

Universidade de Brasília – UnB  
Faculdade de Medicina – FM  
Pós-Graduação em Patologia Molecular

**Influência das frações da parede celular do fungo *Fonsecaea pedrosoi* sobre a ativação de células peritoneais de camundongos *in vitro***

Yanna Karla de Medeiros Nóbrega

Brasília-DF  
Maio-2007

Yanna Karla de Medeiros Nóbrega

Influência das frações da parede celular do fungo *Fonsecaea pedrosoi* sobre a ativação de células peritoneais de camundongos *in vitro*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Título de Mestre Patologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca

Brasília – DF

2007

Aos meus pais, Nilson e Lúcia, e Ylanna que me fizeram ser o que sou hoje.  
A minha família Medeiros, esteio de minha vida em todos os momentos.  
À vovô Peri, vovó Gracinda e tia Marineves pelo amor  
Ao meu querido amigo e parceiro de trabalho Tiago dos Santos Eustáquio (*in memorian*)  
A minha amiga Ana Cláudia Freire Medeiros (*in memorian*) pela cumplicidade e carinho  
Aos companheiros da Gakai que me fizeram acreditar na vida com sabedoria e paciência.

## **Agradecimentos**

À minha família que mesmo longe dos meus braços esteve presente na minha caminhada ao longo da elaboração deste trabalho.

À minha tia Maria José de Medeiros, pelo exemplo profissional e pessoal de vida e pelo incentivo.

À minha irmã, Ylanna pela companhia e cuidado comigo.

À minha orientadora, Dra Anamélia, pela dedicação, companheirismo, ensinamento e amizade, ao longo de todo o caminho na pós-graduação.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Universitário de Brasília (HUB), em especial os da Imunologia pela compreensão em todos os momentos. Obrigada Gláucia, Márcia, Franco, Fábio, Cléia, Amabel, Aluísio e Gildo.

Às minhas amigas Viviane Furlan Lozano e Ormy Maria Collodetti que dedicaram tantas horas de ajuda e companhia na execução do trabalho.

Aos amigos Pedro Albuquerque Silva e José Mário Soares de Araújo pelo apoio, dedicação e amizade e ajuda informática.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Imunopatologia da UnB Rosane, Alice, André, Janaína, Elisa, Tarciane e Daniel.

Aos Profs. Drs. Carlos Eduardo Tosta e Maria Imaculada Muniz Junqueira pela valiosa contribuição na minha formação profissional.

Aos colegas do Laboratório de Pediatria, Rita e Rodrigo, e aos Profs Dr. Pratesi e Dra Lenora pelo exemplo de vida e dedicação ao trabalho.

Aos Profs. Dr. Cleudson Castro Nery, Dra. Dâmaris Silveira, Profa. Dra. Patrícia Medeiros, Ms. Enéas Fontes de Andrade Júnior e Ivane Graciano Ribeiro pelo incentivo nos momentos difíceis.

Aos amigos e a todas as pessoas que me acompanharam e me guiaram ao longo dessa caminhada.

À Universidade de Brasília e ao programa de Pós-graduação em Patologia Molecular que possibilitaram a realização deste trabalho.

E ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) que financiaram este trabalho.

## Resumo

A Cromomicose é uma micose crônica, supurativa e granulomatosa, que tem distribuição cosmopolita. O *Fonsecaea pedrosoi* é o principal agente etiológico da cromomicose no mundo. A infecção inicia-se a partir de um trauma com a implantação no tecido subcutâneo de conídios e fragmentos de hifas do fungo, causando a lesão inicial. No hospedeiro essas estruturas do fungo se diferenciam em células escleróticas, estabelecendo a doença. Em função da importância do estabelecimento de uma resposta imune celular eficiente através da interação entre as células do sistema imunológico com os componentes da parede celular dos fungos, que são capazes de promover a ativação destas, o objetivo do presente trabalho foi analisar a influência das frações da parede celular do *Fonsecaea pedrosoi* na ativação dos fagócitos peritoneais obtidos de camundongos. Nossos resultados revelaram que após 4 horas da inoculação das preparações houve a migração predominante de neutrófilos, e com 72 horas a migração de macrófagos. As frações F2 e o fungo inativado estimularam a migração de linfócitos B predominantemente e os fagócitos de 4 horas produziram óxido nítrico espontaneamente. A fração F1 induziu uma alta produção de IL-12 nas células que migraram após 72 horas da inoculação das frações. O fungo inativado e a fração F2 induziram a produção de IL-10. A estimulação prévia das células com a fração F2 diminuiu o índice de fagocitose e aumentou a produção de IL-10. Nossos resultados sugerem que a fração F2 modula a resposta imunológica para Th2 enquanto que a fração F1 modula a resposta imunológica para Th1 na cromomicose.

Palavras-chaves: cromomicose, melanina, *Fonsecaea pedrosoi*,  $\alpha$ -1-3-glucana,  $\beta$ -1-3-glucana, macrófagos, neutrófilos, óxido nítrico e citocinas

## **Abstract**

Chromoblastomycosis is a chronic suppurative granulomatous mycosis that exists all around the world. The *Fonsecaea pedrosoi* is the most frequent etiologic agent in the world. The infection begins with a trauma and the implantation of conidia or hyphae fragments in the subcutaneous tissue producing the initial lesion. Inside the host, a fungus structure differentiates into sclerotic forms allowing the establishment of the disease. Considering the importance of the establishment of an efficient immune cellular response, through the interaction between the cells of the immunologic system with the components of the fungus wall, the objective of the present work was to analyze the influence of the fractions from the *Fonsecaea pedrosoi* cellular wall in the activation of murine peritoneal phagocytes extracted from mice. Our result demonstrates that after 4 hours after of the inoculation of the solutions the migration was constituted predominantly by neutrophils, and after 72 hours predominantly by macrophages. The F2 fractions and the inactive fungus stimulate predominantly the migration of B lymphocytes and the four hours phagocytes produced spontaneously nitric oxide. The F1 fraction induced the high production of IL-12 in the cells that migrated after 72 hours of the fractions inoculation. The inactive fungus and the F2 fraction induced the IL-10 production. Cells previously stimulated with the F2 fraction resulted in a decreased phagocytosis index and increased the IL-10 production. Our results suggest that, in chromoblastomycosis, the F2 fraction modulates the immunological Th2 type response while the F1 fraction modulates the immunological Th1 type response.

Key-words: chromoblastomycosis, melanin, *Fonsecaea pedrosoi*,  $\alpha$ -1-3-glucan,  $\beta$ -1-3-glucan, macrophages, neutrophils, nitric oxide e cytokines.

## Abreviaturas

AGS-1	Alfa-1-3-glucana sintase
BSA	Albumina Bovina Sérica
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
CD	marcador celular
DAB	Diaminobenzidina
D.O.	densidade ótica
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay – Enzimaimunoensaio
F1	Fração F1 do <i>Fonsecaea pedrosoi</i>
F2	Fração F2 do <i>Fonsecaea pedrosoi</i>
F3	Fração F3 do <i>Fonsecaea pedrosoi</i>
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ácido Fosfórico
IF	Índice de Fagocitose
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IgG1	Imunoglobulina da classe G1
IgA	Imunoglobulina da classe A
IgM	Imunoglobulina da classe M
iNOS	Óxido nítrico sintase
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC-II	Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II
NEED	N-1(1-Naphthyl)ethyl-enedinamine
NO	Óxido Nítrico
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	nitrato
O <sub>2</sub>	oxigênio
RPMI	meio usado para cultura de células
SBF	Soro Bovino Fetal
Th1	Resposta auxiliar do tipo I
Th2	Resposta auxiliary do tipo II
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$
$\alpha$ -glucana	alfa-glucana
$\beta$ -glucana	beta-glucana

## Sumário

Resumo	IV
Abstract.	V
Abreviaturas	VI
<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
1.1. Cromomicose	1
1.2. <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	4
1.3. Resposta Imunológica na Cromomicose	7
<b>2. Objetivos</b>	<b>11</b>
<b>3. Materiais e Métodos</b>	<b>12</b>
3.1. <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	12
3.1.1. Cultivo dos fungos	12
3.1.2. Obtenção das frações da parede celular do <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	12
3.1.2.1. Extração da Fração F1	12
3.1.2.2. Extração da Fração F2	13
3.2. Animais	13
3.2.1. Grupos experimentais	14
3.3. Migração de células para o peritônio dos camundongos	14
3.4. Dosagem de óxido nítrico	15
3.5. Dosagem de citocinas	16
3.5.1. Dosagem de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )	16
3.5.2. Dosagem de interleucina 10 (IL-10)	17
3.5.3. Dosagem de interleucina 12 (IL-12)	17
3.6. Imunocitoquímica	18
3.7. Índice de Fagocitose	19
3.7.1. Preparação das leveduras - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
3.7.2. Obtenção das células do peritônio dos camundongos para realização da Fagocitose	19
3.7.3. Índice de fagocitose	20
3.8. Análise estatística	20
<b>4. Resultados</b>	<b>21</b>
4.1. Análise do perfil de ativação das células que migram para o peritônio após inoculação	21
4.2. Análise da influência da fração F2 na ativação das células peritoneais	30
<b>5. Discussão</b>	<b>37</b>
<b>6. Conclusão</b>	<b>46</b>
<b>7. Perspectivas</b>	<b>47</b>
<b>8. Referências</b>	<b>48</b>
<b>9. Anexo</b>	<b>58</b>



# INTRODUÇÃO

## 1.1. Cromomicose

A Cromomicose é uma micose crônica, supurativa e granulomatosa, que tem distribuição cosmopolita, sendo mais observada nos países subtropicais e tropicais como o Brasil, onde atinge principalmente os trabalhadores rurais, do sexo masculino, com idade entre 30 e 60 anos (Ogawa *et al*, 2003, Silva *et al*, 2002, Gimenes *et al*, 2005, Marques *et al*, 2006).

Esta micose já foi relatada em mais de 50 países, distribuídos por todos os continentes. O país de maior incidência desta doença é o Brasil seguido por Madagascar, Costa Rica, República Dominicana e Austrália (Al-Doory, 1972). Entre os países do continente americano onde ela é prevalente podemos citar, além do Brasil, o México e Cuba (Simón *et al*, 1998, Silva *et al*, 1999, Salgado *et al*, 2004).

No Brasil foram diagnosticados entre 1985 e 1996, 71 casos no estado do Paraná (Queiroz Filho, 1997); 100 casos diagnosticados entre 1963-1998 no estado do Rio Grande do Sul (Minotto *et al*, 2000) e após um estudo entre 1942-1997 com 325 casos diagnosticados a região Amazônica foi considerada endêmica (Silva *et al*, 1999). No Brasil também são consideradas áreas endêmicas o Rio Grande do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (Matte *et al*, 1997). Além dos casos relatados no Brasil, outros casos de cromomicose têm sido relatados no México, Estados Unidos, Sri Lanka e Japão (Nimrichter *et al*, 2004).

A patologia foi descrita pela primeira vez por Alexandre Pedroso no Brasil em 1911, mas os primeiros 6 casos da patologia só foram descritos em 1914 por Max Rudolph (Fuchs & Pecher, 1992). Rudolph conseguiu pela primeira vez isolar, cultivar o fungo e reproduzir a patologia em modelo experimental, ele só não descreveu os aspectos histológicos da doença, principalmente a presença dos corpos escleróticos, que foram descritos pela primeira vez por Lane e Medlar em 1915 (Brigoo & Destombes, 1922).

Os agentes etiológicos da cromomicose são fungos membros da família *Dematiaceae* como o *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa*, *Cladophialophora carrionni*, *Fonsecaea compacta* e *Rinocladiella aquaspersa* (Gimenes *et al*, 2005), sendo o *Fonsecaea pedrosoi*, o fungo mais frequentemente isolado das lesões e o principal agente etiológico da cromomicose no mundo (Matte *et al*, 1997, Silva *et al*, 2002, Marques *et al*, 2006). Em 1997, foram estudados 1.323 casos em Madagascar, acompanhados desde 1985, sendo descritos dois ecossistemas bem definidos nesta infecção: um no norte do País, provocado pelo

*Fonsecaea pedrosoi* e outro no sul, para *Cladosporium carrionii* (Esterre *et al.*, 1997); o *Cladosporium carrionii* também tem sido isolado na Venezuela e Austrália; e o *Phialophora verrucosa* é o mais freqüente em regiões frias da América do Norte (Lacaz *et al.*, 2002).

A infecção inicia-se a partir de um trauma com a implantação no tecido subcutâneo de conídios e fragmentos de hifas do fungo, causando a lesão inicial (Corbellini *et al.*, 2006). No hospedeiro essas estruturas do fungo, que são as formas infectantes, aderem às células epiteliais e se diferenciam em células escleróticas, estabelecendo assim a doença (Limongi *et al.*, 1997, Gimenes *et al.*, 2006).

