpm - Rotações por minuto

RPMI - Meio de cultura “Roswell Park Memorial Institute – 1640”

s.c. - subcutânea

Th1 - T “helper” 1

Th2 - T “helper” 2

TNF- α - “Tumor Necrose Factor – alfa”

TCD4⁺ - Linfócito T “helper” (CD4⁺)

TCD8⁺ - Linfócito T “helper” (CD8⁺)

μ L – microlitro

“WT” - wild type

RESUMO

A cromoblastomicose é uma infecção fúngica subcutânea causada por fungos da família *Dematiaceae* sendo o principal agente etiológico o fungo *Fonsecaea pedrosoi* (*F. pedrosoi*). Estes fungos induzem uma lesão crônica na pele de freqüente recidivas. O objetivo do trabalho foi avaliar alguns aspectos imunológicos na cromoblastomicose experimental através de dois modelos de infecção pelas vias: intraperitoneal (i.p.) e subcutânea (s.c.). No primeiro modelo de infecção pela via s.c. em camundongos BALB/c infectados com 10^6 conídios de *F. pedrosoi*, ocorreu a cura espontânea da infecção em aproximadamente 4 semanas. Na subtipagem de linfócitos T em linfonodos regionais ocorreu um predomínio de células T CD4⁺ que foi constante até a 4ª semana de infecção, no entanto, observamos aumento significativo de linfócitos T CD8⁺ ao longo da infecção sugerindo que essa população tenha também uma importante participação no controle da doença. Os ensaios de linfoproliferação demonstraram, na 1ª semana de infecção, elevado índice de proliferação celular quando as células de linfonodos foram estimuladas *in vitro* com antígenos de *F. pedrosoi*, além da liberação principalmente da citocina IFN- γ , já na 4ª semana de infecção não foi detectado proliferação celular. Esses resultados sugerem que no início da infecção a resposta celular seja mediada principalmente por linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ , o que nos sugere, que neste modelo experimental, polarize uma resposta de células T do tipo Th1.

No segundo modelo de infecção, via intraperitoneal (i.p.), camundongos BALB/c infectados com 10^6 conídios de *F. pedrosoi* mostraram desenvolvimento de infecção crônica com preservação da imunidade celular mesmo após a 8ª semana. Ainda pela via i.p., os camundongos C57BL/6 nocautes de T CD4⁺ apresentaram uma maior carga fúngica no início da infecção e em tempos mais tardios a carga fúngica foi semelhante aos camundongos controles (C57BL/6); esses mesmos animais nocautes não apresentaram uma ativação da resposta celular medida pelo teste de HTT (Hipersensibilidade do Tipo Tardio). Quando avaliamos o padrão de citocinas, a citocina IFN- γ produzida pelos órgãos baço e

fígado apresentou menores níveis no início da infecção quando comparado ao camundongos controle. Já os níveis de IL-10 aumentaram gradativamente ao longo da infecção e IL-4 não apresentou diferenças em relação ao controle. Nos camundongos nocautes para CD8 (C57BL/6 CD8 "KO"), a carga fúngica, os níveis de citocinas e o teste de HTT foram semelhantes aos animais controle. Esses resultados mostraram que pela via i.p. os linfócitos T, principalmente células T CD4⁺ são importantes no controle inicial da infecção. Em tempos mais tardios a infecção foi controlada mesmo em camundongos deficientes de linfócitos TCD 4⁺ ou T CD8⁺, sugerido que outras células como macrófagos ou NK, estariam atuando de forma mais efetiva no controle da infecção.

I. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os principais avanços observados na micologia médica foram motivados pelo impacto das infecções fúngicas oportunistas que causam alto índice de morbidade e mortalidade. Entretanto, esse progresso não se refletiu na mesma proporção em infecções fúngicas de caráter endêmico como cromoblastomicose, esporotricose, micetomas, lobomicose, rinosporidiose e entomoftromicose, classificadas como micoses subcutâneas. Essas micoses, prevalentes em populações rurais das zonas tropicais e subtropicais dos países em desenvolvimento, têm seu tratamento dificultado pela co-existência de problemas sócio-econômicos, ausência de diagnóstico precoce, além do desconhecimento da relação parasito -hospedeiro.

Dentre as doenças infecciosas que foram citadas acima, a cromoblastomicose destaca-se por sua morbidade. Embora possua evolução clínica lenta e pouco comprometimento do estado geral do paciente, a doença ao longo dos anos pode causar mutilações de importância estética e funcional, já que se trata de uma micose refratária aos mais variados tratamentos, levando em alguns casos à incapacitação para atividades laborativas. A cromoblastomicose é uma micose de tecidos cutâneos e subcutâneos adquirida por via traumática, através da penetração do agente etiológico pela solução de continuidade da pele.

As espécies de fungos causadoras dessa micose pertencem à família *Dematiaceae* que compreende um grande número de espécies, agrupadas por apresentarem pigmentos em sua parede celular, conferindo-lhes uma coloração variável desde marrom claro até o negro⁴⁷. O pigmento, na maioria das vezes, é composto de melanina (dihidroxinaftaleno - melanina), antioxidante natural que oferece maior resistência ao fungo frente à lise fagocitária⁷³.

São cinco os agentes mais freqüentes da cromoblastomicose: *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compacta*, *Cladophialophora* (*Cladosporium*) *carionii*, *Rhinocladiella aquaspersa* e *Phialophora verrucosa*. Todos são dimórficos, pois se apresentam sob a forma micelial em vida saprobiótica e como elementos muriformes, em vida parasitária⁴⁷.

Um dos últimos relatos sobre a epidemiologia da cromoblastomicose no Brasil, a cidade de Monte Negro, no estado de Rondônia, foi notificada como principal foco endêmico dessa doença. Nessa cidade foi descrita uma taxa anual de 1,6 casos por 10 mil habitantes, a maior do mundo, sugerindo que a cromoblastomicose deve ser de grande prevalência também nos municípios vizinhos⁶³.

O diagnóstico é realizado através do exame direto, cultura e histopatológico, mediante a presença de células fúngicas globosas, de parede espessa e de coloração castanha, denominadas de células muriformes. No histopatológico, observa-se hiperkeratose, hiperplasia da epiderme, geralmente do tipo pseudoepiteliomatosa e dermatite granulomatosa supurativa. Na cromoblastomicose, o desenvolvimento de reação inflamatória crônica granulomatosa ocorre concomitantemente com extensa e progressiva fibrose dérmica. Ambos os fatores estão associados a estímulo antigênico persistente e, juntamente com a hiperplasia pseudoepiteliomatosa, que conferem o aspecto verrucoso às lesões^{51, 52}.

Apesar de a cromoblastomicose ser uma micose endêmica em nosso país, com alta morbidade e refratária aos mais variados tratamentos, até hoje pouco se conhece sobre a relação parasito – hospedeiro. Sendo assim, propomos avaliar alguns aspectos da resposta imune adaptativa na cromoblastomicose experimental, visando a contribuir para o esclarecimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na progressão e cura dessa patologia.

1. Revisão da literatura

1.1 Histórico

Em 1914, o alemão Max Rudolph, radicado em Minas Gerais, publicou os primeiros seis casos de cromoblastomicose em pacientes de Minas Gerais e Goiás. Além de descrever a doença, então popularmente denominada de figueira, obteve o isolamento de um fungo de hifas negras em cultivo de material de lesões de quatro pacientes. Entretanto, Rudolph não mencionou em seu trabalho o aspecto dos parasitos nas lesões cutâneas²². No ano seguinte, Lane e Medlar, em publicações separadas em 1915, descreveram o primeiro caso da cromoblastomicose na América do Norte, cuja etiologia foi atribuída à espécie *Phialophora verrucosa*^{48, 53}. No entanto, dois pesquisadores, Pedroso e Gomes em 1911, já haviam estudado quatro casos de dermatite verrucosa também causadas por *Phialophora verrucosa*, mas, acontecimentos ligados à Primeira Guerra Mundial retardaram a publicação que só aconteceu no ano de 1920.

Desde a descoberta da cromoblastomicose, várias terminologias foram utilizadas para definir a doença e seus agentes, entre elas podemos citar: figueira, formigueiro, dermatite verrucosa cromomicótica, verruga blastomicótica, doença de Pedroso, doença de Fonseca, doença de Gomes, doença de Carrion, dentre outras^{47, 2}. O termo cromoblastomicose foi proposto por Terra *et al.*, em 1922. Em 1935, Moore e Almeida propuseram o termo cromomicose, muito utilizado nas décadas de 60 e 70, 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. 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 micológicos. Atualmente, cromoblastomicose é a terminologia indicada pela “International Society of Human and Animal Mycology” (ISHAM)⁶⁰.

1.2 Epidemiologia e Manifestações Clínicas

A cromoblastomicose ocorre em todos os continentes, porém, com maior incidência nas regiões tropicais e subtropicais. 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, do tipo, composição orgânica ou pH⁴⁷.

Sabe-se que esses fungos não têm habitat específico, encontram-se dispersos na natureza. Algumas espécies como *P. verrucosa* e *F. pedrosoi* já foram isoladas de polpa de madeira, restos de plantas, cascas de árvores e espinhos de plantas^{66, 72}. A maioria dos casos relatados de cromoblastomicose tem como agente etiológico a *Fonsecaea pedrosoi* e ocorre principalmente em habitantes de regiões tropicais e subtropicais, seguido por *Cladophialophora* (*Cladosporium*) *carionii* que prevalece em regiões de clima árido ou semi-árido de Madagascar³¹, Austrália⁴, Venezuela¹³, Equador e Peru⁶. Outras espécies, em alguns casos, podem causar cromoblastomicose: *Wangliella* (*Exophiala*) *dermatitides*, *Exophiala spinifera*, *Exophiala jeanselmei* e *Exophiala castelani*⁴⁷.

A doença atinge todas as idades, porém, acomete mais homens de 30 a 50 anos, envolvidos em atividades rurais que mantêm contato direto com o solo e a vegetação. Alguns autores acreditam que fatores hormonais possam conferir proteção imunológica à mulher contra a infecção, mas até o momento nenhuma pesquisa confirma tal fato^{22, 52, 76, 78}.

No Brasil, a cromoblastomicose já foi descrita em quase todos os Estados sendo os principais focos na Região Amazônica, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Rio Grande do Sul^{41, 47, 50, 79}.

Embora a doença seja causada por várias espécies de fungos demáceos, as manifestações clínicas são semelhantes. A localização das lesões se dá principalmente na região podal, pernas, nádegas e com menos freqüência nas mãos e braços. No entanto, já foram observados casos de infecção na região auricular, nasal e em outras partes do corpo^{11, 83, 89}.

Inicialmente, observa-se no local da penetração do inóculo a presença de lesão papular de superfície lisa e eritematosa, que gradualmente aumenta em tamanho, apresentando superfície descamativa. A lesão inicial pode ser única ou múltipla e, evolutivamente, 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 à couve-flor^{22, 47, 83}. Frequentemente, essas lesões estão associadas a infecções bacterianas secundárias^{2, 67}.

Segundo Carrion (1950), as lesões iniciais de cromoblastomicose podem evoluir para três tipos distintos de lesão clínica: nodular ou tumoral, em placa e verruciforme. Boop (1959) classifica as manifestações cutâneas da doença em duas formas: em placa e nodular (ou tumoral) acrescentando vários subtipos à forma em placa (tuberculóide, maduromicosiforme, psoriasiforme) e o subtipo sarcoídico a de forma nodular. Lavalley, 1975 sugeriu uma classificação semelhante a de Boop (1959), reconhecendo apenas dois grupos de lesões: as variedades em placa e nodular ou tumoral.