A inalação de esporos e a disseminação hematogênica têm sido descritas como uma possível via de disseminação da doença (Howard *et al.*, 1991). Esta via já havia sido descrita por Baquero *et al.* (1961) e Wilson *et al.*, (1961) onde os autores sugeriram que o trato respiratório pode ser uma porta natural de entrada no organismo, apresentando uma subsequente disseminação hematogênica responsável por manifestações cutâneas. A disseminação do fungo pode ocorrer por via linfática, pois um dos fungos dessa micose já foi isolado de lesões lifonodais e já se observou também casos de abscessos hipodérmicos generalizados (Palamino & Armenteros, 1947).

Durante a fase inicial da cromomicose pode ocorrer a eliminação transepitelial ou dermoepitelial espontânea do fungo, onde o tecido conectivo lesado pela inoculação de lascas de madeira ou espinhos pode expelir o fungo através da epiderme, resultando em pontos negros na superfície da lesão (Limongi *et al.*, 1997, Silva *et al.*, 2002). Esses pontos negros no local de inoculação do fungo representam uma forma de resistência do fungo que é capaz de sobreviver por longos períodos e recidivar a lesão (Rosen & Overholt, 1996).

A cromomicose é caracterizada clinicamente pelo desenvolvimento lento de lesões de pele polimórficas, que aparecem como nódulos, verrugas, tumores, placas e cicatrizes no tecido (Gimenes *et al.*, 2006). Essas lesões iniciam-se pela erupção de lesões papulosas, nódulos ou lesões verrucosas formados nos pontos de inoculação do fungo. As placas verrucosas apresentam-se com aspecto crostoso e às vezes com características papilomatosas. As lesões ulceram-se podendo formar uma crosta aderente e espessa sobre a lesão. Outras vezes apresentam um aspecto vegetante, evoluindo e tornando-se papilomatoso. Devido ao aumento dos vasos sanguíneos nas lesões, estas podem sangrar com facilidade (Lacaz *et al.*, 2002; Azulai *et al.*, 2004). As lesões evoluem lentamente, produzindo fibrose tecidual que prejudicará a circulação linfática, com aumento do volume da parte acometida e conseqüente

elefantíase, com perda total ou parcial da capacidade funcional do membro atingindo. Na maioria dos casos, os pacientes mantêm-se em bom estado geral (Talhari, 1995).

A identificação do fungo nas lesões é realizada através do exame micológico direto e da cultura das lesões (D'Ávila *et al*, 2002, Corbellini *et al*, 2006). Associado a esses exames laboratoriais, o diagnóstico é confirmado pelo exame histopatológico de fragmentos dos tecidos onde o fungo está causando a lesão (David, 1998).

Os padrões histológicos apresentados na cromomicose variam de acordo com o aspecto das lesões, podendo ser eritematosos ou verrucosos. As lesões eritematosas apresentam dermatite granulomatosa superficial e intensa com granuloma supurativo. Na derme observa-se um infiltrado celular misto e difuso, composto de macrófagos, neutrófilos, linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, células epidermóides, células multinucleadas gigantes isoladas e de muitos mastócitos. Nestas lesões são observados alguns microabcessos com uma grande quantidade de fungos geralmente em divisão e há intensa proliferação de vasos capilares e fibrose dérmica. Na epiderme observa-se hiperplasia pseudoepiteliomatosa, com presença de linfócitos T CD4<sup>+</sup> distribuídos difusamente e algumas células expressando interleucina IL-10 na sua superfície (D'Ávila *et al*, 2002).

As lesões verrucosas apresentam aspecto histológico de dermatite granulomatosa superficial e granuloma tuberculóide bem formado, apresentando células epitelióides com arranjo compacto, células de Langerhans e linfócitos. Na epiderme o infiltrado inflamatório é superficial, onde os linfócitos T CD4<sup>+</sup> são identificados na periferia do granuloma e macrófagos no centro, são observadas também células expressando interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), os mastócitos estão presentes em pequeno número, não são observados microabcessos e os fungos estão no interior das células gigantes (Richard-Blum *et al*, 1998, Sotto *et al*, 2004). Na derme, há uma moderada proliferação de vasos capilares, e uma fibrose extensa e progressiva que está associada à persistência do fungo. O centro da lesão verrucosa é caracterizado por uma reação de fibrose densa, envolvendo a espessura da derme inteira, com um padrão como a escleroderma. A zona de fibrose contém essencialmente colágeno tipo I, laminina, elastina e fibronectina. Já a região de infiltrado inflamatório contém colágenos tipo III e IV, laminina e fibronectina (D'Ávila *et al*, 2002).

A doença é insidiosa e a lesão aumenta e progride lentamente, desafiando os tratamentos usuais e levando a freqüentes recidivas (D'Ávila *et al*, 2002). Há relatos de lesões que se desenvolveram por períodos superiores à 30 anos (Esterre *et al*, 2000). Na maioria dos casos a doença causa desconforto estético aos pacientes, uma vez que ela acomete

principalmente mãos, pés e membros inferiores, sem haver comprometimento de função dos membros em grande parte dos casos (D'Ávila *et al*, 2002).

Quando não diagnosticada na fase inicial, o curso da cromomicose crônica pode causar alguns problemas graves, como a dificuldade de tratamento devido ao recrudescimento da doença, a associação potencial com o crescimento de carcinoma epidermóide, a baixa qualidade de vida do paciente e a sua incapacidade para o trabalho (Nimrichter *et al*, 2004). Nos casos onde ocorre fibrose extensa é freqüente o bloqueio dos vasos linfáticos o que facilita as infecções secundárias por bactérias causando um linfedema que pode incapacitar o paciente para trabalhar (Ogawa *et al*, 2003)

Alguns tipos de tratamentos têm sido usados ao longo dos anos, dentre as drogas mais usadas podemos citar o triazole (Dafaveri & Graybill, 1990), terbinafina (Richard-Blum *et al*, 1998, Esterre *et al*, 2000), itraconazol (Queiroz Filho, 1997, Ogawa *et al*, 2003, Gimenes *et al*, 2006), anfotericina-B e 5-fluorocitosina (Matte *et al*, 1997), algumas delas apresentando sucesso terapêutico em casos isolados, mas nenhum tratamento efetivo foi encontrado ainda (Nimrichter *et al*, 2004). A maioria dos tratamentos não responde adequadamente, por essa razão algumas alternativas como crioterapia e ressecção cirúrgica são escolhidas em casos onde as lesões são pequenas e circunscritas (Cardona-Castro *et al*, 1996).

## **1.2. *Fonsecaea pedrosoi***

O *Fonsecaea pedrosoi* é o agente etiológico mais freqüente da cromomicose (Matte *et al*, 1997). Ele é um fungo polimórfico que vive na natureza como saprófita, sendo encontrado no solo, nos vegetais e em troncos de madeira apodrecidos (Nimrichter *et al*, 2004, Lacaz *et al*, 2002). O fungo *Fonsecaea pedrosoi* foi isolado de algumas fontes como os espinhos da planta *Mimosa pudica* (Salgado *et al*, 2004) e do coco Babaçu (*Orbignya phalerata Martius*) (Marques *et al*, 2006).

O *F. pedrosoi* é considerado um fungo polimórfico por apresentar mais de duas formas de desenvolvimento, como os conídios, hifas ou micélios considerados as formas saprofíticas, e os corpos escleróticos ou células muriformes isolados ou ligados às hifas, que são considerados a forma patogênica. (Silva *et al*, 2002; Alviano *et al*, 1992).

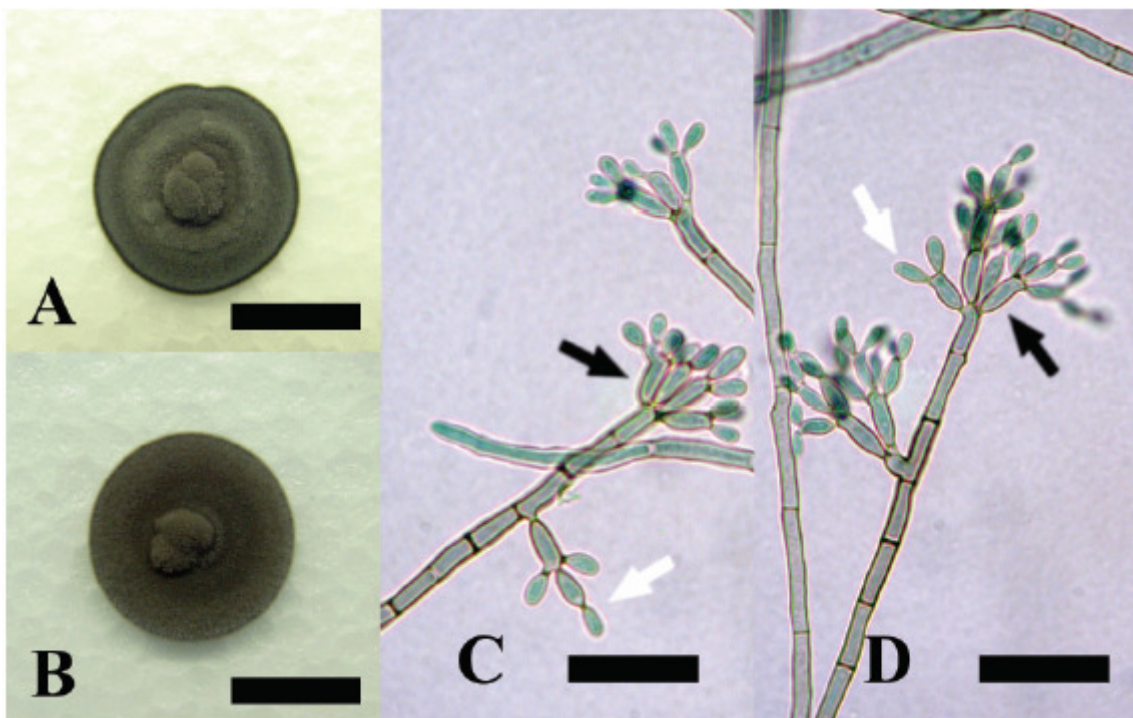


Figura 1- Macro e micromorfologia do *Fonsecaea pedrosoi*. Aspectos macroscópicos da cultura do fungo (A e B), que apresenta coloração negra e aveludada. Micromorfologia, hifas apresentando conidióforos terminais (seta preta) e conídios (seta branca) (C e D) (Salgado *et al*, 2004).



Figura 2- Corpos escleróticos ou células muriformes do *Fonsecaea pedrosoi* (seta preta, E), forma patogênica (Salgado *et al*, 2004)

San-Blas *et al* (1982), Peck (1947) e Alviano *et al* (1991) demonstraram respectivamente que os polissacarídeos da parede celular do fungo, os lipídeos e o ácido siálico são capazes de induzir reação granulomatosa pulmonar em animais e estão relacionados com a patogenicidade do fungo. Em micélios e parede celular de conídios foram

identificados glicose, manose, ramnose e glucosamina. Na parede celular das hifas foram identificados lipídeos e proteínas. Todos estes componentes podem influenciar no reconhecimento do fungo pelas células alvo do hospedeiro (Limongi *et al*, 1997).

A parede celular de diversos fungos como o *Fonsecaea pedrosoi*, o *Paracoccidioides brasiliensis* (Kanetsuna *et al*, 1970, Kanetsuna & Carbonell, 1970) e o *Histoplasma capsulatum* (Sá-Nunes *et al*, 2004) é constituída de lipídeos, proteínas e polissacarídeos, que apresentam uma quantidade variável de cada um desses componentes de acordo com cada fungo. Os polissacarídeos presentes na parede celular dos fungos são a glicose, a manose, a galactose e os polímeros alfa( $\alpha$ )-glucana, beta( $\beta$ )-glucana, galactomanana e quitina (Kanetsuna *et al*, 1970, Kanetsuna & Carbonell, 1970, San-Blas *et al*, 1987). As beta-glucanas são encontradas esterificadas de várias formas distintas como a  $\beta$ -1-6-glucana,  $\beta$ -1-3-glucana e associação dos dois tipos  $\beta$ -(1-3)-(1-6) glucana, que geralmente estão complexados com a quitina. As ligações da  $\beta$ -1-3 com a  $\beta$ -1-6 glucana determinam a rigidez e a solubilidade desses componentes (Gopal *et al*, 1984). Assim como para os fungos citados, os polissacarídeos presentes na parede celular do *Fonsecaea pedrosoi* podem ser separados em três frações. A fração F1 é composta predominantemente de  $\beta$ -1-3-glucana e quitina, a fração F2 é composta de  $\alpha$ -1-3-glucana e melanina, e a fração F3 é composta por galactomanana (Silva *et al*, 1985, Szaniszlo *et al*, 1972).

A fração F1 de *Fonsecaea pedrosoi* estudada por Silva *et al* (1985) foi capaz de induzir uma reação granulomatosa no pulmão de camundongos. A mesma fração F1 obtida do *Paracoccidioides brasiliensis* apresentou uma resposta granulomatosa no pulmão de camundongos similar à observada pelo *F. pedrosoi* (Silva & Fazioli, 1985). Estudos relatam ainda que a  $\beta$ -1-3-glucana da parede celular de *Paracoccidioides brasiliensis* e do *Histoplasma capsulatum* promovem o recrutamento de células inflamatórias e estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias incluindo o TNF- $\alpha$  (Rappleye & Goldman, 2006). A capacidade dos fagócitos de se ligarem à  $\beta$ -glucana foi primeiramente descrita em estudos *in vitro* utilizando a *Saccharomyces cerevisiae* ou seus componentes de parede como zimosan. A importância desta interação para a indução da resposta imune inata foi confirmada nas infecções induzidas pela *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* (Brown, 2006) e *Pneumocystis carinii* (Saijo, 2007).

Outro componente importante na interação entre o hospedeiro e o fungo é a melanina, que está presente na fração F2 da parede celular. A melanina é um pigmento polimérico escuro que pode influenciar no armazenamento de água e íons, aumentar a resistência do fungo à lise por fagócitos, irradiação solar, luz ultravioleta e destruição por radicais livres

(Alviano *et al*, 1991; Franzen *et al*, 1999). A presença do pigmento na parede celular do fungo e em estruturas citoplasmáticas está relacionada com a patogenicidade do microorganismo, embora o mecanismo não esteja totalmente compreendido. Foi demonstrado que as células pigmentadas são menos susceptíveis aos antifúngicos, o que contribui para a persistência da infecção em humanos (Limongi *et al*, 1997; Franzen *et al*, 1999). Alguns fungos produzem melanina como o *Cryptococcus neoformans*, *Wangiella dermatitidis*, *Lacazia loboi*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, *Aspergillus fumigatus* e *Paracoccidioides brasiliensis*, apesar de não serem considerados fungos pigmentados, a melanina desempenha papel de resistência à lise pelos fagócitos do hospedeiro (Wang *et al*, 1995; Silva *et al* 2005).

A melanina do *Fonsecaea pedrosoi* é constituída de carboidratos (manose, galactose e glicose), aminoácidos (ácido aspártico, ácido glutâmico, leucina, glicina e alanina) e ácidos graxos saturados (ácidos palmítico, oléico, estearílico e linoléico) (Alviano *et al*, 1991; Alviano *et al*, 2003).

O segundo componente presente na fração F2 é a  $\alpha$ -1-3-glucana, um polissacarídeo de parede celular que está presente em todos os fungos patogênicos dimórficos e que está relacionado com a virulência de alguns como o *Paracoccidioides brasiliensis* e o *Histoplasma capsulatum* (Kurokawa *et al*, 1998, Rappleye & Goldman, 2006). San-Blas *et al* (1987) relataram que a diminuição desse polissacarídeo na parede celular do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* resultou em uma diminuição de sua virulência. Outros estudos também sugerem que a virulência do *Histoplasma capsulatum* está relacionada com a presença de  $\alpha$ -1-3-glucana (Kurokawa *et al*, 1998). Para provar que a  $\alpha$ -1-3-glucana contribui para a virulência do *Histoplasma capsulatum*. Rappleye *et al* (2004) através da depleção da síntese da  $\alpha$ -1-3-glucana por RNA interferente (RNAi), observaram uma redução na colonização pulmonar pelo fungo e na sua habilidade de se proliferar e destruir os macrófagos em cultura., ou seja, a perda da  $\alpha$ -1-3-glucana não permitiu o crescimento do fungo *in vitro*. Foi demonstrado que a  $\alpha$ -1-3-glucana está disposta na camada externa da parede celular do *Histoplasma capsulatum* e interfere na ligação da  $\beta$ -1-3-glucana com o receptor dectin-1 diminuindo a produção de TNF- $\alpha$  (Rappleye *et al*, 2007)

### **1.3. Resposta Imunológica na Cromomicose**

A resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro no curso da cromomicose tem sido de grande interesse. O mecanismo de defesa do indivíduo influencia na manifestação e

severidade da infecção causada pelo fungo, além de as formas clínicas da doença dependerem da resposta imune do paciente (Gimenes *et al*, 2006).

Nas infecções causadas pelos fungos, o principal mecanismo de defesa é desenvolvido pelos fagócitos, principalmente neutrófilos e macrófagos, que os destroem pela produção de óxido nítrico (NO), reativos intermediários do oxigênio ou outros componentes secretados por essas células (Machado *et al*, 2004). Além da ação de fagocitose, estas células podem desempenhar a função de célula apresentadora de antígeno aos linfócitos T, estimulando a produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), e a participar da formação da resposta inflamatória granulomatosa (Teixeira de Souza *et al*, 2006).

Na cromomicose, os neutrófilos são células importantes na eliminação dos fungos, por um processo independente de anticorpos, que envolve a produção de oxigênio (O<sub>2</sub>) (Rozental, 1996). Mecanismo diferente acontece na Aspergilose, onde a eliminação do fungo pelo neutrófilo é realizada por mecanismos não oxidativos. Esses mecanismos embora não esclarecidos garantem que o neutrófilo seja capaz de inibir o crescimento da forma filamentosa do fungo, enquanto os macrófagos alveolares eliminam os conídios inalados, evitando o desenvolvimento da aspergilose, que só acontece quando há falhas no mecanismo dessas células (Diamond, 1989).

Assim como para outras infecções por patógenos intracelulares, os macrófagos têm um papel fundamental na infecção pelo *Fonsecaea pedrosoi*. Essas células e seus produtos estão envolvidos no desenvolvimento da resposta inflamatória granulomatosa. A importância da ativação dos macrófagos na eliminação do fungo foi demonstrada por Ahrens *et al* (1989), onde macrófagos residentes não apresentam nenhuma atividade fungicida e fungistática *in vitro* quando incubados com leveduras do *Fonsecaea pedrosoi*. Estes dados foram confirmados por Farbiarz *et al* (1990), que cultivando macrófagos residentes com conídios de *Fonsecaea pedrosoi* observaram a baixa atividade citotóxica destas células sobre o fungo, pois os mesmos foram capazes de proliferar, independentes de estarem aderidos à superfície dos macrófagos ou fagocitados. A capacidade do macrófago de conter o crescimento do *Fonsecaea pedrosoi* depende da ativação dos macrófagos, pois após a sua ativação desenvolvem atividade fungistática (Rozental *et al*, 1994).

O *F. pedrosoi* é capaz de modular a ativação dos macrófagos, pois foi demonstrado que os macrófagos, na presença do fungo, são capazes de produzir altas concentrações de peróxido de hidrogênio e baixas concentração de óxido nítrico (NO) em decorrência da ação da melanina sobre a produção deste mediador (Bocca *et al.*, 2006). Estes dados foram



confirmados por Hayakawa *et al* (2006) que após compararem a interação entre os macrófagos e as espécies *C. carrionii*, *F. pedrosoi*, *P. verrucosa* e *R. aquaspersa* observaram que apesar do *F. pedrosoi* ser o mais fagocitado ele foi capaz de induzir uma baixa expressão do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) e da proteína de superfície CD80, além de uma diminuição na produção de NO.

A importância da melanina na interação entre os fagócitos e o fungo foi demonstrada quando anticorpos específicos para a melanina impediram o crescimento de conídios e corpos escleróticos de *F. pedrosoi* além de aumentarem a fagocitose dos fungos pelos neutrófilos. A melanina também aumentou o metabolismo oxidativo dos neutrófilos, levando a uma maior destruição dos fungos fagocitados (Alviano *et al.*, 2004).

Os anticorpos produzidos são IgG1, IgM e IgA. A produção de IgG1 confirma a possível presença de linfócitos T, principalmente da subpopulação do tipo Th2 (Esterre *et al.*, 2000). Os indivíduos acometidos por essa micose apresentam uma exacerbada resposta imune humoral (Fuchs & Pecher, 1992).

Avaliando a resposta imunológica de pacientes com a cromomicose observou-se que no curso da infecção ocorreu uma supressão da hipersensibilidade tardia quando os pacientes foram inoculados por via subcutânea, com antígenos de fungos ou submetidos a enxertos de pele, porém não apresentaram alterações na resposta aos antígenos de bactérias e micobactérias (Fuchs & Pecher, 1992).

Em alguns modelos, como na leishmaniose murina, foi proposto uma dicotomia funcional das células T CD4+, resultando em duas subpopulações: Th1 (resposta auxiliar do tipo 1) e Th2 (resposta auxiliar do tipo 2) (Heinzell *et al.*, 1989; Scott, 1989), de acordo com o padrão de citocinas secretadas, que influenciam a sua função efetora (Mosmann *et al.*, 1986). Esses padrões de citocinas são específicos e antagônicos onde as células Th1 secretam preferencialmente IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e linfotóxina, e as células Th2 secretam preferencialmente IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 (Cherwinski *et al.*, 1987; Fiorentino *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 1989; Scott & Kaufmann, 1991). As células Th1 induzem a ativação de macrófagos e uma resposta imune mediada por células, enquanto que as células Th2 induzem uma resposta imune mediada por anticorpos (Coffman *et al.*, 1988; Stout & Bottomly, 1989). Muitos fatores podem influenciar esta diferenciação, como as características do antígeno, sua concentração e via de administração, as células apresentadoras de antígenos e, principalmente, as citocinas presentes no microambiente. (Bretescher, 1991; Willians *et al.*, 1991; Gajewski & Fitch, 1991; Gajewski *et al.*, 1989).

A severidade das manifestações clínicas está diretamente relacionada com a ativação de uma resposta imune celular do tipo Th1 ou Th2. Os pacientes que apresentaram a forma severa da doença produziram altos níveis de IL-10, baixos níveis de IFN- $\gamma$  e proliferação de células T ineficiente (resposta Th2 predominante), e os pacientes que apresentaram a forma branda da doença produziram altos níveis de IFN- $\gamma$ , baixos níveis de IL-10 e alta proliferação de células T (resposta Th1 predominante). Quando a resposta imune humoral foi avaliada, pacientes com a forma branda da doença produziram mais anticorpos quando comparados com pacientes que apresentam a forma severa da doença (Gimenes *et al.*, 2005).

O restabelecimento da resposta imune celular não depende do tempo de tratamento dos pacientes mas da forma clínica da doença. Pacientes com a forma severa que estavam em tratamento a mais de um ano apresentaram IFN- $\gamma$  diminuído e IL-10 elevado enquanto que os pacientes que apresentaram a forma branda da doença com 6 meses de tratamento apresentavam níveis séricos de IFN- $\gamma$  elevado e IL-10 diminuído. O padrão de produção de TNF- $\alpha$  não foi alterado nem pela forma clínica e nem pelo tempo de tratamento (Gimenes *et al.*, 2006).

A severidade da doença está ligada a uma resposta celular Th1 ineficiente. A ausência de linfócitos T CD4+ é mais determinante para a severidade da doença do que a ausência de linfócitos T CD8+ pois a depleção de cada uma destas populações celulares em camundongos C57BL/6 demonstrou que a ausência de células T CD4+ induziu uma depressão da resposta imune celular e uma doença mais severa, enquanto a ausência de células T CD8+ não alterou a infecção (Teixeira de Souza *et al.*, 2006).

Em função da importância do estabelecimento de uma resposta imune celular eficiente e da capacidade que os componentes da parede celular dos fungos têm de interferirem no processo de ativação das células da resposta imune, o objetivo do presente trabalho foi analisar a influência das frações da parede celular do *Fonsecaea pedrosoi* na ativação dos fagócitos peritoneais obtidos de camundongos.

## 2. Objetivos

### **Objetivo:**

Analisar a influência das frações F1 e F2 obtidas a partir da parede celular do fungo *Fonsecaea pedrosoi* no processo de ativação de células peritoneais de camundongos *in vitro*.

Para atingir este objetivo foram desenvolvidas as seguintes estratégias de ação:

- 1- Identificar o perfil de migração das células para o peritônio dos camundongos após a inoculação das frações F1 e F2 da parede celular do fungo *Fonsecaea pedrosoi* e células do fungo inativado, em dois intervalos de tempo distintos e independentes.
- 2- Avaliar a produção de óxido nítrico pelas células aderentes após a estimulação com as frações F1 e F2 do fungo, e o fungo inativado.
- 3- Avaliar a produção de citocinas pelas células aderentes após a estimulação com as frações F1 e F2 do fungo, e o fungo inativado.
- 4- Avaliar a influência da fração F2 da parede celular do fungo sobre o índice de fagocitose, a produção de óxido nítrico e citocinas pelas células aderentes.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. *Fonsecaea pedrosoi***

O fungo *Fonsecaea pedrosoi* utilizado nos experimentos foi isolado pelo Laboratório de Micologia do Centro de Patologia Clínica a partir da lesão de um paciente atendido no Hospital Universitário de Brasília. O fungo foi identificado por exame micológico direto e cultura, sendo mantido em Ágar Sabouraud Dextrose (Oxoid, Alemanha) à 37°C.

##### **3.1.1. Cultivo do Fungo na forma filamentosa**

Para a utilização nos experimentos, o fungo foi cultivado, na forma filamentosa, em Ágar Sabouraud Dextrose (Oxoid, Alemanha) à 37°C por 14 dias. Após este período as células do fungo foram colhidas, lavadas e inativadas em autoclave, e uma solução de  $1 \times 10^6$  células do fungo por mL foi inoculada na cavidade peritoneal dos animais em um volume final de 1,5 mL. O fungo na sua forma filamentosa também foi utilizado para obtenção das frações da parede celular, como descrito a seguir.