É importante salientar que, frequentemente, mais de um tipo clínico de lesão pode ser observado concomitantemente em um mesmo paciente e que a presença de fatores complicadores, como edema ou infecção secundária, pode modificar a manifestação clínica primária²³.

Em sua fase inicial, a lesão de cromoblastomicose é oligossintomática, não interferindo com o estado geral do paciente e, via de regra, não exige a procura de assistência médica. Na fase de cronicidade, os sintomas são: pruridos localizados que podem ser discreto ou intenso e em alguns casos, dor local, principalmente, quando associados à infecção bacteriana secundária. Em lesões extensas e de longa duração há fibrose do tecido celular subcutâneo, determinando bloqueio dos vasos linfáticos regionais e linfandema crônico com aspecto elefantíase do membro acometido, que pode gerar incapacidade permanente ao trabalho físico^{22, 77, 83}.

As complicações mais freqüentes são as infecções secundárias e linfadenoma, não sendo raros os casos que evoluem para amputação do membro afetado. Já foram relatados na literatura casos de malignização das lesões crônicas, com desenvolvimento de carcinoma espinocelular^{18, 35}.

Clinicamente, algumas formas de cromoblastomicose podem ser confundidas com várias doenças como blastomicose, sífilis terciária, micetoma, leishmaniose e esporotricose. Entretanto, a demonstração do fungo no exame direto e em cultura define o diagnóstico^{47, 52}.

O principal meio de disseminação dos agentes da cromoblastomicose no organismo é o acometimento de áreas cutâneas adjacentes, por contigüidade. Também pode ocorrer auto inoculação. Em menor freqüência ocorre disseminação por via linfática e, raramente por via hematogênica, dando origem a novas lesões em áreas cutâneas distantes do foco inicial^{8, 81}.

1.3 Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico pode ser feito pelo exame direto com material retirado das lesões, principalmente dos pontos negros e clarificado com KOH 10% onde se observam células ou corpos muriformes que são patognomônicos da cromoblastomicose. Essas células parasitárias são arredondadas ou elípticas, medindo de 4µm a 12µm de diâmetro, de coloração marrom, membrana bem nítida e de duplo contorno, reproduzindo-se por cissiparidade, outras vezes observa-se nítida filamentação no material colhido das lesões⁴⁷.

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 negros⁴⁷. 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 identificação do gênero e espécie é feita principalmente pelos aspectos micromorfológicos do conidióforo e conidiogênese. São descritos três tipos de conidióforo considerados clássicos da

cromoblastomicose: tipo *Phialophora*, tipo *Cladophialophora* (cladosporium) e tipo *Rhinocladiella*. O predomínio da morfologia identifica a espécie isolada. A espécie mais isolada no Brasil é a *F. pedrosoi* que é um fungo pleomórfico, isto é, pode apresentar mais de um tipo de conidióforo^{47, 52}.

Recomenda-se o exame histopatológico 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 granulomatosa⁷¹. Na epiderme, as principais características histológicas observadas são hiperplasias pseudo-epiteliomatosas ou acantose, podendo às vezes, ocorrer hiperkeratose ou abscessos. Na derme, o infiltrado inflamatório contém nódulos granulomatosos confluentes, compostos por células epitelióides, células gigantes de Langerhans ou de corpo estranho. 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^{24, 65, 85, 88}.

Os testes imunológicos não são empregados rotineiramente como método diagnóstico ou acompanhamento terapêutico dos pacientes com cromoblastomicose, pois a detecção do fungo por exame micológico direto, histopatológico e isolamento em cultivo são mais vantajosos⁴⁷.

A cromoblastomicose sempre constituiu desafio terapêutico a ser enfrentado pela equipe de profissionais da saúde e pelos pacientes. Diversos métodos e substâncias foram tentados, mas os resultados, aparentemente promissores, raras vezes apresentavam consistência suficiente para justificar sua utilização em larga escala ou serem considerados como método de eleição para o tratamento da cromoblastomicose^{83, 22}. Segundo Castro (1992) a existência de tantas modalidades terapêuticas é a maior prova que nenhuma apresenta eficácia satisfatória suficiente para que seja considerada como método de escolha.

As modalidades de tratamento conhecidas podem ser divididas em três grupos: cirúrgicas, quimioterápicas e físicas. Tendo em vista a resistência da doença aos mais variados tipos de tratamento, os médicos associam dois ou mais

métodos, de modo alternado ou simultâneo. Nos primeiros estágios da doença, alguns autores indicam a excisão cirúrgica, eletrodissecação, uso da criocirurgia^{47, 22}. Em estágios mais avançados, a conduta preferencial é a administração de medicamentos isolados ou associados⁸³. Vários medicamentos já foram utilizados no tratamento da cromoblastomicose, sendo o itraconazol e a terbinafina os medicamentos mais utilizados isoladamente ou em associação.

1.4 Imunopatogenia

O mecanismo de defesa do hospedeiro nas lesões fúngicas ainda é pouco conhecido. Na maioria das vezes, os fungos são saprófitas e o parasitismo é uma ocorrência accidental. De maneira geral, nosso sistema imunológico é capaz de eliminar ou pelo menos de controlar a maioria das infecções fúngicas.

Os mecanismos imunológicos envolvidos na prevenção e controle da infecção por *F. pedrosoi* ainda são desconhecidos. Sabe-se que a espécie *F. pedrosoi* é capaz de ativar o sistema complemento podendo mediar à quimiotaxia⁸⁶. Alguns estudos têm focado na interação parasito-hospedeiro, mostrando predominantemente a resposta imune celular, com ativação de macrófagos envolvendo a fagocitose, entretanto, raramente observa-se a morte das células fúngicas⁴⁶. Rozental *et al.*, (1994) demonstraram que *F. pedrosoi* foi capaz de sobreviver e proliferar em macrófagos peritoneais murinos e quando ativados, essas células possuem ação fungistática e não fungicida. Entretanto, os mesmos autores em 1996, revelaram que neutrófilos foram capazes de destruir células fúngicas em períodos inferiores a 20 minutos.

Sabe-se que a imunidade mediada por células pode ser o principal mecanismo de defesa nas micoses, determinando a evolução da infecção. Na paracoccidioidomicose, Franco *et al.*, (1997) observaram que o desenvolvimento da resposta de hipersensibilidade do tipo tardio, parece ser o mecanismo ideal para circunscrever e limitar a disseminação fúngica a partir do foco primário.

Na cromoblastomicose, sabe-se que os fungos chegam a derme por solução de continuidade da epiderme, provocando uma reação inflamatória com acúmulos 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^{90, 88}. 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 presença principalmente de macrófagos e linfócitos. Já as lesões mais severas com aspecto verrucoso desenvolvem um granuloma frouxo com influxo principalmente de neutrófilos e eosinófilos, de aspecto supurativo, sugerindo que os fatores determinantes dessa polarização devem estar relacionados à imunidade inata, na qual têm papel determinante os fenômenos que estão ocorrendo no microambiente no qual se dá a infecção²⁶. A resposta inflamatória granulomatosa é uma reação de hipersensibilidade do tipo tardio. Iwatsuki *et al.*, (1982) avaliaram essa reação em pacientes com cromoblastomicose e cerca de 80% desses foram positivos para antígeno específico de *F. pedrosoi*.

Estudos em humanos demonstraram que os padrões de citocinas encontrados em pacientes indicam que a forma severa da doença é caracterizada pela produção de IL-10 e TNF- α , associado a baixos níveis de IFN- γ e proliferação de linfócitos, entretanto, pacientes com a forma leve da doença apresentaram altos níveis de IFN- γ e proliferação de linfócitos e baixos níveis de IL-10, sugerindo que a atividade anti-inflamatória da IL-10 esteja 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 macrófagos³⁹. D'Avila *et al.*, (2002) avaliaram a reação imune mediada por células nas lesões cutâneas de cromoblastomicose em diferentes formas clínicas e os dados sugeriram que pacientes com placa verrucosa têm uma resposta imunológica Th2, enquanto os pacientes com placa atrófica eritematosa possuem resposta Th1.

O fungo *F. pedrosoi* secreta da parede celular estruturas semelhantes à melanina, antioxidante natural, que protegem o fungo contra a lise fagocitária. Ensaio *in vitro*, demonstraram que são as partículas de melanina liberada pela *F. pedrosoi* que protegem o fungo da lise fagocitária³³. 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 humoral³. Outra estrutura da parede celular de *F. pedrosoi* é a substância glicosilceramida que inibe o crescimento fúngico e aumenta a ação antifúngica de macrófagos de camundongos.

Estudos avaliando a resposta imune humoral na cromoblastomicose durante a terapia com terbinafina, demonstraram que altos níveis de anticorpos específicos são identificados no soro de pacientes com a forma severa da doença e que IgG foi o principal responsável pela positividade de anticorpos observados nestes pacientes³².

Sabe-se que após a implantação do agente fúngico no hospedeiro, a evolução da infecção depende de fatores inerentes ao parasito, a saber: virulência, viabilidade, quantidade do inóculo e de fatores relacionados ao hospedeiro como idade, sexo, ocupação profissional, susceptibilidade genética e efetividade dos mecanismos de defesa inata e adaptativa. De acordo com os estudos acima relatados, torna-se evidente a importância da imunidade celular na defesa do hospedeiro. Todavia, ainda não se sabe quais seriam as populações celulares responsáveis e quais os mecanismos envolvidos nessa doença, assim avaliamos alguns aspectos imunológicos na cromoblastomicose experimental na tentativa de mimetizar a relação homem-fungo.

II. OBJETIVOS

Investigar alguns aspectos imunológicos da imunidade adaptativa na cromoblastomicose experimental. Para isso avaliamos dois modelos de infecção experimental:

Infecção subcutânea

- 1- Estabelecimento do modelo de infecção na cromoblastomicose em camundongos BALB/c;
- 2-Avaliação da resposta imune mediada por células pela verificação da reação de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT) e linfoproliferação desenvolvidas em camundongos BALB/c;
- 3- Subtipagem de linfócitos T em linfonodos regionais de camundongos BALB/c infectados com *F. pedrosoi*;
- 4- Dosagem de citocinas IL-4, IL-10 e IFN- γ liberadas na cultura de células totais dos linfonodos poplíteos e inguinais de camundongos BALB/c.

Infecção intraperitoneal

- 1- Grau de infecção em camundongos BALB/c, C57BL/6 selvagem (C57BL/6 “WT”), C57BL/6 nocautes para a molécula CD4 (C57BL/6 CD4 “KO”) ou C57BL/6 nocautes para a molécula CD8 (C57BL/6 CD8 “KO”) após a infecção com conídios de *F. pedrosoi*;
- 2- Avaliação da resposta imune mediada por células pela verificação da reação de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT) desenvolvidas em camundongos BALB/c e C57BL/6 “WT”, C57BL/6 CD4 “KO” ou C57BL/6 CD8 “KO”;
- 3- Dosagem de citocinas IL-4, IL-10 e IFN- γ contidas no sobrenadante dos órgãos baço e fígado dos camundongos C57BL/6 “WT”, C57BL/6 CD4 “KO” ou C57BL/6 CD8 “KO”.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Fungo

Foi utilizada a cepa do fungo *Fonsecaea pedrosoi* número 46428 da American Type Culture Collection – ATCC. A cepa foi inoculada duas vezes em camundongos BALB/c pela via i.p. para aumentar a sua virulência. O micélio foi utilizado após 15 dias de crescimento em meio ágar Sabouraud dextrose (Merck - Alemanha) a 30°C. Em seguida fragmentos do micélio foram colocados em caldo batata para liberação dos conídios, sob agitação de 200 rpm a temperatura de 28°C.