##### **3.1.2. Obtenção das frações da parede celular do *F. pedrosoi***

###### **3.1.2.1. Extração da Fração F1**

Após o cultivo, as células do fungo foram inativadas com formaldeído a 5%, por um período de 24h e filtradas em papel de filtro, lavada por 3 vezes com água destilada e secas a temperatura ambiente. A seguir o material foi macerado com nitrogênio líquido, ressuspense em água destilada e centrifugado por 5 vezes a 1968 G para retirada de resíduos celulares. A etapa seguinte foi a extração lipídica, feita com uma solução de clorofórmio e metanol (proporção 2:1). A extração foi realizada sob agitação magnética, à temperatura ambiente por 4 horas. O material foi então centrifugado a 1968 G durante 15 minutos a temperatura ambiente, filtrado em papel de filtro e seco em estufa a 37°C por 48 h.

A parede celular bruta obtida da massa do fungo foi pesada e ressuspensa em NaOH 1N na concentração de 10 mg/mL à temperatura ambiente por 1h e centrifugada a 3075 G a temperatura ambiente por 20 minutos. O sobrenadante obtido contém as frações F2 e F3 e foi reservado para obtenção da fração F2. O precipitado foi submetido ao mesmo tratamento com

75 mL de NaOH 1N por 4 vezes, originando um resíduo álcali-insolúvel que foi lavado com água destilada até que o pH do precipitado fosse igual a 7,0. Após a neutralização, o resíduo foi lavado com uma solução de etanol, acetona e éter (na proporção v/v/v), e foi seco em estufa a 37°C (Alviano *et al*, 1991; Silva *et al*, 1985).

A partir da fração F1 obtida, foi preparada uma solução cuja concentração foi de 300µg/mL em tampão fosfato (PBS) e inoculado na cavidade peritoneal dos animais em um volume de 1,5 mL (Sá-Nunes *et al*, 2004).

### **3.1.2.2. Extração da fração F2 de *Fonsecaea pedrosoi***

Para isolamento e purificação desta fração, o sobrenadante reservado na extração da fração F1 foi acidificado com HCl 1M. O precipitado contendo o pigmento foi centrifugado a 3075 G por 10 minutos a 4°C, e lavado três vezes com água destilada. O pigmento insolúvel foi ressuspenso em HCl 0,1M e centrifugado a 12298 G, para retirada de resíduos celulares por várias vezes até que o sobrenadante formado ficasse incolor. O precipitado foi dialisado em água destilada, por 2 dias e com 5 trocas no total (Alviano *et al*, 1991).

Com 10mL da fração F2 obtida, foi preparada uma solução na diluição 1:10 em tampão fosfato (PBS) e inoculado na cavidade peritoneal dos animais em um volume final de 1,5 mL.

## **3.2. Animais**

Foram utilizados camundongos swiss, com 8 semanas, mantidos no alojamento de animais da FM/FS da Universidade de Brasília, com alimentação e água *ad libidum*. Para eutanásia, os animais foram inicialmente anestesiados com éter e em seguida sacrificados por deslocamento cervical.

Os procedimentos realizados estão de acordo com os procedimentos aceitos pelo Comitê Brasileiro de Ética Animal (COBEA) e foram analisados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) desta universidade (anexo I).

### 3.2.1. Grupos experimentais

Os animais foram divididos em oito grupos de 10, totalizando 80 animais.

Grupo 1 - 10 animais foram inoculados com 1,5mL de tioglicolato 3% para avaliação da atividade funcional das células que migraram para o peritônio após 4 h.

Grupo 2 - 10 animais foram inoculados com 1,5mL de fungo inativado para avaliação da atividade funcional das células que migraram para o peritônio após 4 horas.

Grupo 3 - 10 animais foram inoculados com 1,5mL da Fração F1 da parede do fungo para avaliação a atividade funcional das células que migraram para o peritônio após 4h.

Grupo 4 - 10 animais foram inoculados com 1,5mL da Fração F2 da parede do fungo para avaliação a atividade funcional das células que migraram para o peritônio após 4h.

Grupo 5 - 10 animais foram inoculados com 1,5mL de tioglicolato 3% para avaliação a atividade funcional das células que migraram para o peritônio após 72h.

Grupo 6 - 10 animais foram inoculados com 1,5mL do fungo inativado para avaliação a atividade funcional das células que migraram para o peritônio após 72 horas.

Grupo 7 - 10 animais foram inoculados com 1,5mL da Fração F1 da parede do fungo para avaliação a atividade funcional das células que migraram para o peritônio após 72h.

Grupo 8 - 10 animais foram inoculados com 1,5mL da Fração F2 da parede do fungo para avaliação a atividade funcional das células que migraram para o peritônio após 72h.

Os grupos acima descritos foram utilizados nos experimentos em duas etapas de forma independente, utilizando 5 animais em cada etapa.

O tioglicolato a 3% é capaz de estimular a migração celular e foi usado nos experimentos como controle (Tavares-Murta *et al*, 2001).

### 3.3. Migração de células para o peritônio dos camundongos

Após 4 ou 72 horas da inoculação das diferentes preparações ou do tioglicolato, a cavidade peritoneal dos camundongos foi lavada com tampão fosfato gelado para a obtenção das células. As células peritoneais foram centrifugadas a 277G durante 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi desprezado e uma alíquota de 10µL do precipitado foi retirada para confecção de extensão celular com plasma humano (1:1), para contagem diferencial dessas células. Após a retirada dessa alíquota, as células foram juntas e ressuspensas em 1mL de meio RPMI sem Soro Bovino Fetal (SBF – Gibco, Brasil) por camundongo. Em seguida as células foram contadas em câmara de Neubauer e as suspensões celulares diluídas para a concentração de  $3 \times 10^6$  células/mL, distribuídas em um volume de 100µL por orifício em placas de 96 orifícios e incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 30 minutos. Após esse período, as células não aderentes foram retiradas por lavagem com tampão fosfato a 37°C e em cada orifício foi adicionado 200µL de meio RPMI 1640 (Gibco™, USA) com soro bovino fetal (SBF) suplementado com interferon gama (IFN-γ) 100U/mL (Gibco BRL, 1100057, USA) e lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS) 1µg/mL (Sigma-Aldrich, USA). A placa foi incubada por 24 horas em estufa à temperatura de 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período o sobrenadante da cultura foi colhido, para dosagem de óxido nítrico e citocinas.

### 3.4. Dosagem de Óxido Nítrico

O Óxido Nítrico (NO) decompõe-se espontaneamente em nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) no meio de cultura e a produção de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> pelos macrófagos pode ser dosado por ensaio colorimétrico baseado na reação de Griess (Green *et al*, 1981). Para esta dosagem foi adicionado aos sobrenadantes o mesmo volume do reagente de Griess, que continha NEED 0,1% (N-(1-Naphthyl)ethyl-enedinamine – Sigma Chemical, lote 23H0262, USA) e sulfanilamida 1% (Vetec, lote 020698, Brasil) diluída em ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) a 5% (Vetec, lote 072353, Brasil). As amostras foram lidas em leitor de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay - Enzimaimunoensaio) com filtro de 450nm. Os resultados foram expressos em µmol/L de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> por  $3 \times 10^6$  células após 24h de incubação, comparando-se a D.O.(Densidade Ótica) do experimento com a D.O. da curva padrão de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> feita junto com o experimento e que variou de 3,125 a 200,0 µmol/L (Green *et al*, 1981).

### **3.5. Dosagem de citocinas**

As citocinas produzidas pelas células peritoneias obtidas foram dosadas pelo método de ELISA. Os sobrenadantes das culturas de células foram coletados e a presença de TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12 são descritas a seguir.

As concentrações das citocinas foram determinadas empregando-se curvas com diluições seriadas de padrões de TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12 e expressas em pg/mL. A curva de TNF- $\alpha$  variou de 15,6 pg/mL a 1000 pg/mL, a de IL-10 de 31,3 pg/mL a 2000 pg/mL e a de IL-12 variou de 62,5 pg/mL a 4000 pg/mL (BD Biosciences Pharmigen, USA).

#### **3.5.1. Dosagem de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )**

Os orifícios da placa de ELISA foram sensibilizados com 100 $\mu$ L de anticorpo de captura (anti-TNF- $\alpha$  de camundongo), diluído 1:250 em tampão de ligação (carbonato de sódio 0,1M pH 9,5) e incubada por 12 horas à 4°C. A seguir os orifícios foram aspirados e lavados 3 vezes com 300  $\mu$ L de tampão de lavagem (tampão fosfato com 0,05% tween 20). Depois da última lavagem, a placa foi seca em papel absorvente. A seguir os orifícios foram bloqueados com 200  $\mu$ L/orifício de diluente de ensaio (tampão fosfato com 10% de soro bovino fetal inativado – BSF, pH 7,0) e incubada a temperatura ambiente por 1 hora. Depois da incubação os orifícios foram novamente lavados como descrito anteriormente e 100  $\mu$ L de cada concentração da curva padrão e das amostras foram distribuídas nos orifícios apropriados, e a placa foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Um novo ciclo de 5 lavagens foi realizado utilizando tampão de lavagem e 100  $\mu$ L do anticorpo de detecção anti-TNF- $\alpha$  de camundongo biotinizado (diluído 1:25) foi adicionado em cada orifício, e a placa foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente. Um ciclo de 5 lavagens foram realizadas e 100 $\mu$ L do reagente enzimático diluído 1:250 (conjugado de peroxidase e estreptavidina de coelho) foi adicionado em cada orifício. A placa foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente, e em seguida lavada por 7 vezes com o tampão de lavagem. Para a revelação da reação foi adicionado 100  $\mu$ L da solução de substrato (tetrametilbenzidina) e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente e no escuro. A reação foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N e a leitura realizada em filtro de 450nm. Os resultados foram expressos em pg/mL de TNF- $\alpha$  comparando-se a densidade ótica (D.O.) com uma curva padrão feita com a dosagem, que variou de 15,6pg/mL a 1000pg/mL (BD Biosciences Pharmigen, USA).



### **3.5.2. Dosagem de interleucina 10 (IL-10)**

Os orifícios da placa de ELISA foram sensibilizadas com 100 µL de anticorpo de captura (anti-IL10 de camundongo), diluído 1:250 em tampão de ligação (fosfato de sódio 0,2M pH 6,5) e incubada por 12 horas à 4°C. A seguir os orifícios foram aspirados e lavados 3 vezes com 300 µL de tampão de lavagem (tampão fosfato com 0,05% tween 20). Depois da última lavagem, a placa foi seca em papel absorvente. A seguir os orifícios foram bloqueados com 200 µL/orifício de diluente de ensaio (tampão fosfato com 10% de soro bovino fetal inativado – BSF, pH 7,0) e incubada a temperatura ambiente por 1 hora. Depois da incubação os orifícios foram novamente lavados como descrito anteriormente e 100 µL de cada concentração da curva padrão e das amostras foram distribuídas nos orifícios apropriados, e a placa foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Um novo ciclo de 5 lavagens foi realizado utilizando tampão de lavagem e 100 µL do detector de trabalho foi adicionado em todos os orifícios. O detector de trabalho é uma mistura do anticorpo de detecção (anti-IL-10 de camundongo biotinizado) diluído 1:250 em diluente de ensaio (PBS com 10% de soro bovino fetal inativado-BSF e pH 7,0), com o reagente enzimático (conjugado de peroxidase e estreptavidina de coelho), também na concentração 1:250. A seguir a placa foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente, e posteriormente lavada 7 vezes com tampão de lavagem.

Para a revelação da reação foi adicionado 100 µL da solução de substrato (tetrametilbenzidina) e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente e no escuro. A reação foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N e a leitura realizada em filtro de 450nm. Os resultados foram expressos em pg/mL de IL-10 comparando-se a densidade ótica (D.O.) com uma curva padrão feita com a dosagem, que variou de 31,3 pg/mL a 2000 pg/mL (BD Biosciences Pharmigen, USA).

### **3.5.2. Dosagem de interleucina 12 (IL-12)**

Os orifícios da placa de ELISA foram sensibilizadas com 100 µL de anticorpo de captura (anti-IL12 de camundongo), diluído 1:250 em tampão de ligação (fosfato de sódio 0,2M pH 6,5) e incubada por 12 horas à 4°C. A seguir os orifícios foram aspirados e lavados 3 vezes com 300 µL de tampão de lavagem (tampão fosfato com 0,05% tween 20). Depois da última lavagem, a placa foi seca em papel absorvente. A seguir os orifícios foram bloqueados com 200 µL/orifício de diluente de ensaio (tampão fosfato com 10% de soro bovino fetal inativado – BSF, pH 7,0) e incubada a temperatura ambiente por 1 hora. Depois da incubação

os orifícios foram novamente lavados como descrito anteriormente e 100 µL de cada concentração da curva padrão e das amostras foram distribuídas nos orifícios apropriados, e a placa foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Um novo ciclo de 5 lavagens foi realizado utilizando tampão de lavagem e 100 µL do detector de trabalho foi adicionado em todos os orifícios. O detector de trabalho é uma mistura do anticorpo de detecção (anti-IL-12 de camundongo biotinizado) diluído 1:250 em diluente de ensaio (PBS com 10% de soro bovino fetal inativado-BSF e pH 7,0), com o reagente enzimático (conjugado de peroxidase e estreptavidina de coelho), também na concentração 1:250. A seguir a placa foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente, e posteriormente lavada 7 vezes com tampão de lavagem.