2. Caldo Batata

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. Essa mistura foi fervida até cozimento total da batata, por aproximadamente 30 minutos. Foram acrescentados 450mL 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 a 4°C¹⁷.

3. Obtenção dos conídios

Por analogia à técnica de microcultivo, que utiliza o ágar Batata, pobre em nutrientes, para se obter 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 de *F. pedrosoi*.

Após crescimento do fungo, a colônia foi raspada com alça de platina em "L" e colocada em 50mL de caldo-batata em erlenmeyer de 250mL. Este inóculo foi cultivado sob agitação constante de 200 rpm a 28°C por 3 dias. Posteriormente, o meio foi deixado em repouso por aproximadamente 30 minutos para que as hifas sedimentassem por espontaneidade e o sobrenadante contendo os conídios foram

recolhidos com pipeta de bulbo, em seguida centrifugados 2 vezes com PBS estéril, a 2500 rpm por 5 minutos, para retirar os resíduos do caldo batata. O número de conídios foi contado em câmara de Neubauer e ajustado de acordo com cada ensaio.

4. Preparo dos Antígenos Fúngicos

4.1 Exoantígeno (Exo)

O fungo foi cultivado em ágar Sabouraud dextrose (Merck – Alemanha) por 15 dias a 30°C. Posteriormente, o fungo foi transferido para um balão volumétrico contendo 250 mL de caldo Sabouraud (Merck- Alemanha) e cultivado por 21 dias, sob agitação constante, a 200 rpm, a 30°C em incubadora (C25 INCUBATOR SHAKER, New Brunswick Scientific, Estados Unidos). Após esse período, as células foram separadas do fluido por filtração em papel de filtro. O sobrenadante (exoantígeno) foi concentrado 10 vezes pelo sistema Amicon (MILLIPORE, Estados Unidos) com membrana de celulose YM10 (MILLIPORE, Estados Unidos), em seguida filtrado em filtro 0,22µm (CORNING - Alemanha).

4.2 Fungo morto por calor (F.M.C.)

Fragmentos de colônias de *F. pedrosoi* foram colocados em uma solução de PBS estéril e levados para agitação no vortex por aproximadamente 5 minutos para a liberação de conídios, em seguida autoclavado por 20 minutos a 121° C.

4.3 Antígeno Total (A.T.)

Fragmentos de colônias de *F. pedrosoi* foram colocados em um tubo cônico (15mL) contendo solução de PBS estéril, em seguida agitados no vortex, por aproximadamente 5 minutos, essa suspensão foi colocada em recipiente estéril com nitrogênio líquido e macerada até o completo derretimento do gelo. Após

esses procedimentos, essa solução foi centrifugada a 2500 rpm a 5 minutos e o sobrenadante utilizado com antígeno total.

4.4 Dosagem de proteínas

As dosagens protéicas do Exo, A.T. e F.M.C. foram realizadas segundo Bradford (1976), utilizando CBB G-250 (Sigma, Alemanha) e como padrão albumina bovina (Sigma, Alemanha).

4.5 SDS – PAGE das proteínas liberadas pela *F. pedrosoi*

O gel para eletroforese vertical foi preparado em uma cuba de eletroforese vertical para mini gel (BIO-RAD Mini PROTEAN® 3 CELL), constando de um gel de separação linear a 12% de acrilamida e 0.75% de espessura.

Uma alíquota do Exo, A.T. e do F.M.C. de *F. pedrosoi* contendo 70 µg/mL, 28 µg/mL e 33 µg/mL, respectivamente de proteína foram diluídos em tampão de amostra. A amostra foi fervida por 5 minutos, em seguida aplicada no gel. Em cada corrida foi utilizado um padrão de baixo peso molecular (PM), composto de fosforilase b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa), α -lactoalbumina (14,4 kDa) (Amersham Pharmacia, Inglaterra).

Os géis contendo as amostras e o padrão de baixo peso molecular foram submetidos à corrida eletroforética por 90 minutos a 120v. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado pela prata para a visualização das bandas protéicas.

5 Infecção experimental com *F. pedrosoi*

5.1 Infecção intraperitoneal

5.1.1 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 camundongos da linhagem

C57BL/6 selvagem (C57BL/6 “WT”), C57BL/6 nocautes de CD4 (C57BL/6 T CD4⁺ “KO”) ou C57BL/6 nocautes de CD8 (C57BL/6 T CD8⁺ “KO”) com 6 a 8 semanas de vida foram obtidos do Biotério de camundongos isogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas II – Universidade de São Paulo. Todos 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.

5.1.2 Preparação do inóculo

Os conídios liberados no caldo batata, como descrito no item 2 foram centrifugados 2 vezes com PBS estéril (pH 7,2), a 2500 rpm por 5 minutos. Após a última lavagem os conídios foram contados e ajustados para 10⁶ conídios por mL. A contagem do número de células foi realizada utilizando-se câmara de Neubauer (Optik Labor Eberstadt, Alemanha).

5.1.3 Infecção intraperitoneal (i.p.)

Vinte e quatro camundongos BALB/c, C57BL/6 selvagem, TCD4⁺ ko ou TCD8⁺ ko foram infectados via i.p. com 10⁶ conídios de *F. pedrosoi* suspensas em 1 mL de PBS estéril. Após a infecção, os camundongos de ambas as linhagens foram sacrificados após a 1^a, 2^a, 4^a e 8^a semanas de infecção para a contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs)¹⁹.

5.1.4 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Os órgãos baço e fígado de camundongos BALB/c foram retirados após 1^a, 2^a, 4^a e 8^a semanas de infecção e macerados em 2 mL de PBS estéril. Trezentos microlitros do macerado foram distribuídos em placas de petri contendo meio ágar Sabouraud dextrose (Merck – Alemanha). As placas foram incubadas a 30°C. Os números de UFCs foram determinados em aproximadamente sete dias após o

plaqueamento e os resultados quantificados em unidades formadoras de colônia por grama de órgão (UFC/g). Esses mesmos procedimentos foram realizados com os camundongos da linhagem C57BL/6.

5.1.5 Avaliação da resposta de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT)

Grupos de animais BALB/c, C57BL/6 “WT”, C57BL/6 CD4 “KO” ou C57BL/6 CD8 “KO”, infectados pela via i.p foram avaliados quanto à resposta de hipersensibilidade do tipo tardio específica para o fungo, realizando-se o teste de coxim plantar de acordo com as condições descritas por FAIZOLI *et al* (1994). O estudo foi realizado após a 1ª, 2ª, 4ª e 8ª semanas de infecção nos camundongos da linhagem BALB/c e C57BL/6.

Assim, 24 horas antes do teste, as patas esquerda e direita do animal foram medidas com o auxílio de um paquímetro (Mitutoyo, Japão) e em seguida foi injetado pela via s.c. no coxim plantar esquerdo 50 µL de Exo na concentração de 70 µg/mL. As medidas do inchaço das patas foram feitas após 24 horas com o mesmo paquímetro. Controle negativo: 50 µL de PBS estéril no coxim plantar direito. Os resultados obtidos foram expressos como a diferença, em mm, entre as medidas feitas imediatamente antes e 24 horas após a inoculação do antígeno.

5.2 Infecção subcutânea (s.c.)

Quinze camundongos BALB/c foram infectados pela via s.c. no coxim plantar direito com 10^6 conídios de *F. pedrosoi* suspensos em 50 µL de PBS estéril. Foi realizada a cinética de evolução da lesão nesses animais. Como controle negativo inoculou-se PBS estéril na pata direita. Assim, no tempo 0, antes da inoculação, as patas infectadas e controle foram medidas com auxílio de um paquímetro (Mitutoyo, Japão). As medidas da lesão foram realizadas até 42 dias de infecção com o mesmo paquímetro.

5.2.1 Subtipagem de linfócitos T

Os linfonodos regionais: inguinais e poplíteos dos camundongos BALB/c foram retirados após a 1^a, 2^a, 4^a e 8^a semanas de infecção. As condições adotadas no ensaio foram as seguintes:

a. os linfonodos de cada camundongo, foram macerados manualmente em placa de petri estéril contendo 5 mL de RPMI 1640 (SIGMA – ALDRICH, Alemanha) em seguida foram centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos;

b. o sobrenadante desprezado e o sedimento celular ressuspensionado em 5 mL de tampão hemolítico, seguida de uma nova centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos;

c. depois o sobrenadante foi desprezado e o sedimento de células foi ressuspensionado em 5 mL de meio RPMI (RPMI 1640 (SIGMA – ALDRICH, Alemanha);

d. as células foram contadas em câmaras de Neubauer (Optik Labor Eberstadt, Alemanha), com corante azul de trypan para verificação da viabilidade celular e as suspensões de células viáveis foram ajustadas a concentração final de 10^6 células/mL;

e. Essas células foram duplamente marcadas com anticorpos: anti-camundongos CD4 (L3T4) marcados com FITC (0,5µg/mL), anti- camundongos CD8a (Ly-2) (53-6.7) marcados com FITC (0,5 µg/mL) e anti- camundongo CD3 (cadeia ε CD3) marcados com PE (0,2 µg/mL). Todos os anticorpos são da BD Pharmingen (USA). As células nessa etapa permaneceram no gelo por 40 minutos;

d. Após esse tempo, foram centrifugadas a 1200 rpm por 3 minutos e ressuspensionadas numa solução fixadora.

No dia em que foi realizada a análise por citometria de fluxo, as amostras foram centrifugadas a 1200 rpm por 3 minutos e ressuspensionadas em PBS acrescido de 2,5% de soro fetal bovino. A leitura foi realizada no equipamento FacScalibur (Becton & Dickison, CA) do Instituto Butantã calibrado para leitura de 10.000 eventos e os dados foram analisados no programa Cell Quest.

5.2.2 Ensaio de proliferação celular

Os animais BALB/c infectados com 10^6 conídios de *F. pedrosoi* pela via s.c., após a 1ª, 2ª, 4ª e 8ª semanas de infecção tiveram os linfonodos inguinais e poplíteos retirados para o ensaio de proliferação celular. As condições adotadas no ensaio foram as seguintes:

- a. os linfonodos poplíteos e inguinais dos camundongos BALB/c foram retirados.
- b. os linfonodos de cada camundongo, foram macerados manualmente em placa de petri estéril contendo 5 mL de RPMI 1640 (SIGMA – ALDRICH, Alemanha) em seguida foram centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos;
- c. o sobrenadante desprezado e o sedimento celular ressuspensionado em 5 mL de tampão hemolítico, seguida de uma nova centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos;
- d. depois o sobrenadante foi desprezado e o sedimento de células foi ressuspensionado em 5 mL de meio RPMI (RPMI 1640 (SIGMA – ALDRICH, Alemanha) suplementado com 2,5% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil);
- e. as células foram contadas em câmaras de Neubauer, com corante azul de trypan para verificação da viabilidade celular e as suspensões de células viáveis foram ajustadas a concentração final de 2×10^6 células/mL;
- f. 100 μ L dessas suspensões foram depositadas em cada orifício da placa para cultura celular com 96 orifícios (Corning-COSTAR, Estados Unidos).

Essas suspensões celulares foram reestimuladas com os antígenos Exo, A.T. e F.M.C. nas concentrações de 70 μ g/mL, 28 μ g/mL e 33 μ g/mL, respectivamente.