Para a revelação da reação foi adicionado 100 µL da solução de substrato (tetrametilbenzidina) e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente e no escuro. A reação foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N e a leitura realizada em filtro de 450nm. Os resultados foram expressos em pg/mL de IL-12 comparando-se a densidade ótica (D.O.) com uma curva padrão feita com a dosagem, que variou de 62,5 pg/mL a 4000 pg/mL (BD Biosciences Pharmigen, USA).

### **3.6. Imunocitoquímica**

Após a migração de células para o peritônio dos animais, 100µL do lavado peritoneal contendo 3 x 10<sup>6</sup> células, foi usado para preparação das lâminas que foram usadas na técnica de imunocitoquímica. As células foram centrifugadas em citocentrífuga a 800rpm por 10 minutos em aceleração moderada. Após a centrifugação a lâmina foi seca a temperatura ambiente e fixada com acetona a -20°C por 10 segundos, e a seguir congelada a -20°C.

Para realização da técnica de imunohistoquímica, as lâminas foram descongeladas e novamente fixadas com acetona, a seguir foram incubadas com peróxido de hidrogênio (Merck, Alemanha) a 3% em metanol (Vetec, Brasil), por 17 minutos, para bloqueio da peroxidase endógena. Em seguida as lâminas foram incubadas em tampão fosfato, pH 7,2 a temperatura ambiente por 30 minutos e depois lavadas com água destilada. No passo seguinte as lâminas foram incubadas em tampão fosfato contendo albumina bovina sérica (BSA) a 3% por 30 minutos, para que as ligações protéicas inespecíficas fossem bloqueadas.

Os anticorpos específicos para CD20 (DAKO, USA), CD4 (Pharmagem, USA) e CD8 (Pharmagem, USA), foram diluído (1/100) em soro albumina bovina (BSA) a 1% em tampão fosfato e colocados na lâmina por 2 horas a temperatura ambiente e em câmara úmida. A seguir, as lâminas foram lavadas por 3 vezes com água destilada e o anticorpo biotinizado

anti-IgG de camundongo foi adicionado e incubado nas mesmas condições por 30 minutos. Depois de transcorrido o tempo, novas lavagens foram feitas e a streptoavidina marcada com peroxidase foi colocada e incubada por 30 minutos, nas mesmas condições (kit DAKO LSAB+, Peroxidase-Universal-K0690). Em seguida as lâminas foram incubadas com DAB (diaminobenzidina) por 15 minutos. A reação foi interrompida com água destilada e as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Mayer, ao final as lâminas foram lavadas em água destilada e estão prontas para a leitura.

Os resultados foram expressos com a simbologia (+), onde a presença de uma (+) significa que 0-25% das células eram positivas para a reação, (++) significam 25-50% das células eram positivas para a reação, (+++) significam 50-75% das células eram positivas para a reação (++++) significam 75-100% das células eram positivas para a reação.

### **3.7. Índice de Fagocitose**

#### **3.7.1. Preparação das leveduras - *Saccharomyces cerevisiae***

As leveduras obtidas a partir do fermento biológico Fermix (30g), foram ressuspensas em 220mL de tampão fosfato em pH 7,2 e inativadas em autoclave a 121°C por 30 minutos, as células foram lavadas por centrifugação em tampão fosfato por 3 vezes, e o sedimento foi ressuspenso em 28mL de tampão fosfato contendo 0,1M de 2-mercaptoetanol e incubado por 2 horas a 37°C sob agitação. Em seguida as leveduras foram lavadas novamente por 3 vezes e o sedimento foi ressuspenso em 55mL de uma solução de iodocetamida 0,02M em tampão fosfato, e incubadas por mais 2 horas, sob agitação e a 37°C. A seguir as leveduras foram lavadas novamente por 3 vezes e o sedimento ressuspenso em 110mL de tampão veronal pH 7,2 contendo 200mg/L de azida sódica. A solução foi mantida em estoque a 4°C. Nos experimentos foi utilizada 100µL por orifício de uma solução de leveduras na concentração de  $3 \times 10^6$ .

#### **3.7.2. Obtenção das células do peritônio dos camundongos para realização da Fagocitose**

Distribuiu-se 500 µl da suspensão de células peritoneais obtidas após 4 ou 72 horas da inoculação de tioglicolato, como descrito no item 3.3, em uma concentração de  $9 \times 10^6$  células por orifício sobre as lamínulas previamente colocadas na placa de 24 orifícios. Para

promover a aderência dos fagócitos, incubou-se por 30 minutos em câmara úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) em ar. As células não aderidas foram retiradas por lavagem com tampão fosfato à 37°C. A seguir, cada orifício recebeu 300 µL de RPMI 1640 acrescido de soro bovino fetal contendo ou não 100µL da fração F2. As células foram incubada a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas, e após este período foram novamente incubadas com 300µL de RPMI contendo interferon gama (100U/mL) e LPS (1µg/mL) por 24 horas. Após essa incubação, 200 µL do sobrenadante foi colhido para dosagem de óxido nítrico e citocinas.

### 3.7.3. Índice de fagocitose

Aos fagócitos aderidos acima citados, foram colocadas 100µL de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) na concentração  $3 \times 10^6$  sensibilizadas com 10% de soro de camundongo e incubadas em câmara úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% CO<sub>2</sub> em ar por 40 minutos (Muniz-Junqueira *et al.*, 1997). Após este período, os sobrenadantes foram desprezados e foram feitas as lavagens dos orifícios com tampão fosfato a 37°C. Os macrófagos foram fixados com metanol e corados com solução de Giemsa a 8%. Foram analisadas 100 células de cada preparação com objetiva de imersão (100 x).

A capacidade fagocitária foi expressa pelo percentual de fagócitos envolvidos na fagocitose, pelo número médio de leveduras fagocitadas por fagócito e pelo índice fagocitário, produto destas duas determinações (Shaw & Griffin, 1981).

$$\text{IF} = \% \text{ Fagócitos envolvidos na fagocitose} \times \text{média de leveduras fagocitadas.}$$

### 3.8. Análise estatística

Os resultados foram obtidos pela média dos camundongos em cada um dos experimentos realizados  $\pm$  desvio-padrão. Para determinar as diferenças entre os grupos experimentais foi utilizada a análise da variância (ANOVA), seguida pelo método Dunnett (pós teste), realizados no programa estatístico GraphPad Prism, versão 3.0, GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA. Os dados serão considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## **4. Resultados**

### **4.1. ANÁLISE DO PERFIL DE ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS QUE MIGRAM PARA O PERITÔNIO APÓS INOCULAÇÃO COM AS FRAÇÕES DA PAREDE CELULAR DO FUNGO.**

Neste estudo investigamos a capacidade das frações obtidas da parede celular do fungo *Fonsecaea Pedrosoi* de estimularem a ativação de células peritoneais obtidas de camundongos. Desta forma determinamos o perfil de migração de células após a inoculação das frações F1 e F2, tioglicolato e fungo inativado, em dois intervalos de tempo distintos e independentes, um com 4 e outro com 72 horas, a produção de óxido nítrico, a liberação de citocinas produzidas por essas células e o índice de fagocitose.

#### **Migração de células para o peritônio dos camundongos após 4 horas da inoculação de diferentes frações da parede celular do *Fonsecaea pedrosoi***

As populações celulares que migraram para o peritônio com as diferentes frações de parede do fungo ou com o tioglicolato, após 4 horas da inoculação estão demonstradas na figura 1. Todos os estímulos utilizados induziram, de maneira geral, uma migração preferencial de neutrófilos, com uma baixa migração de macrófagos e linfócitos. A fração F1 e o tioglicolato induziram uma migração predominante de neutrófilos, com porcentagens superiores a 80% das células analisadas. A fração F2 e o fungo inativado induziram uma migração menor de neutrófilos (aproximadamente 60%) e maior de linfócitos (superiores a 20%) quando comparados com os níveis induzidos pelo tioglicolato. O único estímulo capaz de aumentar a migração de macrófagos (30%), quando comparado com os níveis observados para o tioglicolato foi a Fração F2.

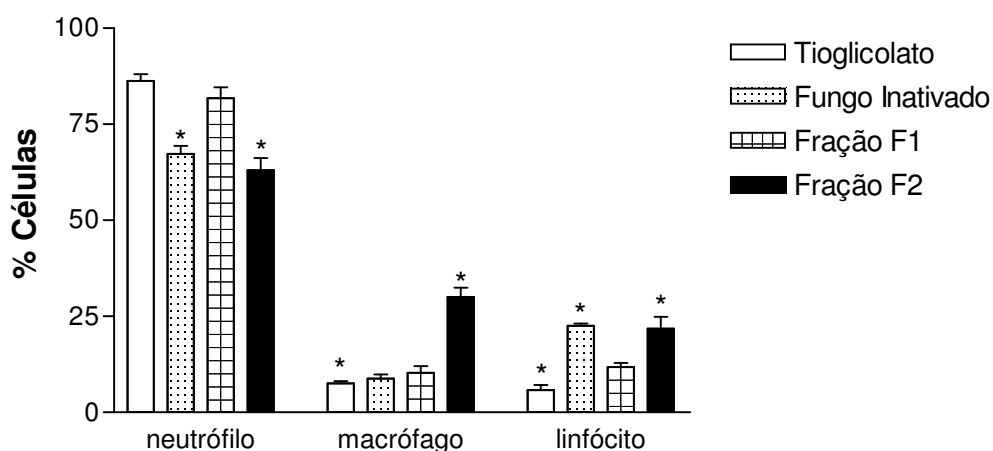


Figura 3 – Migração de células para o peritônio após 4h de inoculação com as frações F1 e F2 de parede celular de *Fonsecaea pedrosoi*, o fungo inativado e tioglicolato a 3%. Cada ponto (média  $\pm$  SEM) corresponde a 5 camundongos e é representativo de 2 experimentos independentes. \*  $P < 0,05$  comparado com tioglicolato.

### **Migração de células para o peritônio dos camundongos após 72 horas da inoculação com diferentes frações da parede celular do *Fonsecaea pedrosoi***

As populações celulares que migraram para o peritônio com as diferentes frações de parede do fungo ou com o tioglicolato, após 72 horas da inoculação estão demonstradas na figura 2. O grupo induzido com tioglicolato apresentou uma predominância de macrófagos (70%), com baixa porcentagem de neutrófilos (5%) e linfócitos (15%). O grupo estimulado com a Fração F1 também apresentou uma predominância de macrófagos (40%), porém em níveis menores que o apresentado pelo tioglicolato, e níveis aumentados de neutrófilos (30%) e linfócitos (30%) quando comparado com os níveis do tioglicolato. O fungo inativado e a Fração F2 apresentaram níveis baixos de macrófagos (15 e 30% respectivamente) e níveis aumentados de linfócitos (79% para o fungo inativado e 62% para a Fração F2) quando comparado com os níveis apresentados pelo tioglicolato (16%).

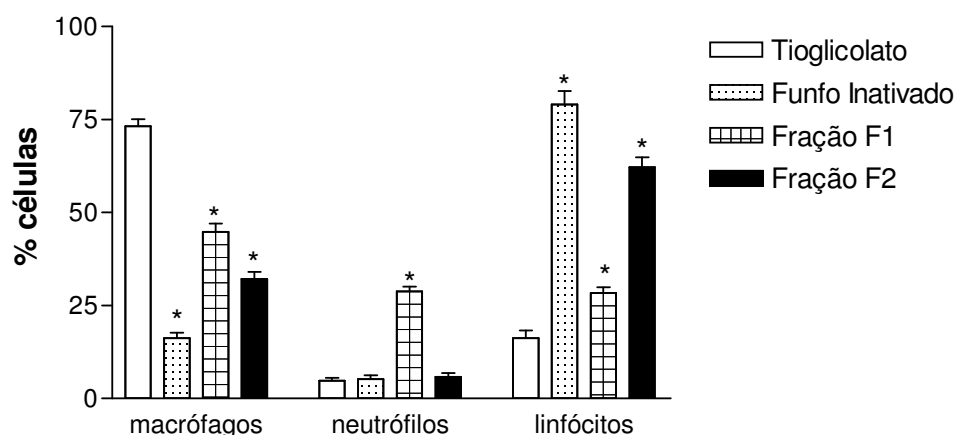


Figura 4 – Migração de células para o peritônio após 72h de inoculação com as frações F1 e F2 da parede celular de *Fonsecaea pedrosoi*, o fungo inativado e o tioglicolato a 3%. Cada ponto (média  $\pm$  SEM) corresponde a 5 camundongos e é representativo de 2 experimentos independentes. \*  $P < 0,05$  comparado com tioglicolato.

### Diferenciação por Imunocitoquímica da população de linfócito estimulada pela Fração F2 de *Fonsecaea pedrosoi*

A inoculação da Fração F2 e do fungo inativado após 72 horas principalmente estimularam a migração predominante de linfócitos além de neutrófilos e macrófagos. Com o objetivo de identificar a população de linfócitos as células foram marcadas com anticorpo monoclonal anti-CD20 para definir a população de linfócito B, anti-CD4 para definir a população de linfócito T CD4<sup>+</sup> e anti-CD8 para definir a população de linfócito T CD8<sup>+</sup> (Tabela I).

Os resultados de imunocitoquímica revelaram que as células que migraram após a inoculação da Fração F2 apresentaram uma maior migração de linfócitos B quando comparadas com as outras populações analisadas. Os linfócitos que migraram após a inoculação do fungo inativado apresentaram o mesmo perfil.

Tabela I- Imunocitoquímica de um experimento (n=1) das células peritoneais que migraram após 72 horas da inoculação a fração F2 de *Fonsecaea pedrosoi* e o fungo inativado

	Anti-CD20	Anti-CD4	Anti-CD8
Fração F2	++	+	+
Fungo Inativado	+++	+	++

## Produção de Óxido Nítrico (NO) em sobrenadante de cultura de células aderentes de camundongos após 4 horas de inoculação com diferentes frações da parede do *Fonsecaea pedrosoi*

O óxido nítrico (NO) decompõe-se espontaneamente em nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ). O NO pode ser produzido a partir da ativação dos fagócitos por  $\text{IFN-}\gamma$  e LPS a partir da indução da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) e é determinado através da presença de nitrito no sobrenadante de cultura de neutrófilos e macrófagos peritoneais .

Analisando a produção de  $\text{NO}_2^-$  pelas células que migraram para o peritônio após a inoculação com tioglicolato observamos que o estímulo aumentou de maneira significativa esta produção (figura 3). As células que migraram para o peritônio após a inoculação com a fração F2 apresentaram uma produção espontânea aumentada de NO (23  $\mu\text{mol/L}$ ) quando comparada com a produção das células dos demais grupos. Após a estimulação com  $\text{IFN-}\gamma$  e LPS não houve aumento da liberação do nitrito. As células que migraram para o peritônio após a inoculação da fração F1 (10,5  $\mu\text{mol/L}$ ) ou do fungo inativado (8,2  $\mu\text{mol/L}$ ) apresentaram níveis deste mediador menores que os observados pelo tioglicolato (20  $\mu\text{mol/L}$ ), e o estímulo não foi capaz de aumentar a sua produção.

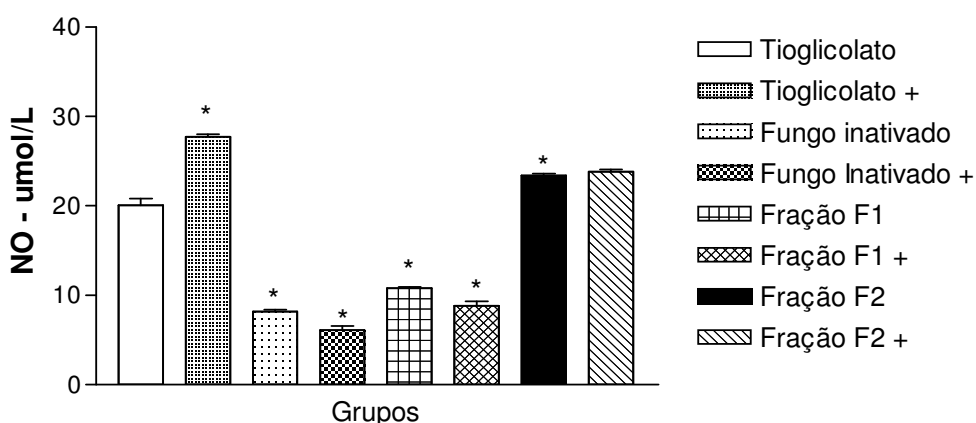


Figura 5 - As células aderentes que migraram para o peritônio após 4 horas da inoculação com tioglicolato, fungo inativado, Fração F1 e F2 da parede celular do fungo foram colocados em cultura e após 24 horas de incubação, na ausência ou presença de estímulos ( $\text{IFN}\gamma$  100U/mL e LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ ), os sobrenadantes foram colhidos e avaliados quanto a presença de  $\text{NO}_2^-$  através do método colorimétrico de Griess. O sinal gráfico (+) na legenda, representa a presença de estímulo. Cada ponto (média  $\pm$  SEM) corresponde a 5 camundongos e é representativo de 2 experimentos independentes. \*  $P < 0,05$  comparado com tioglicolato.



## Produção de Óxido Nítrico (NO) em sobrenadante de cultura de células aderentes de camundongos após 72 horas de inoculação com as diferentes frações da parede do *Fonsecaea pedrosoi*

Nas células que migraram para o peritônio após a inoculação do tioglicolato observamos que o estímulo aumentou de maneira significativa a produção de nitrito (figura 4). As células que migraram para o peritônio após a inoculação com a fração F2 (9,3 umol/L) apresentaram uma produção de NO similar aos níveis observados para o grupo inoculado com tioglicolato (8,5 umol/L) e após a estimulação observou-se um pequeno aumento nos níveis deste mediador. As células que migraram para o peritônio após a inoculação com o fungo inativado (10,9 umol/L) apresentaram níveis similares aos observados pelo grupo do tioglicolato porém o estímulo com IFN- $\gamma$  e LPS não foi capaz de aumentar esta produção. As células que migraram para o peritônio após inoculação da fração F1 (3,5 umol/L) apresentaram níveis deste mediador menores dos que os observados pelo tioglicolato e o estímulo não foi capaz de aumentar a sua produção.

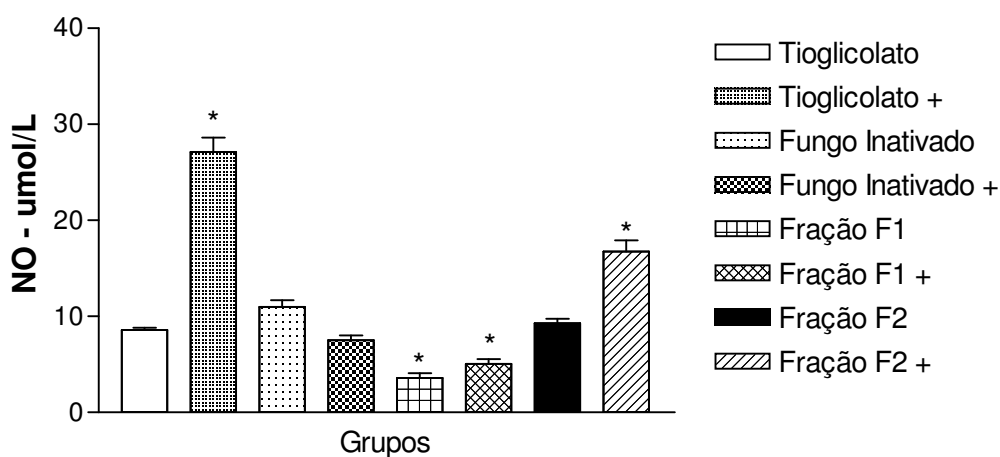


Figura 6 – As células aderentes que migraram para o peritônio após 72 horas da inoculação com tioglicolato, fungo inativado, Fração F1 e F2 da parede celular do fungo foram colocados em cultura e após 24 horas de incubação, na ausência ou presença de estímulos (IFN $\gamma$  100U/mL e LPS 1 $\mu$ g/mL), os sobrenadantes foram colhidos e avaliados quanto a presença de NO $_2^-$  através do método colorimétrico de Griess. O sinal gráfico (+) na legenda, representa a presença de estímulo. Cada ponto (média  $\pm$  SEM) corresponde a 5 camundongos e é representativo de 2 experimentos independentes. \* P < 0,05 comparado com tioglicolato.

### Produção de Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) em sobrenadante de cultura de células aderentes de camundongos após 4 horas de inoculação com diferentes frações da parede do *Fonsecaea pedrosoi*

As células aderentes que migraram para o peritônio após 4 horas da inoculação com os diferentes estímulos foram colocadas em cultura por 24 horas. Após este período, os sobrenadantes foram colhidos e avaliados quanto à produção de TNF- $\alpha$ .

Nossos resultados demonstraram que a produção espontânea desta citocina estava aumentada (2707 pg/mL) para o grupo inoculado com a fração F1 (figura 5). O grupo inoculado com o fungo inativado (1644 pg/mL) e a fração F2 (1743 pg/mL) não apresentaram produção elevada desta citocina. Para confirmar a capacidade de produção das células, as mesmas foram estimuladas com LPS e todos os grupos aumentaram a sua produção (dado não apresentado).

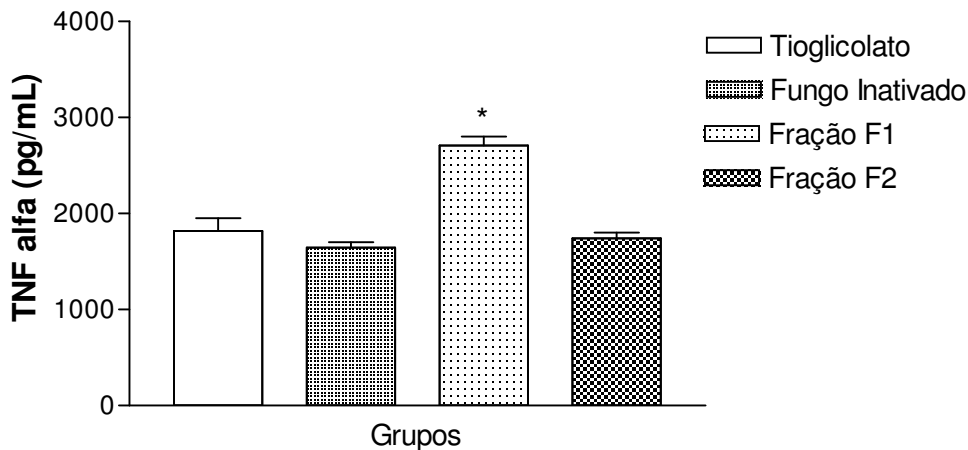


Figura 7 - As células aderentes que migraram para o peritônio após 4 horas da inoculação com tioglicolato, fungo morto, Fração F1 ou F2 da parede celular do fungo foram colocados em cultura e após 24 horas de incubação, os sobrenadantes foram colhidos e avaliados quanto a presença de TNF-  $\alpha$  através do método imunoenzimático. Cada ponto (média  $\pm$  SEM) corresponde a 5 camundongos e é representativo de 2 experimentos independentes. \* P< 0,05 comparado com tioglicolato.

## Produção de Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) em sobrenadante de cultura de células aderentes de camundongos após 72 horas de inoculação com diferentes frações da parede do *Fonsecaea pedrosoi*

As células aderentes que migraram para o peritônio após 72 horas da inoculação com os diferentes estímulos foram colocadas em cultura por 24 horas. Após este período, os sobrenadantes foram colhidos e avaliados quanto à produção de TNF- $\alpha$ .

Nossos resultados demonstraram que a produção espontânea desta citocina estava aumentada para os grupos inoculados com o fungo inativado (2816 pg/mL) e com a fração F2 (2050 pg/mL) (figura 6). O grupo inoculado com a fração F1 (1247 pg/mL) não apresentou aumento espontâneo desta citocina. Para confirmar a capacidade de produção das células, as mesmas foram estimuladas com LPS e todos os grupos aumentaram a sua produção (dado não apresentado).

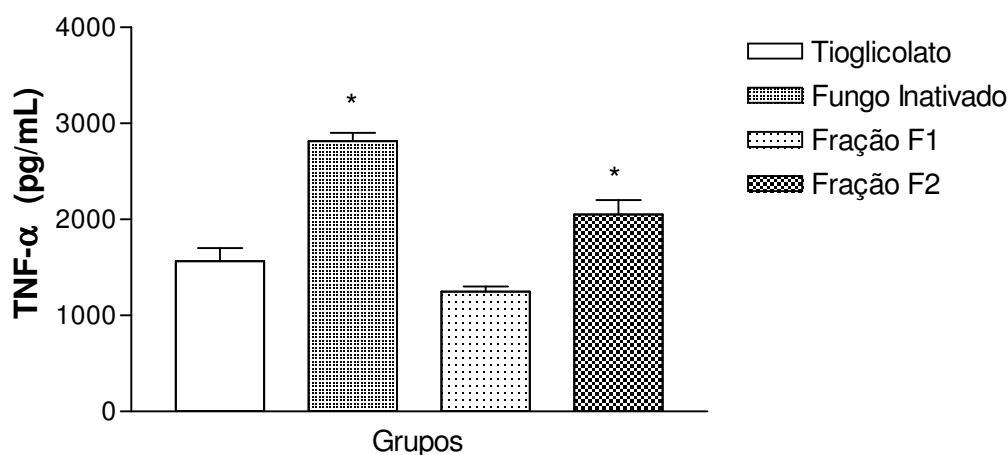


Figura 8 - As células aderentes que migraram para o peritônio após 72 horas da inoculação com tioglicolato, fungo morto, Fração F1 ou F2 da parede celular do fungo foram colocados em cultura e após 24 horas de incubação, na ausência ou presença de estímulos (IFN $\gamma$  100U/mL e LPS 1 $\mu$ g/mL), os sobrenadantes foram colhidos e avaliados quanto a presença de TNF- $\alpha$  através do método imunoenzimático. Cada ponto (média  $\pm$  SEM) corresponde a 5 camundongos e é representativo de 2 experimentos independentes. \* P < 0,05 comparado com tioglicolato.