Como controle positivo as células foram estimuladas com o mitógeno Con A (SIGMA-ALDRICH, Alemanha) na concentração de 2 μ g/mL e como controles negativos células sem nenhum estímulo. As células foram incubadas por 72 horas em estufa de CO₂ a 37°C e nas últimas 16 horas foi acrescentado 1 μ Ci de Timidina triciada [metil- ³H] (Amershan Biosciences, Inglaterra) à cultura. Após a incubação, as células foram coletadas em um coletor automático de células (cell

harvester, LKB Wallac 1295-001, Turku, Finlândia) e a radioatividade incorporada foi medida em contador de emissões β (Liquid Scintillation Counter 1205 Betaplate, Wallac, Turku, Finlândia); a proliferação foi determinada pela incorporação da radioatividade pelas células e os resultados expressos em cintilações por minutos (cpm).

5.2.3 Determinação das citocinas: ELISA para quantificação de IL-4, IL-10 e IFN- γ .

Um grupo de camundongos BALB/c infectados pela via s.c. foram sacrificados após a 1^a, 2^a, 4^a e 8^a semanas de infecção, e deles foram retirados os linfonodos poplíteos e inguinais para a dosagem de citocinas.

As condições adotadas no ensaio foram as seguintes:

- a. os linfonodos de cada camundongo, foram macerados manualmente em placa de petri estéril contendo 5 mL de RPMI 1640 (SIGMA – ALDRICH, Alemanha);
- b. os homogenatos foram centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos;
- c. o sobrenadante desprezado e o sedimento celular ressuspendido em 5 mL de tampão hemolítico;
- d. seguiu-se nova centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos;
- e. depois o sobrenadante foi desprezado, e o sedimento de células foi ressuspendido em 5 mL de meio R5% (RPMI 1640 (SIGMA – ALDRICH, Alemanha) suplementado com 5% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil);
- f. as células foram contadas em câmaras de Neubauer, diluídas na proporção de 1:1 com corante azul de trypan para verificação da viabilidade celular;
- g. suspensões de células viáveis foram ajustadas a concentração final de 4×10^6 células/mL;
- h. 1000 μ L dessas suspensões foram depositadas em cada orifício da placa para cultura celular com 24 orifícios (Corning-COSTAR, Estados Unidos).

Essas suspensões celulares foram reestimuladas com os antígenos Exo, A.T. e F.M.C. nas concentrações de proteína de 70 µg/mL, 28 µg/mL e 33 µg/mL, respectivamente; e as células foram incubadas por 48 horas e 72 horas em estufa de CO₂ a 37°C. O teste foi realizado em triplicata. Essas amostras foram recolhidas e estocadas a -70°C até o momento da dosagem.

A técnica utilizada foi ELISA de captura, utilizando anticorpos monoclonais, para detecção das citocinas, nas concentrações recomendadas pelo fabricante (R&D System, Minneapolis, USA). Para realizar o procedimento, placas de microtitulação de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpo primário diluído em PBS e mantidas em temperatura ambiente de um dia para o outro. Foi adicionado às placas, PBS contendo 1% de albumina de soro bovino (BSA) para promover o bloqueio de sítios livres do plástico e mantido por 1 hora em temperatura ambiente. As citocinas recombinantes utilizadas para realizar a curva padrão, foram diluídas em PBS contendo 1% de BSA e incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. As amostras também foram incubadas em poços por esse mesmo período. Todos os poços foram lavados com PBS acrescido de tween 20 a 0,05%. Foram adicionados os anticorpos secundários conjugados a biotina, diluídos em PBS e incubados por 2 horas em temperatura ambiente. Os poços foram lavados. As placas foram incubadas com conjugado estreptavidina-peroxidase por 30 minutos em temperatura ambiente e os poços lavados. A revelação foi realizada com o-fenilenodiamina 1mg/mL, diluído em tampão citrato de sódio 0,1M pH 4,5 por 15 a 30 minutos. Para o bloqueio da reação foi utilizado ácido sulfúrico (H₂ SO₄) 4N e a leitura das densidades ópticas (DO) foi realizada em leitor automático, em comprimento de onda de 450 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.

6. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados pelo método One- Way ANOVA, e múltiplas comparações pelo teste de Tukey, com auxílio do software Graphpad

Instat TM. O nível de significância admitido foi de $p < 0,05$ para todas as comparações⁹³.

IV. RESULTADOS

1. Perfil eletroforético do exoantígeno (EXO) e antígeno total (A.T.) de *F. pedrosoi*

Na figura 1 está ilustrada, a eletroforese vertical (SDS-PAGE) do Exo e A.T. obtido do cultivo de *F. pedrosoi*. Podemos observar um perfil protéico de bandas com pesos moleculares variando entre 97 kDa e 20,1 kDa.

Figura 1: Perfil eletroforético do exoantígeno e antígeno total. Linha 1: padrão de peso molecular, Linha 2: exoantígeno e Linha 3: antígeno total.

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

2. Infecção experimental pela via s.c.

2.1 Cinética da evolução da doença pela via s.c

Camundongos foram infectados no coxim plantar direito com 10^6 conídios de *F. pedrosoi* e as patas dos animais foram medidas no tempo 0 e até 42 dias após a infecção. Conforme a figura 2, as patas apresentaram aumento até o 9º dia com picos entre o 7º e 9º dias de infecção. Entretanto, entre o 10º e 18º dia, os tamanhos das patas mantiveram-se constante. A partir do 20º dia ocorreu uma diminuição acentuada do tamanho das patas, mostrando que pela via s.c. ocorre um controle da infecção fúngica.

Figura 2. Cinética da evolução da doença em camundongos infectados pela via subcutânea. Camundongos BALB/c foram infectados no coxim plantar pela via s.c. com 10^6 conídios de *F. pedrosoi*, as patas foram medidas no tempo 0 até 42 dias após a infecção. Controle negativo: PBS estéril inoculado no coxim plantar direito. A diferença entre as patas direita e esquerda de cada animal foi medida em mm. Os resultados representam as médias $\pm$ desvio padrão das diferenças entre as patas direita e esquerda. O experimento foi realizado em triplicata.

2.2 Resposta de Hipersensibilidade do Tipo Tardio (HTT) na cromoblastomicose experimental pela via s.c.

Avaliamos a resposta de HTT em camundongos BALB/c infectados com 10^6 conídios de *F. pedrosoi* pela via s.c. Após a 1^a, 2^a e 4^a semanas de infecção, os animais foram desafiados no coxim plantar com 70 µg/mL de Exo para estudo da hipersensibilidade ao antígeno. Vinte e quatro horas antes do sacrifício dos animais, foi realizado o teste de HTT, no coxim plantar desses camundongos. Podemos observar na figura 3, que na 2^a semana de infecção os camundongos apresentaram uma maior positividade ao teste de HTT. Na 4^a semana, os animais apresentaram uma diminuição da ativação da resposta celular.

Figura 3. Hipersensibilidade do tipo tardio (HTT). Os camundongos BALB/c infectados no coxim plantar direito pela via s.c. com 10^6 conídios de *Fonsecaea pedrosoi*, foram desafiados no coxim plantar esquerdo com exoantígeno após a 1^a, 2^a e 4^a semana de infecção. Vinte e quatro horas antes do sacrifício dos camundongos, foi realizado o teste de HTT. As diferenças entre a pata esquerda antes e depois de inocular o antígeno de cada animal foi medida em mm. Os resultados representam as médias $\pm$ desvio padrão da diferença entre a pata esquerda. O experimento foi realizado em triplicata.

2.3 Subtipagem de linfócitos T nos linfonodos regionais de camundongos BALB/c após a infecção s.c.

Para avaliarmos a influência de células TCD4⁺ e TCD8⁺ durante a cromoblastomicose experimental realizamos a quantificação dessas células nos linfonodos regionais dos animais BALB/c após a 1^a, 2^a e 4^a semanas de infecção com 10⁶ conídios de *F. pedrosoi* pela via s.c. A presença de linfócitos T CD4⁺ ou T CD8⁺ foram caracterizadas pela presença de células duplamente marcadas com anticorpos anti-CD3 (PE) e anti- CD4 (FITC) ou anti-CD3 (PE) e anti- CD8 (FITC), por citometria de fluxo. Na figura 4, observamos que após a 1^a semana de infecção houve um predomínio de células TCD4⁺ nos linfonodos regionais que se mantiveram em níveis elevados pelo menos até a 4^a semana de infecção. Também foi observado que, apesar de em menor número, os linfócitos TCD8⁺ apresentaram um aumento significativo ao longo da infecção.

Figura 4. Subtipagem de linfócitos T. Análise por citometria de fluxo da porcentagem de células TCD4⁺ e TCD8⁺ nos linfonodos poplíteos e inguinais de camundongos BALB/c infectados no coxim plantar via s.c. com 10⁶ conídios de *F. pedrosoi* após a 1^a, 2^a e 4^a semanas de infecção. Nos animais controles foram injetados PBS estéril. Os resultados representam as médias $\pm$ desvio padrão. O experimento foi realizado em triplicata.

2.4 Ensaio de proliferação celular

O ensaio de linfoproliferação foi realizado para avaliar a capacidade dos antígenos de *F. pedrosoi* (Exo, F.M.C. e A.T.) de estimular a proliferação de células totais dos linfonodos poplíteos e inguinais de camundongos BALB/c infectados com 10^6 conídios de *F. pedrosoi* no coxim plantar pela via s.c. Sendo assim, após a 1ª, 2ª e 4ª semanas de infecção avaliamos a capacidade proliferativa dessas células frente aos diferentes antígenos de *F. pedrosoi*. Observamos na figura 5, que após a 1ª semana de infecção as células dos linfonodos regionais foram capazes de proliferar quando estimuladas com os três preparados antigênicos de *F. pedrosoi*. Após a 2ª semana de infecção essas células foram capazes de proliferar com o A.T., já com o Exo e o F.M.C. proliferaram, porém em menor intensidade quando comparados com a proliferação da 1ª semana após a infecção. Após a 4ª semana de infecção as células dos linfonodos não foram capazes de proliferar quando estimuladas com os três antígenos.

Figura 5. Capacidade proliferativa de células totais de linfonodos de animais infectados com 10^6 conídios de *F. pedrosoi* pela via s.c.. Após a 1ª, 2ª e 4ª semana de infecção os animais foram sacrificados e as células dos linfonodos poplíteos e inguinais foram estimuladas *in vitro* com o exoantígeno (Exo), fungo morto por calor (F.M.C.) e antígeno total (A.T.). A proliferação foi determinada pela incorporação de timidina [metil- ^3H] pelas células e os resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de cpm (cintilações por minuto). Controle positivo: células estimuladas com $2\mu\text{g/mL}$ de ConA. Controle negativo: células cultivadas sem estímulos. O experimento foi realizado em triplicata. * Valores significativos comparados com o controle negativo para $p < 0,05$.

2.5 Análise do padrão de citocinas presentes no sobrenadante de cultura de células totais dos linfonodos dos camundongos BALB/c infectados com *F. pedrosoi* pela via s.c.

Avaliamos o padrão de citocinas (IL-4, IL-10, e IFN- γ) liberados no sobrenadante de cultura de células totais dos linfonodos inguinais e poplíteos de camundongos infectados com 10^6 conídios de *F. pedrosoi* pela via s.c. Essas células foram estimuladas *in vitro* durante 72 horas com os antígenos (Exo, F.M.C. e A.T.), após a 1^a, 2^a e 4^a semanas de infecção. Na figura 6, mostramos que a citocina IFN- γ foi produzida em maiores níveis após a 1^a semana de infecção e teve uma diminuição significativa ao longo da infecção. A citocina IL-4 não foi detectada após a 1^a semana de infecção, já na 2^a e 4^a semana de infecção foi detectada, porém em baixas concentrações. Observamos também que a citocina IL- 10 apresentou os maiores níveis após a 2^a semana de infecção e ao fim da 4^a semana de infecção, a concentração dessa citocina estava em níveis basais, assim como as citocinas IFN- γ e IL-4.