## Produção de interleucina 12 (IL-12) em sobrenadante de cultura de células aderentes de camundongos após 72 horas de inoculação com diferentes frações da parede do *Fonsecaea pedrosoi*

As células aderentes que migraram para o peritônio após 72 horas de inoculação com os diferentes estímulos foram colocadas em cultura por 24 horas e estimulados ou não com IFN- $\gamma$  e LPS. Após este período, os sobrenadantes foram colhidos e avaliados quanto à produção de IL-12.

Nossos resultados demonstraram que não houve produção espontânea desta citocina para os grupos inoculados com tioglicolato (575 pg/mL), fungo inativado (254 pg/mL) e com a fração F2 (163 pg/mL) (figura 7). Observamos uma alta produção de IL-12 no grupo inoculado pela fração F1 (7471 pg/mL). Após o estímulo com LPS e IFN- $\gamma$  observamos um leve aumento da produção desta citocina para o grupo inoculado com o tioglicolato (1875 pg/mL). Os níveis produzidos pelo grupo inoculado com a fração F1 foram similares aos observados sem estimulação.

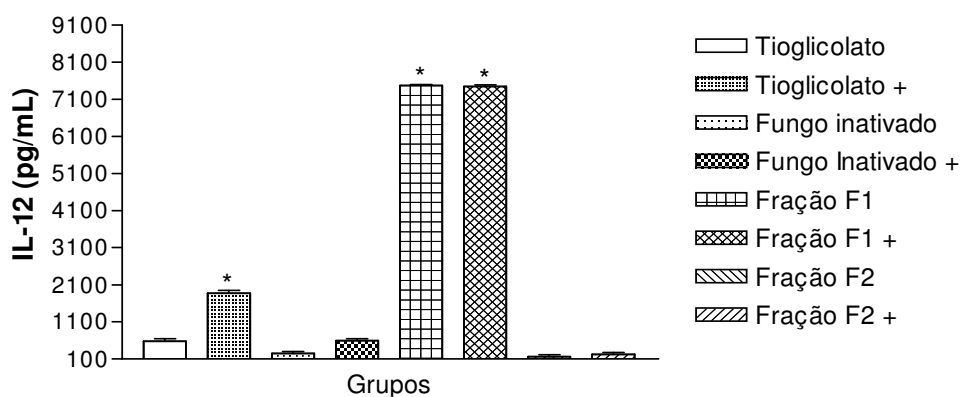


Figura 9 - As células aderentes que migraram para o peritônio após 72 horas da inoculação com tioglicolato, fungo inativado, Fração F1 ou F2 da parede celular do fungo foram colocados em cultura e após 24 horas de incubação, na ausência ou presença de estímulos (IFN $\gamma$  100U/mL e LPS 1 $\mu$ g/mL), os sobrenadantes foram colhidos e avaliados quanto a presença de IL-12, através do método imunoenzimático. Cada ponto (média  $\pm$  SEM) corresponde a 5 camundongos e é representativo de 2 experimentos independentes. \* P < 0,05 comparado com tioglicolato.

## Produção de interleucina 10 (IL-10) em sobrenadante de cultura de células aderentes de camundongos após 72 horas de inoculação com diferentes frações da parede do *Fonsecaea pedrosoi*

A produção de IL-10 foi avaliada no mesmo sobrenadante utilizado para a dosagem de IL-12.

Nossos resultados demonstraram que não houve produção espontânea desta citocina para os grupos inoculados com o tioglicolato (57 pg/mL), e com a fração F1 (58 pg/mL) (figura 8). Observamos uma discreta produção de IL-10 pelo grupo inoculado com a fração F2 (140 pg/mL) e uma produção significativa pelo grupo inoculado com o fungo inativado (617 pg/mL). Após o estímulo com LPS e IFN- $\gamma$  observamos aumento da produção desta citocina apenas para os grupos inoculados com o fungo inativado (821 pg/mL) e com a fração F2 (691 pg/mL).

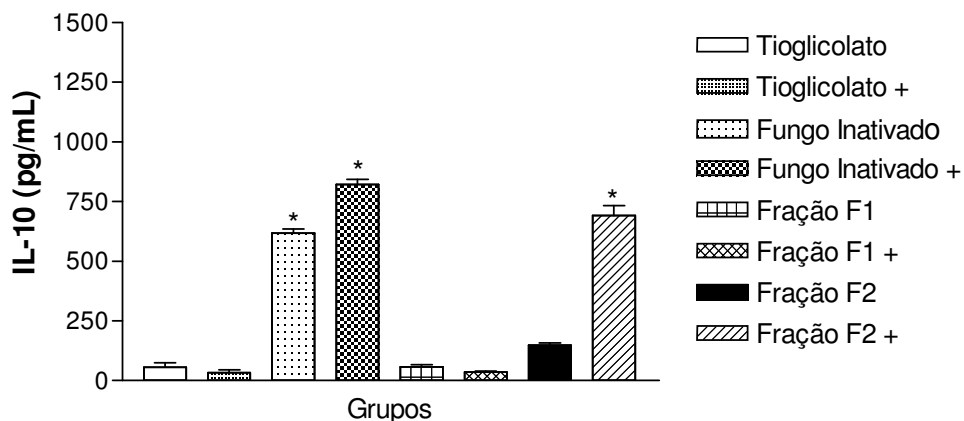


Figura 10 - As células aderentes que migraram para o peritônio após 72 horas da inoculação com tioglicolato, fungo inativado, Fração F1 ou F2 da parede celular do fungo foram colocados em cultura e após 24 horas de incubação, na ausência ou presença (IFN $\gamma$  100U/mL e LPS 1 $\mu$ g/mL) de estímulos, os sobrenadantes foram colhidos e avaliados quanto a presença de IL-10, através do método imunoenzimático. Cada ponto (média  $\pm$  SEM) corresponde a 5 camundongos e é representativo de 2 experimentos independentes. \* P < 0,05 comparado com tioglicolato.

## **4.2. ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA FRAÇÃO F2 NA ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS PERITONEAIS**

Observamos que as células aderentes que migraram para o peritônio após a inoculação com a fração F2 apresentaram uma maior produção de TNF- $\alpha$  e IL-10. A partir desses dados analisamos a influência *in vitro* desta fração sobre as células peritoneais aderentes após 4 e 72 horas de inoculação com o tioglicolato.

### **Avaliação da capacidade fagocítica**

As células peritoneais obtidas após 4h ou 72h da inoculação com o tioglicolato foram incubadas na presença ou na ausência da fração F2, por 24h, e a seguir as células foram estimuladas ou não com IFN $\gamma$  e LPS conforme descrito em material e métodos. Após 24 horas de incubação, parte do sobrenadante foi retirado, foram adicionadas as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* sensibilizadas com soro de camundongo (10%) e a seguir foram novamente incubadas por 30 minutos para verificar a capacidade fagocítica dessas células.

A capacidade fagocitária foi expressa pelo percentual de fagócitos envolvidos na fagocitose, pelo número médio de leveduras fagocitadas por fagócito e pelo índice fagocitário, produto destas duas determinações conforme demonstrado na tabela 1 e na figura 9 (Shaw & Griffin, 1981).

Quando os fagócitos de 4h foram incubados com as leveduras, 65% das células fagocitaram as leveduras, e nas células de 72h esse percentual foi de 57,5%. A incubação das células com a fração F2 fez este percentual reduzir para 32% nos fagócitos obtidos em 4 h e para 26% nos fagócitos obtidos em 72h. Quando as células estimuladas com a fração F2 foram estimuladas com LPS e IFN- $\gamma$  os fagócitos de 4h apresentaram 70% das células contendo leveduras e os fagócitos de 72h apresentaram 65% (tabela II).

Tabela II – Capacidade fagocitária das células peritoneais que migraram após 4 ou 72 horas da inoculação com tioglicolato.

<b>Grupo</b>	<b>4h</b>			<b>72h</b>		
	<i>Fagócitos envolvidos na fagocitose(%)</i>	<i>N ° leveduras fagocitadas por fagócito</i>	<i>Índice de fagocitose</i>	<i>Fagócitos envolvidos na fagocitose(%)</i>	<i>N ° leveduras fagocitadas por fagócitos</i>	<i>Índice de fagocitose</i>
Leveduras	65 (±2,05)	5 (±0,24 )	325 (±1,5)	57,5 (±1,25 )	4 (± 0,32)	230 (± 1,0)
Fração F2	32 (±1,63)	5 (± 0,37)	160 (± 1,0)	26 (±2,0 )	6 (± 0,17)	156 (± 2,0)
Fração F2 + IFN- $\gamma$ +LPS	70 (±2,05)	6 (±0,43 )	420 (± 1,0)	65 (±2,05)	6 (±0,41)	390 (± 1,0)

Considerando o índice de fagocitose (IF) para os fagócitos de 4h ou 72h, sem qualquer estímulo para as células, o IF foi de 325 e 230, respectivamente. Já quando a fração F2 foi acrescentada o índice de fagocitose ficou em 160 para fagócitos de 4h e 156 para fagócitos de 72h. Quando a fração F2 e o estímulo são colocados juntos o índice de fagocitose assume níveis superiores ao do controle, 420 para fagócitos 4h e 390 para os fagócitos de 72h.

Apesar da presença de LPS e INF- $\gamma$  e a fração F2 isolados determinarem IF diferentes do que determina a presença dos dois juntos, em todas as situações a média de leveduras ingeridas pelos fagócitos de 4h ou 72h variou entre 4-6%.

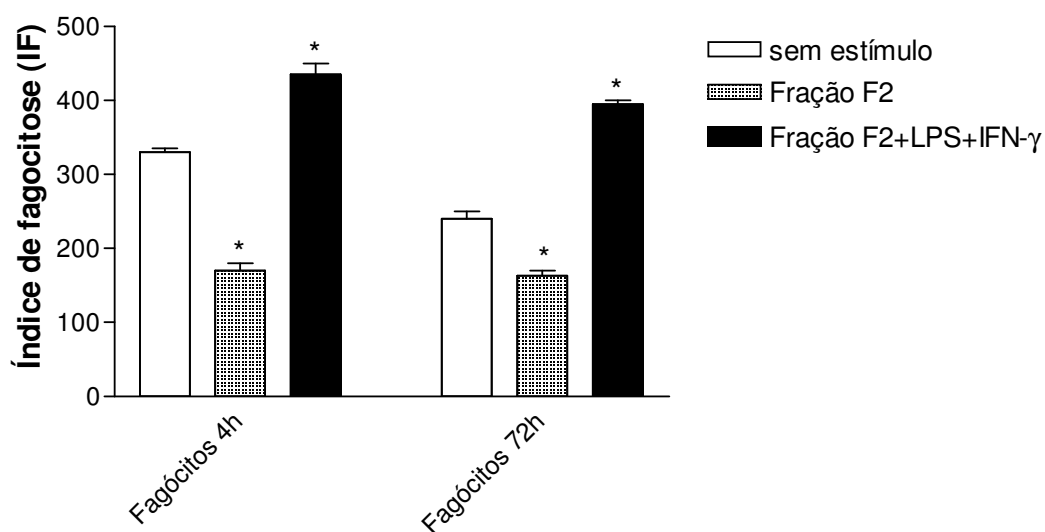


Gráfico 11 – As células peritoneias que migraram após 4 ou 72 horas da inoculação com o tioglicolato foram colocados em cultura e incubadas por 24 horas na presença ou ausência da fração F2, depois receberam ou não estímulos por mais 24 horas (IFN $\gamma$  100U/mL e LPS 1 $\mu$ g/mL) e em seguida leveduras, após a fagocitose das leveduras determinamos o Índice de fagocitose que está expresso pelo percentual de fagócitos envolvidos na fagocitose e a média de leveduras fagocitadas em cada célula.\* P < 0,05 comparado com tioglicolato.

### Produção de Óxido Nítrico (NO)

Após a inoculação com tioglicolato, as células peritoneiais obtidas depois de 4 ou 72 foram incubados na presença ou na ausência da fração F2 por 24h, e em seguida receberam ou não LPS e IFN- $\gamma$  e uma nova incubação de 24 horas. Depois dessas 48 horas de incubação antes que a adição das leveduras fosse realizada, o sobrenadante dessa cultura na presença e ausência da fração F2 e os que receberam ou não LPS e IFN- $\gamma$  foi colhido separadamente para permitir a dosagem de óxido nítrico e citocinas.