Figura 6. Dosagem de citocinas do sobrenadante de cultura de células dos linfonodos. Os camundongos foram infectados com 10^6 conídios de *F. pedrosoi* pela via s.c. Após a 1^a, 2^a e 4^a semana de infecção os animais foram sacrificados e os linfonodos foram retirados e macerados com RPMI, suas células foram estimuladas com os antígenos (Exo, F.M.C. e A.T.) e mantidas na estufa 37° C - 5% de CO₂ por 72 horas. Como controle foi utilizado células dos linfonodos dos camundongos infectados e cultivadas sem estímulo. As citocinas foram dosadas do sobrenadante. Os resultados representam as médias $\pm$ desvio padrão. O experimento foi realizado em triplicata. * Os valores são significativos comparados com o controle para $p < 0,05$.

3. Infecção experimental via i.p.

3.1 Grau de infecção nos órgãos baço e fígado de animais infectados com conídios de *F. pedrosoi*

Avaliamos a evolução da infecção fúngica nos camundongos BALB/c através da carga fúngica medida pelas unidades formadoras de colônia (UFC) nos órgãos baço e fígado. Os animais foram infectados, via i.p. com 10^6 conídios de *F. pedrosoi*. Após a 1ª, 2ª, 4ª e 8ª semanas de infecção, os animais foram sacrificados e os órgãos foram retirados, macerados e uma pequena alíquota plaqueada em ágar Sabouraud para observarmos a carga fúngica de cada órgão. Como observado na figura 7, houve um decréscimo na carga fúngica em ambos os órgãos, ao longo da infecção. Na 1ª semana de infecção, os animais apresentaram a maior carga fúngica tanto no fígado quanto no baço, entretanto após a 8ª semana de infecção, essa colonização diminuiu, tanto no baço como no fígado. Esses resultados demonstraram uma diminuição na quantidade de fungos nos órgãos no decorrer da infecção. Porém, mesmo após a 8ª semana de infecção foi possível detectar fungos nos órgãos mostrando uma tendência a cronicidade da infecção.

Figura 7. Carga fúngica nos órgãos dos animais infectados com a cepa *F. pedrosoi*. Camundongos BALB/c foram infectados com 10^6 conídios de *Fonsecaea pedrosoi* e após a 1ª, 2ª, 4ª e 8ª semanas de infecção os órgãos baço e fígado foram retirados, macerados e a carga fúngica foi analisada através da contagem das UFCs. Os resultados foram expressos em UFC por grama de órgão (UFC/g). Os resultados representam as médias $\pm$ desvio padrão da contagem das UFCs nos tempos de infecção. O experimento foi realizado em triplicata.

3.2 Resposta de Hipersensibilidade do Tipo Tardio (HTT)

Avaliamos a resposta de HTT em camundongos BALB/c infectados com 10^6 conídios de *F. pedrosoi* pela via i.p. Após a 1^a, 2^a, 4^a e 8^a semanas de infecção, os animais foram desafiados no coxim plantar com 70µg/mL de Exo para estudo da hipersensibilidade ao antígeno. Vinte e quatro horas antes do sacrifício dos animais, foi realizado o teste de HTT, no coxim plantar desses camundongos. Podemos observar na figura 8, que ao longo da infecção teve um aumento na positividade do teste de HTT, demonstrando que a imunidade celular estava preservada, mesmo após a 8^a semana de evolução da doença. Outro resultado observado foi a possibilidade da utilização do Exo produzido por *F. pedrosoi* na avaliação da resposta celular na cromoblastomicose experimental.

Figura 8. Hipersensibilidade do tipo tardio (HTT). Os camundongos BALB/c infectados pela via i.p. com 10^6 conídios de *Fonsecaea pedrosoi* foram desafiados no coxim plantar esquerdo com o exoantígeno após a 1^a, 2^a, 4^a e 8^a semanas de infecção. Vinte e quatro horas antes do sacrifício dos animais, foi realizado o teste de HTT. Controle negativo: PBS estéril inoculado no coxim plantar direito. A diferença entre as patas direita e esquerda de cada animal foi medida em mm. Os resultados representam as médias $\pm$ desvio padrão da diferença entre as patas direita e esquerda de cada animal. O experimento foi realizado em triplicata.

3.3 Grau de infecção nos órgãos baço e fígado dos animais C57BL/6 “WT”, C57BL/6 CD4 “KO” e C57BL/6 “KO”.

Avaliamos a evolução da infecção fúngica nos camundongos C57BL/6 “WT”, C57BL/6 CD4 “KO” ou C57BL/6 CD8 “KO” através da carga fúngica medida pelas unidades formadoras de colônia (UFCs) nos órgãos baço e fígado. Os animais foram infectados, via i.p. com 10^6 conídios de *F.pedrosoi*. Após a 1ª, 2ª, 4ª e 8ª semana após a infecção, os animais foram sacrificados e os órgãos foram retirados, macerados e uma pequena alíquota (200µL) plaqueada em ágar Sabouraud para observarmos a carga fúngica de cada órgão.

Como observado na figura 9A e 9B, os camundongos C57BL/6 CD4 “KO” apresentaram uma grande quantidade de UFCs no baço e fígado após a 1ª semana de infecção, sendo que após a 2ª semana de infecção ocorreu uma diminuição acentuada de carga fúngica nos dois órgãos. Na 4ª e 8ª semana de infecção, os animais apresentaram uma redução da carga fúngica, sendo que somente no baço houve diferença em relação ao grupo controle (C57BL/6 “WT”).

Nos animais C57BL/6 CD8 “KO” apresentaram uma carga fúngica maior na 1ª semana de infecção, nos demais tempos não houve diferença em relação ao grupo controle. (figura 9A e 9B).

Figura 9. Carga fúngica nos órgãos dos animais infectados com a cepa *F. pedrosoi*. Camundongos C57BL/6 "WT", C57BL/6 CD4 "KO" e C57BL/6 CD8 "KO" foram infectados com 10^6 conídios de *Fonsecaea pedrosoi* e após a 1ª, 2ª, 4ª e 8ª semanas de infecção os órgãos baço e fígado foram retirados, macerados e a carga fúngica foi analisada através da contagem das UFCs. Os resultados foram expressos em UFC por grama de órgão (UFC/g). Os resultados representam as médias $\pm$ desvio padrão da contagem das UFCs nos tempos de infecção. O experimento foi realizado em triplicata. * Valores significativos comparados com o controle (C57BL/6 "WT") para $p < 0,05$.

3.4 Resposta de HTT em camundongos C57BL/6 WT, C57BL/6 T CD4 “KO” ou C57BL/6 T CD8 “KO”.

Avaliamos a resposta de HTT em camundongos C57BL/6 “WT”, C57BL/6 CD4 “KO” ou C57BL/6 CD8 “KO” infectados com 10^6 conídios de *F. pedrosoi* pela via i.p. Após a 1ª, 2ª, 4ª, e 8ª semana de infecção, os animais foram desafiados no coxim plantar com 70µg/mL de Exo para estudo da hipersensibilidade ao antígeno. Vinte e quatro horas antes do sacrifício dos animais, foi realizado o teste de HTT, no coxim plantar desses camundongos. Na figura 10, observamos que os camundongos C57BL/6 CD4 “KO” apresentaram uma baixa reação ao teste de HTT ao longo da infecção quando comparados aos animais controle (C57BL/6 “WT”). Os animais C57BL/6 CD8 “KO” foram capazes de induzir uma ativação da resposta imune celular e ocorreu um aumento na positividade do teste de HTT ao longo da infecção, resultado semelhante aos animais controle (C57BL/6 “WT”).

Figura 10. Hipersensibilidade do tipo tardio (HTT). Os camundongos C57BL/6 selvagens, TCD4^{-/-} ou TCD8^{-/-} infectados pela via i.p. com 10^6 conídios de *Fonsecaea pedrosoi* foram desafiados no coxim plantar esquerdo com o Exo após a 1ª, 2ª, 4ª e 8ª semana de infecção. Vinte e quatro horas antes do sacrifício dos animais foi realizado o teste de HTT. Controle negativo: PBS estéril inoculado no coxim plantar direito. A diferença entre as patas direita e esquerda de cada animal foi medida em mm. Os resultados representam as médias $\pm$ desvio padrão da diferença entre as patas direita e esquerda de cada animal. O experimento foi realizado em triplicata. * Valores significativos comparados com o controle (C57BL/6 “WT”) para $p < 0,05$.

3.5 Análise do padrão de citocinas presentes no macerado dos órgãos após infecção

Avaliamos o padrão de citocinas (IL-4, IL-10 e IFN- γ) encontrado no sobrenadante do macerado dos órgãos baço e fígado dos camundongos C57BL/6 "WT", C57BL/6 CD4 "KO" e C57BL/6 CD8 "KO" infectados com 10^6 conídios de *F. pedrosoi*.

Na 1ª semana de infecção os camundongos C57BL/6 CD4 "KO" apresentaram níveis baixos da citocina IFN- γ nos órgãos baço (figura 11A) e fígado (figura 11B). Na 4ª e 8ª semana após a infecção apresentaram os níveis mais baixos com diferença significativa em relação ao controle (C57BL/6 "WT"). A citocina IL-10 do fígado (figura 11E) apresentou os maiores níveis na 8ª semana após a infecção com diferenças significativas em relação ao controle (C57BL/6 "WT"). Os níveis de IL-4 (11C e 11D) foram semelhantes ao grupo controle (C57BL/6 "WT") ao longo da infecção.

Os animais C57BL/6 CD8 "KO" apresentaram maiores níveis de IFN- γ no início da infecção (figura 11A e 11B), resultados semelhantes aos animais controles. A citocina IL-4 (figura 11C e 11D) também não apresentou diferenças em relação ao controle. A citocina IL-10 (figura 11E e 11F) produzida pelo baço apresentou maiores níveis na 4ª e 8ª semana após a infecção com diferenças significativas em relação ao controle.

Figura 11. Padrão de citocinas nos órgãos baço e fígado dos camundongos C57BL/6 "WT", C57BL/6 CD4 "KO" e C57BL/6 CD8 "KO". Os camundongos foram infectados com 10^6 conídios de *Fonsecaea pedrosoi* pela via i.p. Após a 1ª, 2ª, 4ª e 8ª semana de infecção foram sacrificados e os órgãos foram retirados e macerados com PBS estéril e centrifugados a 2500 rpm a 5 minutos. As citocinas foram dosadas do sobrenadante. Os resultados representam as médias $\pm$ desvio padrão. O experimento foi realizado em triplicata. * Valores significativos comparados com o controle (C57BL/6 "WT") para $p < 0,05$.

V. DISCUSSÃO

O mecanismo de defesa do hospedeiro nas lesões fúngicas ainda é pouco conhecido, embora nas últimas décadas tenham sido realizados alguns estudos relativos à interação fungo-hospedeiro. Na maioria das vezes, os fungos são saprófitas e o parasitismo é uma ocorrência acidental e não necessária para a continuidade do ciclo de vida dos mesmos. De maneira geral, nosso sistema imunológico é capaz de eliminar ou pelo menos controlar a maioria das infecções fúngicas. As formas graves da doença quase sempre estão associadas a algum tipo de deficiência imunológica. A maioria das micoses sistêmicas (candidíase, histoplasmose, coccidioidomicose, blastomicose e paracoccidioidomicose) são controladas principalmente por mecanismos imunológicos mediados por células $T^{42, 25, 37}$. A resposta inflamatória pode ser modificada por uma variedade de citocinas produzidas por linfócitos, macrófagos e vários outros tipos de células^{10, 91, 56}. Contudo, os efeitos das citocinas são complexos e muitas dessas substâncias tais como IFN- γ , TNF- α , IL-1 e IL-10 têm efeito interreguladores^{29, 80, 40}.

A cromoblastomicose é uma micose subcutânea, com alto índice de morbidade e raramente os indivíduos tem cura da micose e até o momento são poucos os trabalhos que relatam sobre a relação parasito-hospedeiro nessa micose. Alguns têm focado a interação fungo-hospedeiro e os achados apontam para uma resposta imune predominantemente celular, com ativação de macrófagos envolvidos na fagocitose do fungo. Nessa micose, a fagocitose, *in vitro*, parece prejudicada e a morte das células fúngicas raramente ocorre. Acredita-se que a persistência *in situ* do fungo seja o principal fator responsável pela morbidade da doença^{90, 69}.

Até o momento, não existem trabalhos na literatura com modelos experimentais explorando aspectos da resposta imune adaptativa na cromoblastomicose. Sabe-se que o desenvolvimento de um modelo experimental de infecção é fundamental para o estudo da construção da resposta imune. Esse

modelo é amplamente utilizado para definir populações celulares, citocinas e moléculas envolvidas na resistência ou susceptibilidade do hospedeiro frente a um patógeno. Na cromoblastomicose, vários modelos foram estudados utilizando diferentes rotas de infecção como intravenosa, intraperitoneal e subcutânea, porém nenhum desses modelos foram capazes de levar a cronicidade em animais imunocompetentes^{1, 14, 46, 58, 64}. Porém, Cardona- Castro e Agudelo- Flores, (1999) estabeleceram um modelo de cromoblastomicose crônica em animais imunocompetentes pela via i.p. abrindo caminhos para estudos da resposta imune inata e adquirida em animais.

O enfoque do nosso trabalho foi estudar alguns aspectos da resposta imune adaptativa em dois modelos de infecção experimental, um pela via s.c. (entrada natural do fungo no homem) e outro pela via i.p. Observamos que na infecção pela via s.c. os animais curam aproximadamente em 30 dias e que por essa via as células T CD4⁺ parecem ser importantes no controle da cromoblastomicose e que na via i.p. essas mesmas células são importantes no período inicial da infecção, portanto outras células principalmente da imunidade inata estariam envolvidas no controle da doença.

Primeiramente, tentamos estabelecer o modelo pela via s.c. que é a via de entrada natural do fungo no homem e verificamos que em aproximadamente 4 semanas ocorre a cura espontânea dos camundongos BALB/c. Esse resultado vai de acordo com a literatura de que a maioria dos modelos experimentais de infecções fúngicas pela via s.c. leva a cura em aproximadamente em 30 dias^{38, 55}.

Os camundongos BALB/c, após a 1ª semana de infecção apresentaram uma resposta de HTT aumentada. Por outro lado, na 2ª e 4ª semana de infecção os camundongos no teste de HTT apresentaram baixas reações cutâneas, quando os animais já estavam superando o processo infeccioso. Contrariando dados da literatura que foram verificados por Oliveira *et al.*, (2002) ao relatar que pacientes com a forma grave da paracoccidioidomicose (PCM) apresentavam baixa reatividade aos antígenos fúngicos; já os com a forma branda da patologia apresentam teste cutâneo positivos.

No modelo pela via s.c. ocorreu à cura dos animais, todavia realizamos a subtipagem de linfócitos T na tentativa de saber quais células estariam participando mais ativamente no controle da cromoblastomicose. Ocorreu um predomínio de linfócitos T CD4⁺ nas células totais dos linfonodos regionais dos camundongos BALB/c pelo menos até 30 dias de infecção. Já a população de células T CD8⁺, apesar de em menor número no início da infecção, apresentou um aumento até o 30º dia de infecção, sugerindo que essa população também poderia estar contribuindo para o controle da doença. Podemos sugerir que pela via s.c. na cromoblastomicose tanto os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ são cruciais para o controle da infecção. ASHMAN *et al.*, (1999) demonstraram na candidíase murina que ambos os linfócitos T CD4⁺ T CD8⁺ são essenciais para reduzir a severidade da doença.

Posteriormente, avaliamos a capacidade das células totais dos linfonodos proliferarem *in vitro* frente a estímulos antigênicos do fungo. Após a 1ª semana de infecção, as células totais dos linfonodos apresentaram um elevado índice de proliferação celular com secreção predominante de IFN- γ , quando estimuladas *in vitro* com os diferentes antígenos de *F. pedrosoi*. Após a 2ª semana de infecção, as células apresentaram uma menor capacidade proliferativa frente aos antígenos de *F. pedrosoi*, enquanto na 4ª semana não houve proliferação e, nesse mesmo tempo, as citocinas analisadas estavam em níveis basais.

Pela via s.c., demonstramos que as células T CD4⁺ poderiam ser uma das células que estariam participando ativamente no controle da doença, produzindo principalmente IFN - γ nos momentos iniciais da infecção. As células T CD8⁺ também podem ter um papel protetor, já que a porcentagem dessas células aumentaram no decorrer da infecção. Quando os animais já se encontravam curados, as células não proliferaram *in vitro* a nenhum dos antígenos testados, levando à crer que em tempos mais tardios da infecção subcutânea os linfócitos estariam em estado anérgico. Esses dados corroboram com o teste de HTT em que os camundongos apresentaram, baixas reações cutâneas em tempos mais tardios da infecção.

A possível migração de linfócitos T CD4⁺/CD25⁺ antígeno- específica poderiam justificar a ausência da proliferação. Dentro dessa hipótese o que poderia estar controlando a infecção em tempos mais tardios seriam outras células como macrófagos, neutrófilos ou células NK; o fungo também poderia estar em granulomas compactos dificultando a ativação de linfócitos T para controlar a infecção.

Como pela via s.c. não ocorreu a cronicidade, utilizamos um modelo que já havia sido estabelecido por Cardona e Castro, 1999 pela via i.p. Os camundongos apresentaram após a 8^a semana de infecção, colonização nos órgãos, demonstrando uma tendência a cronicidade. Nesse aspecto, o modelo experimental pode estar mimetizando a infecção em humanos, que na maioria dos casos é observada uma infecção com caráter granulomatoso crônico.

Ainda nessa via de inoculação, avaliamos a ativação da resposta imune *in vivo* e observamos que o antígeno utilizado foi capaz de induzir uma ativação da resposta celular observada no teste de HTT. Essa resposta indicou que a imunidade celular nos animais estava preservada, mesmo após 60 dias de infecção. A diminuição da carga fúngica coincidiu com um aumento de HTT nesses animais, sugerindo que a baixa colonização nos órgãos infectados pode ter favorecido a migração dessas células para outro foco inflamatório, o coxim plantar. Já foi observado em PCM experimental que a relação existente entre a reação de hipersensibilidade e o número de UFC/g nos órgãos é inversamente proporcional entre esses dois parâmetros, ou seja, quanto maior o número de UFC/g recuperados dos órgãos examinados, menor a reação de hipersensibilidade tardia. Este fato, também, é usual na doença humana uma vez que o tratamento com a melhora clínica dos pacientes associa-se, em muitas ocasiões, a reversão da anergia nos testes cutâneos³⁶.

Experimentos com camundongos BALB/c atímicos e eutímicos¹⁶ confirmaram a importância dos linfócitos T na PCM experimental. A doença é mais grave nos animais deficientes de linfócitos T do que naqueles suficientes para essa população celular.

Com a intenção de determinar se os linfócitos T CD4⁺ estariam envolvidos na proteção da cromoblastomicose, infectamos com conídios de *F. pedrosoi*, camundongos nocautes para essa população celular, e o grau de infecção foi analisado.

O grau de infecção foi avaliado pela cultura dos órgãos (fígado e baço) pela técnica de UFC. Após a 1ª semana de infecção os camundongos C57BL/6 CD4⁺ “KO” apresentaram maior disseminação fúngica quando comparado aos animais controle (C57BL/6 “WT”). A partir da 2ª semana de infecção esses camundongos apresentaram uma redução drástica da carga fúngica nos órgãos analisados, porém a carga fúngica ainda era maior que a do grupo controle (C57BL/6 “WT”) com diferença significativa. Já, no teste de HTT esses mesmos camundongos nocautes para CD4 apresentaram uma baixa resposta de HTT frente ao exoantígeno.

Os linfócitos T, principalmente células T CD4⁺ são importantes no controle inicial da infecção por *F. pedrosoi*. Em tempos mais tardios a infecção foi controlada mesmo em camundongos deficientes de linfócitos T CD4⁺, sugerindo que outras células, como macrófagos ou NK, estariam atuando de forma mais efetiva no controle da infecção. Outra hipótese seria que após a 2ª semana de infecção os fungos já estariam contidos em granulomas compactos o que faria que os linfócitos T não tivessem um papel decisivo no controle da infecção. Outro fato pode ser que as células T CD8⁺ estariam em maior número nesse animais nocautes para células T CD4⁺, e atuando de forma efetiva no controle da infecção.

Animais deficientes de células T CD4⁺ apresentaram uma fraca resposta ao teste de HTT ao longo da infecção, mesmo quando em tempos mais tardios a carga fúngica estava menor. Este fato não corrobora com o caso na doença humana, que foi explicado anteriormente, uma vez que a melhora clínica dos pacientes associa-se, em muitas ocasiões, a reversão da anergia nos testes cutâneos³⁶.

Pela técnica de UFC, camundongos C57BL/6 T CD8⁺ “KO” apresentaram uma carga fúngica semelhante aos animais controle. Nossos resultados sugerem

que os linfócitos T CD8⁺ não exercem função protetora nos animais por essa via de infecção. Este fato não é usual em outras patologias, visto que trabalhos de diferentes grupos têm demonstrado que as células T CD8⁺ contribuem na defesa do hospedeiro contra a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*⁸², *Toxoplasma gondii*¹⁵, *Leishmania ssp*³⁴, *Histoplasma capsulatum*²⁸ e *Cryptococcus neoformans*⁴³ entre outros.

A resposta do teste de HTT foi positiva em todos os tempos de infecção, não apresentando diferença em relação ao controle. Com base nesses dados, pode-se aventar a hipótese de que os linfócitos T CD8⁺ não são responsáveis pela formação do edema de HTT na cromoblastomicose experimental.

As citocinas induzidas por um organismo ou antígeno logo após a entrada no organismo influencia se as células T “helper” 0 (Th₀) vão desenvolver-se em células Th₁ que produzem interleucina-2 (IL-2), IFN-γ e TNF-β, ou células Th₂ que auxiliam na maturação de células B e produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13⁴⁵. As células Th₁ e as linfocinas que elas produzem são associadas com a resposta imune celular, enquanto as que as células Th₂ e suas linfocinas são associadas com a imunidade humoral. Se um imunógeno ou organismo estimula macrófago a produzir IL-12, então as células NK são estimuladas a produzir IFN-γ resultando em uma resposta Th₁⁸⁷.

Em geral em hospedeiros imunocompetentes, os fungos patogênicos induzem preferencialmente células Th₁ ou resposta imune celular, a qual fornece ao hospedeiro alguma proteção. A extensão e eficácia da resposta imune celular na proteção contra os diferentes fungos podem variar dependendo da rota de infecção, do tecido infectado e a resposta imune local, o padrão genético do hospedeiro, e o isolado que está causando a infecção.

Em nosso modelo estudado, camundongos nocautes de T CD4⁺, durante o período de infecção analisados, apresentaram menores níveis de IFN-γ, quando comparadas ao controle, e no decorrer da infecção esses níveis diminuíram significativamente. Enquanto, os níveis de IL-10 aumentaram no decorrer da infecção. Esses dados levam a crer que a cronicidade observada nesses animais pode ser pelo aumento de IL-10 e a conseqüente diminuição de IFN-γ. Esse fato foi

observado em humanos com cromoblastomicose, em que indivíduos com a forma grave da doença apresentam altos níveis de IL-10 e com a forma leve, altos níveis de IFN- γ . Portanto, torna-se evidente que a resposta imune protetora na cromoblastomicose deve ser sustentada por células do tipo 1, ou por outra fonte secretora de IFN- γ .³⁹

Em outro trabalho que avaliaram a expressão de citocinas em cortes histológicos por imunohistoquímica em pacientes com cromoblastomicose, observaram que pacientes com a forma grave da doença possuíam células que expressavam IL-10, IL-4 e TNF- α , não sendo detectada expressão local de IFN- γ . Na forma leve foi encontrada células expressando IFN- γ , TNF- α e IL-4 e não foi encontrado expressão de IL-10²⁶.

A produção de IFN- γ em camundongos nocautes de T CD4⁺ pode ser por outras células como células NK ou células T CD8⁺ devido aos próprios mecanismos compensatórios de camundongos nocautes. Como foi demonstrado ocorreu uma diminuição das UFCs em camundongos nocautes de T CD4⁺ podemos sugerir que outras células estariam envolvidas no controle da infecção em tempos mais tardios da infecção. Os níveis de IL-4, nos animais nocautes de T CD4⁺ apresentaram níveis semelhantes ao controle.

No animais nocautes de linfócitos T CD8⁺ não foi observada alteração na carga fúngica em relação ao controle. Este perfil foi acompanhado de maiores níveis de IFN- γ na 1ª semana de infecção, resultado semelhante ao controle. Estes resultados são compatíveis com o UFC, onde os animais que apresentam maior carga fúngica apresentaram maiores níveis de IFN- γ . Este fato explicaria ou estaria em concordância com o achado de resposta de HTT positivas nos animais nocautes de T CD8⁺ com a diminuição da carga fúngica.

Esterre *et al.*, (1993) avaliaram a reação imune mediada por células através da expressão de citocinas TGF- β , TNF- α e IFN- γ e de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em biópsias de lesões cutâneas pacientes com cromoblastomicose, sem discriminação do tipo de lesão. Os autores, através de estudo semi-quantitativo dos diferentes tipos celulares, encontraram pequena participação de linfócitos T

CD4⁺ e T CD8⁺, alguns macrófagos expressando TNF- α e ausência de células expressando IFN- γ .

Na resposta imune natural e adquirida participam várias células produtoras de citocinas T CD4⁺, T CD8⁺, NK, leucócitos PMN, macrófagos, células epiteliais do baço e fígado, etc. Assim, as citocinas são o reflexo da atividade secretora das diferentes subpopulações celulares e de seus efeitos inibitórios umas sobre as outras. Além disso, o influxo de células inflamatórias (linfócitos T e B, macrófagos, leucócitos PMN) que expressam receptores para citocinas, leva ao consumo dos mediadores produzidos localmente o que resta no sobrenadante é o que sobrou da complexa interação entre síntese e consumo.

Entretanto, a análise conjunta de nossos resultados demonstrou que na cromoblastomicose pela via s.c. podemos sugerir que nesse modelo há uma polarização para uma resposta do tipo Th1. Já na via i.p., as células T CD4⁺ são reguladoras da carga fúngica no início da infecção e que os linfócitos T CD8⁺ parecem ter uma função secundária no controle da cromoblastomicose experimental. Além disso, o nível de citocina IFN- γ é inversamente proporcional à carga fúngica.

No entanto, para um melhor entendimento, faz-se necessário à realização de experimentos adicionais, como o uso de camundongos atímicos para avaliar a importância de linfócitos na cromoblastomicose experimental.

VI. CONCLUSÕES

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

- Pela via de entrada natural do fungo ocorreu a cura dos camundongos BALB/c em aproximadamente 30 dias. Durante esse tempo de infecção ocorreu um predomínio de células T CD4⁺;
- Ainda na via s.c., nos primeiros dias de infecção a resposta celular foi mediada predominantemente por linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ , podendo nesse modelo estar ocorrendo uma polarização de resposta para Th1.
- Através do ensaio de HTT em camundongos BALB/c infectados pela via i.p., o antígeno utilizado foi capaz de ativar uma resposta de HTT, e a imunidade celular estava preservada, mesmo após 60 dias de infecção;
- Nos camundongos nocautes de células T CD4⁺ ou T CD8⁺, demonstramos que os linfócitos T, principalmente as células T CD4⁺ são importantes no controle inicial da infecção e que os linfócitos T CD8⁺ parecem não ter função importante no controle da carga fúngica;
- Em relação ao teste de HTT, as células T CD4⁺ mostraram-se importantes mediadoras da resposta celular;
- Os linfócitos T CD4⁺ parecem ter pequena participação na regulação da produção de citocinas nos órgãos baço e fígado, pois os animais nocautes para essa população de linfócitos apresentaram poucas alterações na produção de citocinas (IFN - γ , IL-4 e IL-10).

- Os linfócitos T CD8⁺ parecem não ter participação na regulação da produção de citocinas nos órgãos baço e fígado, pois os animais nocautes para essa população de linfócitos não apresentaram diferenças em relação ao controle.

VII. REFERÊNCIAS

1. AHRENS, J.; GRAYBILL, J.R.; ABISHAWL, A.; TIO, O.F.; RINALDI, M.G.
Experimental murine chromomycosis mimicking chronic progressive human disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1989; 6:651-658.
2. AL-DORY, Y. Chromomycosis. **Missoula: Mountain Press**, 1972, 203p.
3. ALVIANO, D. S.; FRAZEN, A. J.; TRAVASSOS, L. R.; HOLANDINO, C.; ROZENTAL, S.; EJZEMBERG, R.; ALVIANO, C. S.; RODRIGUES, 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.
4. ANTHONY T.C.; McALEER R. Chromomycosis. Report of a case from West Austrália. **Australas J. Dermatol**: p. 7:13, 1963.
5. ARANGO, M.; JARAMILO, C.; CORTÉS, A.; RESTREPO, A. Auricular chromoblastomycosis by *Rhinocladiella aquaspersa*. **Med. Mycol.**, Plymouth. 36:43-45.1998.
6. ARELLANO-OCAMPO F. TAMAYO PEREZ R. VICTORIA R. Cuatro casos de cromomicosis por *Cladosporium carronii* y su tratamiento. **Der ILA**, 10:309, 1968.
7. ASHMAN, R.B.; FULURIJA, A., PAPADIMITRIOU, J.M. Both CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes reduce the severity of tissue lesions in murine systemic candidiasis, and CD4⁺ cells also demonstrate strain-specific immunopathological effects. **Microbiology** 145: p. 1631-40, 1999.
8. AZULAY, R.D.; SERRUYA, J. Hematogeneous dissemination in chromoblastomycosis. **Arch Dermatol**. 95:57-60, 1967.
9. BATRES, E.; WOLF, E.; RUDOLPH, A.H.; KNOX, J.M. Transepithelial elimination of cutaneous chromomycosis. **Arch Dermatol** 114:1231-2, 1978.

10. BEAMAN, L.; BENJAMINI, E.; PAPPAGIANIS, D. Activation of macrophages by lymphokines: enhancement of phagosome-lysosome fusion and killing of *Coccidioides immitis*. **Infection Immun.**, v.39, p.1201-1207, 1983.
11. 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.
12. BOOP, C. Cromoblastomycose- Contribuição ao estudo de alguns de seus aspectos. Porto Alegre, 1959. **Tese** – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
13. BORELLI D. Casual agents of chromoblastomycosis (chromycocetes) **Proceedings of the International Conference on the Mycoses**. PAHO Sc Publ 396, 334-5, 1980.
14. BORELLI, D. A method for producing chromomycosis in mice. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1972; 66:793-794.
15. BROWN, C.R.; McLEOD, R. Class I MHC genes and CD8⁺ cells determine up number in *Toxoplasma gondii* infection. **J. Immunol.** 145: 3438-41, 1990.
16. BURGER, E.; MIYALI, M.; SANO, A.; CALICH, V.L.G.; NISHIMURA, K.; LENZI, H.L. Histopathology of paracoccidioidomycotic mice: a sequential study. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, 55:235-242, 1996.
17. 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.
18. CAPLAN, R.M. Squamous carcinoma in a longstanding lesion of chromoblastomycosis. **Arch Dermatol**, 97:38, 1968.
19. CARDONA-CASTRO, N. & AGUDELO –FLÓREZ, P. Development of a cronic chromoblastomycosis model in immunocompetent mice. **Med. Mycol.**, 37:81-83, 1999.
20. CARRION, A. Chromoblastomycosis. **Ann NY Acad. Sci.** 50:1255-82, 1950.
21. CASTRO L.G.M. Chromycosis: a therapeutic challange (letter). **Clin. Infect Dis**, 15:553, 1992.

22. 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.
23. CASTRO, R.M.; CASTRO, L. G. M. On the priority of description of chromycosis. **Mycosen**, 30:397-403, 1987.
24. CHANDLER, F.W.; KAPLAN, W.; AJELLO, L. **A colour atlas and textbook of the histopathology of mycotic diseases**. London, Wolfe Med. Pub, 1980. P. 47-9.
25. COX, R.A.; POPE, R.M. Serum-mediated suppression of lymphocyte transformation responses in coccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v.55, p.1058-1062, 1987.
26. 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.
27. D'AVILA S.C.; 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. **Mycophatologia**. 156(2):51-60.2002.
28. DEEPE, G. S. Jr. Role of CD8⁺ T cells in host resistance to systemic infection with *Histoplasma capsulatum* in mice. **J. Immunol**. 152: 3491-500, 1994.
29. DIAMOND, R.D. Immune response to fungal infection. Reviews of infectious diseases, v. 11, n.7, p. 1600-1604, nov/dec. 1989. Supplement.
30. ESTERRE, P.; PEYROL, S.; SAINTE-MARIE, D.; PRADINAUD, R.; GRIMAUD, J.A. Granulomatous reaction and tissue remodelling in the cutaneous lesion of chromomycosis. **Virchows Archiv. A. Patholo. Anat**. 422: p. 285-291, 1993.

31. ESTERRE, P.; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A.; RAMARCEL, E.R.; PECARRERE, JEAN-LOUIS. Forty years of chromoblastomycosis in Madagascar. A review. **Trop. Med. Hyg.** **55**: p. 45-7, 1996.
32. ESTERRE, P.; JAHEVITRA, M.; ANDRIANTSIMAHAVANDY. Humoral immune response in Chromoblastomycosis during and after therapy. **Clinical and diagnostic laboratory Immunology.** **7**: p. 497-500, 2000.
33. FARBIARTZ, S.R.; CARVALHO, T.U.; ALVIANO, C.S.; DE SOUZA, W.. Inhibitory effect of melanin on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with mamalian cells *in vitro*. **J.Med. Mycol.** **30**: p. 265-273,1992.
34. FARREL, J.P.; M^ULLER, J.; LOUIS, J. A role for Lyt-2⁺ T cells in resistance to cutaneous leishmaniasis in immunized mice. **J. Immunol.** **142**: p. 2052-6, 1989.
35. FORSTER, H.M.; HARRIS, T.J.Malignant change (squamous carcinoma) in chronic chromoblastomycosis. **Austi NZJ Surg**, **57**: p.775-7, 1987. Apud: 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.
36. FRANCO, M.V.; GOES, A.M.; KOURY, M.C. Model of in vitro granulomatous hypersensitivity in human paracoccidioidomycosis. **Mycophatologia.** 1997; 137 (3):129-36.
37. FROMTLING, R.A.; SHANDOMY, H.J. An overview of macrophage-fungal interactions. **Mycophatologia**, v.93, p.77-93, 1986.
38. GESZTESI, JEAN-LUC, DIAS, M.A.A.; SOUZA, A.R.; ALMEIDA, S.R.; LOPES, J.D.; MARIANO, M. Subcutaneous infection of mice with *Paracoccidioides brasiliensis* induces a peculiar pattern of inflammatory and immune responses. **Mycophatologia.** v.145, p.7-14, 1999.
39. GIMENES, V.M.F.; SOUSA, M.G.T.; FERREIRA, K.S.; MARQUES, S.G.; GONÇALVES, A.G.; SANTOS, V.C.L.; PEDROSO E SILVA, C.D.; ALMEIDA, S.R. Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. **Microbes Infect.** 2005 Mar 21.

40. GOERDT, S.; ORFANOS, C.E. other functions, other genes: alternative activation of antigen- presenting cells. **Immunity**, v.10, p. 137-143, 1999.
41. HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, F.; DE BILVRE C.; CAMACHO-ARROYO I.; CERBON M.A.; DUONT B.; LOPEZ-MARTINEZ R. Sex hormone effects on *Phialophora verrucosa* in vitro an characterization of progesterone receptors. **J. Med. Vet. Mycol.** 33:235-239, 1995.
42. HOWARD, D.H. Mechanism of resistences in the systemic mycosis. In: NAHAMIAS A.J.; O'REILLY, R.J., (Ed.) **Immunology of human infections**. New York: Plenum Medical Book Co., 1981. part I, p. 475-494.
43. HUFFNAGLE, G. B.; YATES, J.L.; LIPSCOMB, M.F. Immunity to a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection requires both CD4⁺ and CD8⁺ T cells. **J. Exp. Med.** 173: 793-800, 1991.
44. IWATSU, T.; MIYAJI, M.; TAGUCHI, H.; OKAMOTO, S. Evaluation of skin test for chromoblastomycosis using antigens prepared from culture filtrates of *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa*, *Wangiella dermatitidis* and *Exophiala jeanselmei*. **Mycophatologia**. 77, 59-64, 1982.
45. JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P. Immunobiology: The immune system in health and disease. 2 ed. New York: Garland Publishing Inc. 1996.
46. KURITA, N. Cell-mediated immune responses in mice infected with *Fonsecaea pedrosoi*. **Mycophatologia**. 1979; 68: 9-15.
47. LACAZ, C.S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C., HEINS-VACARI, E.M., MELO, N. T. **Tratado de micologia médica**. 1 ed. SARVIER. 2002
48. LANE, C.G. A cutaneous lesion caused by a new fungus *Phialophora verrugosa*. **J. cutan. Dis.** 33: 840-48, 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.
49. LAVALLE, P. Chromomycosis. In: CANIZARES O, ed. **Clinical Tropical dermatology**. London, Blackwell, 1975. p.36- 41. Apud: 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.

50. LONDERO, A.T.; RAMOS, C.D. Cromoblastomicose no interior do Estado do Rio Grande do Sul. **An Bras. Dermatol**, 64:155-8, 1989.
51. MATSUMOTO, T.; MATSUDA, T.; Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis. **Semin. Dermatol**. v. 4. p.240-251, 1985.
52. MCGINNIS, M.R. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: New concepts, diagnosis and mycology. **Journal of the American Academy of Dermatology**.8:1-16, 1983.
53. MEDLAR, E.M. A cutaneous infection caused by a new fungus *Phialophora verrugosa* with a study of the fungus. **J. Med. Res.** 32: 507-22, 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.
54. MOORE, M., ALMEIDA F. de. Etiologic of chromoblastomycosis (chromoblastomycosis of Terra, Torres, Fonseca and Leão, 1922), of North and South America. **Rev. Biol. Hyg.**(São Paulo), v.6, p.94-97, 1935. Apud: AL-DORY, Y. Chromomycosis. Missoula: Mountain Press, 1972, 203p.
55. NASCIMENTO, R.C. Identificação e caracterização de componentes antigênicos protéicos secretados por *Sporothrix schenckii*. São Paulo, 2004. **Dissertação de mestrado**. Faculdade de Ciências Farmacêutica da Universidade de São Paulo.
56. NATHAN, C.F. Secretory products of macrophages. **J. Clin. Invest.**, v. 79, p. 319-326, 1987.
57. NIMRICHTER, L.; BARRETO-BERGTER, E.; MENDONÇA-FILHO, R.R.; KNEIPP, L.F.; MAZZI, M.T.; SALVE, P.; FARIAS, S.E.; WAIT, R.; ALVIANO, C.S.; RODRIGUES, M.L. A monoclonal antibody to

glucosylceramide inhibits the growth of *Fonsecaea pedrosoi* and enhances the antifungal action of mouse macrophages. **Microbes and Infection**. 6, 657-665, 2004.

58. NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. Defense mechanisms of mice against *Fonsecaea pedrosoi* infection. **Mycopathologia**. 1981; 76: 155-166.
59. OKUDA, C.; ITO, M.; OKA, K. Relationship between tissue reactions and morphological changes of the fungi in chromoblastomycosis: morphometry and electron microscopy. **Arch Dermatol Res**, 284:95-9, 1992.
60. ODDS, F.C.; ARAI, T.; DISALVO, A. F.; EVANS, E.G.V.; HAY, R.J.; RANDHAWA, H.S.; RINALDI, M.G.; WALSH, T.J. Nomenclature of fungal disease: a report and recommendation 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.
61. OLIVEIRA, S.J.; MAMOMI, R.L.; MUSATTI, C.C.; PAPAIOORDANOU, P.M.; BLOTTA, M.H. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. **Microbes and Infection**. V. 4(2), p. 139-144, 2002.
62. PEDROSO, A. & GOMES, J. M.. Sobre quatro casos de dermatite verrugosa produzida pela *Phialophora verrucosa*. **An. Paul. Med. Cirurg**. 11: 53-61, 1920. Apud: ANDRADE, T. S. de. Suscetibilidade *in vitro* de agentes da cromoblastomicose frente a diferentes antifúngicos. **Dissertação de mestrado**. São Paulo, 1999. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
63. PIVETTA, M. Da malária às doenças emergentes. **Revista Pesquisa FAPESP**. ed. 03/73.2002.
64. POLAK, A. Experimental infection of mice by *Fonsecaea pedrosoi* and *Wangiella dermatitidis*. **Sabouraudia**. 1984; 22: 167-169.
65. PURIM, K. S. M. Cromoblastomicose. Aspectos histológicos e micológicos durante o tratamento com itraconazol. Curitiba. 1991, Yese. Universidade Federal do Paraná. Apud: 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.
66. 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.
 67. RIPPON, J. W. Chromoblastomycosis and related dermal infections caused by dematiaceous fungi. In: **Medical mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes**. 2 ed. Philadelphia, Sauders, 1982. pp. 249-76
 68. ROZENTAL, S.; ALVIANO, C.S.; SOUZA, W.DE. Fine structures and cytochemical study of the interaction between *Fonsecaea pedrosoi* and rat polymorphonuclear leukocyte. **J. Med. Vet. Mycol.**, 34: 323-330, 1996.
 69. ROZENTAL, S.; ALVIANO, C.S.; SOUZA, W.DE. The in vitro susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* to activated macrophages. **Mycopathologia**, 126:85-91, 1994.
 70. RUDOLPH, M. Über die brasilianische "Figueira". **Arch. Schiffs-Tropenhyg.**, 18: 498, 1914. 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.
 71. SALFEDER K. **Atlas of fungal pathology**. Dordrecht. Kluwer. 1990. p: 154-50.
 72. 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.
 73. SAN BLAS, G . The cell wall of fungal human pathogens: It's possible role in host relationships. **Mycopathologia**, 79: 159-184, 1982.

74. SILVA, D.B. da. **Micose de Lane e Pedroso (Cromicose ou Cromoblastomicose) Aspecto atual do tema.** Belém,1955. Tese de concurso para professor catedrático de clínica dermatológica e sifilografica da Faculdade de Medicina e cirurgia do Pará.
75. SILVA, C.L.; FAZIOLI, R.A. Role of the fungal cell wall in the granulomatous response of mice to the agents of chromomycosis. **J. Med. Microbiol.** 1985; 20:299-305.
76. SILVA, A.C.C.M.; SERRA NETO, A.; GALVÃO, S.E.S.; MARQUES, S.G.; SALDANHA, A.C.R.; SILVA, C.M.P.; FISHMAN, 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.** 25:37-44, 1992.
77. SILVA, C.P.M.; ROCHA, R.M.; MORENO, J.S.; BRANCO, M.R.F.C.; SILVA, R.R.; MARQUES, S.G.; COSTA, J.M.L. O babaçu (*Orbinya Phalerata* Martins) como provável fator de risco de infecção humana pelo agente de cromoblastomicose no Estado do Maranhão, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 28:49-52, 1995.
78. SILVA, J. P.; SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Chromoblastomycosis a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brasil). **Mycophatologia**, 143:1-5, 1999.
79. SILVA, J.P., DINIZ, J.A.P., ROZENTAL, S. Cromoblastomicose no Estado do Pará: uma revisão (de 1942 à 1997) dos últimos 55 anos. In: **II Congresso Brasileiro de Micologia**, Rio de Janeiro. 1998. Annais. P.90.
80. STEIN, M., ET AL. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a maker of alternative immunologic macrophages activation. **J. Exp. Med.**, v.176, p. 287-292, 1992.
81. TAKASE, T.; BABA, T.; UYENO, K. Chromomycosis. A case with widespread rash, lymphonode metastasis and multiple subcutaneous nodules. **Mycoses** 31: p. 343-52, 1988.

82. TARLETON, R.L. Depletion of CD8⁺ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.** 144: 717-24, 1990.
83. 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.
84. TERRA, F., TORRES, M., FONSECA FILHO, O. ARÊA ALEÃO, A.E. Novo tipo de dermatide verrucosa; micose por *Acrotheca* com associação de leishmaniose. **Brasil Médico**, 36:363-8, 1922. Apud: AL-DORY, Y. Chromomycosis. **Missoula: Mountain Press**, 1972, 203p.
85. TIBIRIÇÁ, P. Q. T. **Anatomia patológica da deramatide verrucosa cromomicótica**. São Paulo. 1939. Tese. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
86. TORINUKI, W.; OKOHCHI, K.; TAKEMATSU, H.; TAGAMI, H. Activation of the alternative complement pathway by *Fonsecaea pedrosoi*. **The Journal of investigative dermatology**. 83: 308-310, 1984.
87. TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptative immunity. **Annu. Rev. Immunol.** 13: 251-76, 1995.
88. URIBE, F., ZULUACA, A.I.; LEON, W.; RESTREPO, A. **Histopathology of Chromoblastomycosis**. *Mycopathology*, 105: 1-6, 1989.
89. 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.
90. WALTER, P.; GARIN, Y.; RICHARD-LENOBLE, D. **Chromoblastomycosis: A morphological investigation of the host-parasite interactions**. *Virchows. Arch. (Pathol. Anat.)*, v.397, p.203-214, 1982.

91. WU-HSIEH, B.; ZLOTNIK, A.; HOWARD, D. H. T cell hibridoma produced lymphokines that activated macrophages to supress intracellular growth Histoplasma capsulatum. **Infection and Immunity**. v.43, p. 380-385, 1994.
93. ZAR, J.H. Bioestatistical Analysis. 2^a ed. New Jersey, Prentice Hall, p. 718, 1984.