Nos fagócitos de 4h (20,8 pg/mL) que foram incubados com LPS e IFN- $\gamma$  a produção de nitritos foi maior do que a apresentada pelos fagócitos que não receberam estímulo (11 pg/mL) (figura 10). Os fagócitos que receberam estímulo apenas da fração F2 (15 pg/mL) também apresentaram produção de NO maior do que os fagócitos que não receberam estímulo (11 pg/mL), mas essa produção foi inferior a produzida pelo estímulo de LPS e IFN- $\gamma$  (20,8 pg/mL). Nos fagócitos que receberam estímulo tanto do LPS e IFN- $\gamma$  como da fração F2 (9,5



pg/mL), a produção de nitritos foi inferior a apresentada pelos que não receberam estímulo, pelos fagócitos que receberam estímulos de LPS e IFN- $\gamma$  e da fração F2 isoladamente.

Os fagócitos de 72 horas que obtiveram uma produção aumentada de nitrito foi o estimulado com LPS e IFN- $\gamma$  ( 27,9 pg/mL) (figura 10). Os fagócitos que não receberam estímulo, os que foram estimulado com LPS e IFN- $\gamma$  mais a fração F2 não tiveram produção significativa de nitritos.

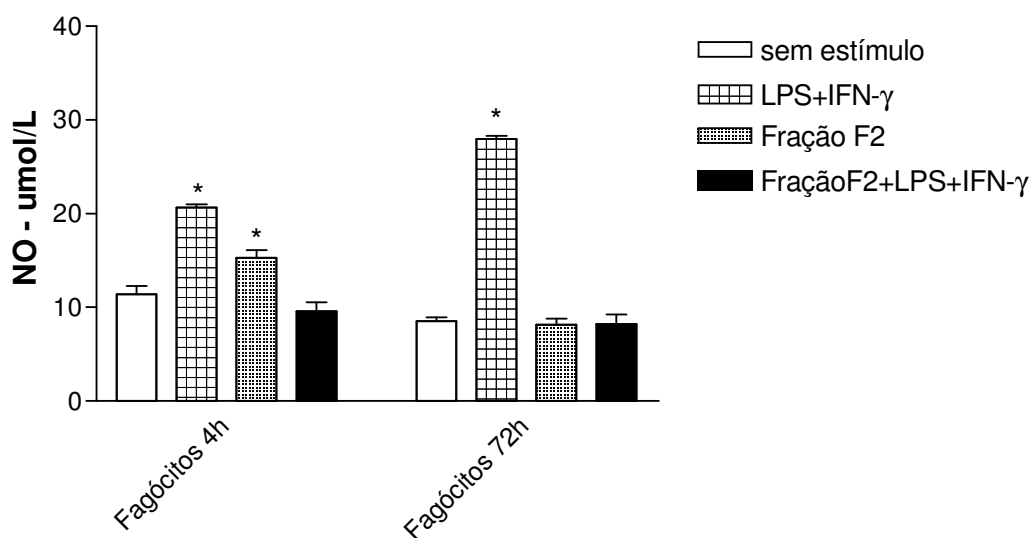


Figura 12 – As células aderentes que migraram para o peritônio após 4 ou 72 horas da inoculação com tioglicolato foram colocados em cultura com a fração F2 da parede celular do fungo por 24 horas e após mais 24 horas de incubação, na ausência ou presença (IFN $\gamma$  100U/mL e LPS 1 $\mu$ g/mL) de estímulos, os sobrenadantes foram colhidos e avaliados quanto a presença de NO $_2^-$  através do método colorimétrico de Griess. Cada ponto (média  $\pm$  SEM) corresponde a 5 camundongos e é representativo de 2 experimentos independentes. \* P < 0,05 comparado com grupo sem estímulo.

### **Produção de Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), Interleucina 12 (IL-12) e interleucina 10 (IL-10)**

Com o mesmo sobrenadante utilizado para a dosagem de óxido nítrico foram realizadas as dosagens das citocinas.

Quando os fagócitos de 4 ou 72 horas foram incubados na presença de LPS e IFN- $\gamma$  e da fração F2 os níveis de TNF- $\alpha$  produzidos foram superiores aos dos fagócitos que não receberam estímulo (figura 11).

Nos fagócitos de 4 horas a estimulação com a fração F2 (2767 pg/mL), fez a produção de TNF- $\alpha$  aumentar para níveis maiores que os produzidos pelos fagócitos que não recebem estímulo (1303 pg/mL).

Nos fagócitos de 72 horas, quando a estimulação com a fração F2 é realizada, essas células aumentam a produção dessa citocina para 2724 pg/mL, níveis maiores que os controles 1032 pg/mL.

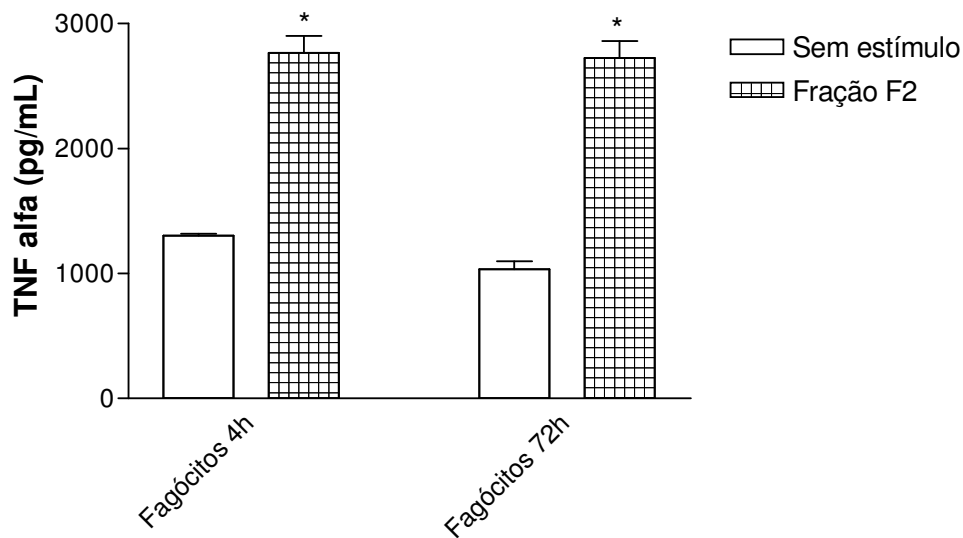


Figura 13 - As células aderentes que migraram para o peritônio após 4 ou 72 horas a inoculação com tioglicolato foram colocados em cultura com a fração F2 da parede celular do fungo por 24 horas e após mais 24 horas de incubação, os sobrenadantes foram colhidos e avaliados quanto a presença de TNF- $\alpha$ , através do método imunoenzimático. Cada ponto (média  $\pm$  SEM) corresponde a 5 camundongos e é representativo de 2 experimentos independentes. \* P< 0,05 comparado com tioglicolato.

O mesmo sobrenadante descrito anteriormente foi utilizado para as dosagens de IL-10 e IL-12.

Os fagócitos de 72h quando estimulados com INF- $\gamma$  e LPS (569 pg/mL) e com a Fração F2 isoladamente (613 pg/mL) apresentam o dobro da produção de IL-10 quando comparados aos fagócitos que não receberam estímulo (267 pg/mL) (Figura 12). Quando o estímulo INF- $\gamma$  e LPS mais fração F2 foram acrescentados, as células aumentaram a produção dessa citocina para três vezes mais do valor produzido pelos fagócitos que não receberam estímulo, cerca de 1044 pg/mL..

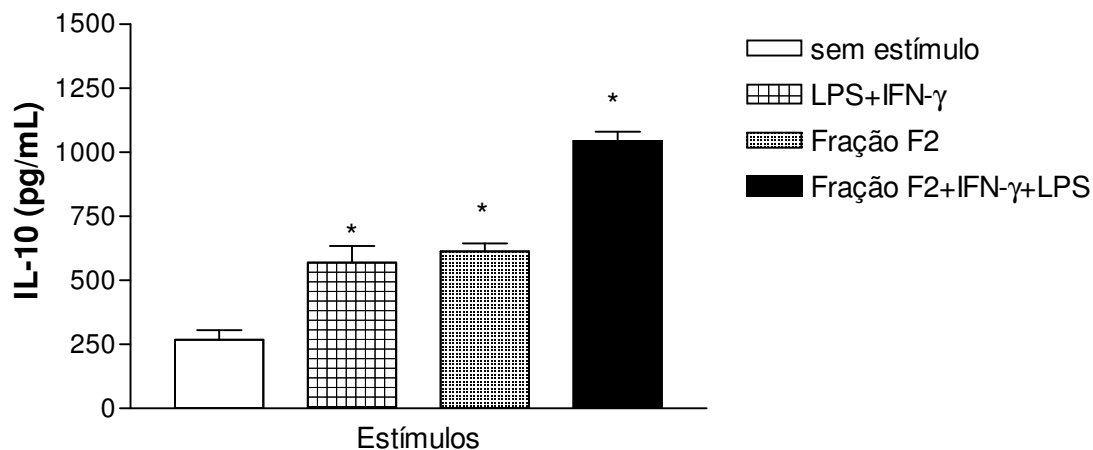


Figura 14 -As células aderentes que migraram para o peritônio após 72 horas da inoculação com tioglicolato foram colocados em cultura com a fração F2 da parede celular do fungo por 24 horas e após mais 24 horas de incubação, na ausência ou presença (IFN $\gamma$  100U/mL e LPS 1 $\mu$ g/mL) de estímulos, os sobrenadantes foram colhidos e avaliados quanto a presença de IL-10, através do método imunoenzimático. Cada ponto (média  $\pm$  SEM) corresponde a 5 camundongos e é representativo de 2 experimentos independentes. \* P< 0,05 comparado com tioglicolato.

Quando os fagócitos de 72 horas são estimuladas com LPS e INF- $\gamma$  a produção de IL-12 atingiu níveis máximos, cerca de 8685 pg/mL (figura 13), quando a fração F2 é o estímulo essas células diminuem a produção da citocina (1180 pg/mL), níveis pouco maiores que os apresentados pelos fagócitos que não receberam estímulo (783 pg/mL). Nos fagócitos que receberam estímulo LPS e INF- $\gamma$  mais a fração F2 a produção de IL-12 diminui para níveis ainda menores (212 pg/mL) que os apresentado pelos fagócitos que não receberam estímulo(783 pg/mL)..

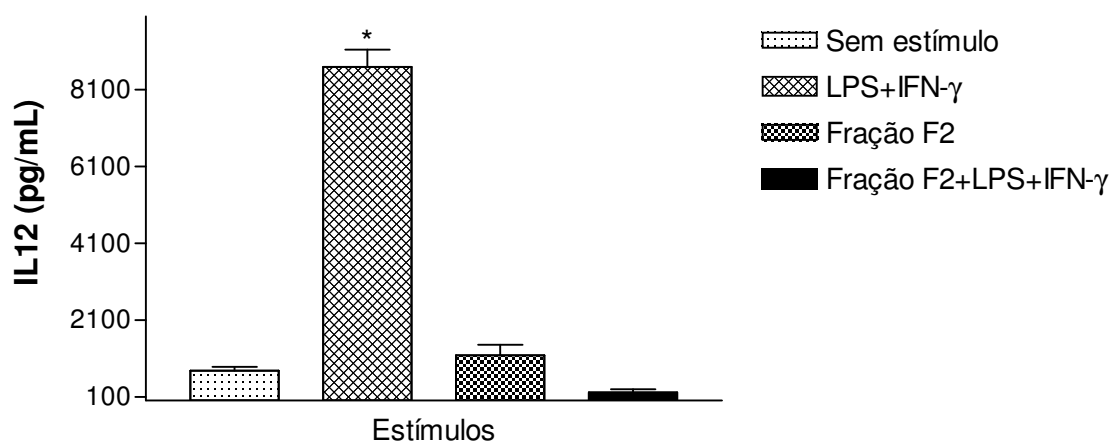


Figura 15 - As células aderentes que migraram para o peritônio após 72 horas da inoculação com tioglicolato foram colocados em cultura com a fração F2 da parede celular do fungo por 24 hora e após mais 24 horas de incubação, na ausência ou presença (IFN $\gamma$  100U/mL e LPS 1 $\mu$ g/mL) de estímulos, os sobrenadantes foram colhidos e avaliados quanto a presença de IL-12, através do método imunoenzimático. Cada ponto (média  $\pm$  SEM) corresponde a 5 camundongos e é representativo de 2 experimentos independentes. \* P < 0,05 comparado com tioglicolato.

## 5. Discussão

Os resultados apresentados nesse trabalho demonstram que as frações da parede celular do fungo *Fonsecaea pedrosoi* tem a capacidade de estimular a migração de diferentes células para o peritônio dos camundongos e de induzir a produção de citocinas por essas células após serem estimuladas.

Nossos resultados demonstram que diferentes populações de células migraram para o peritônio dos camundongos após a inoculação das frações F1 e F2, do fungo inativado e do tioglicolato nos dois tempos avaliados. De maneira geral, observou-se que com 4 horas após a inoculação das preparações houve a migração de neutrófilos, chamando atenção a Fração F2 que estimulou além dos neutrófilos a migração de linfócitos e macrófagos, e o fungo inativado que estimulou a migração de linfócitos. Com 72 horas houve predominância de macrófagos, tendo ainda a Fração F1 também estimulado a migração de neutrófilos e linfócitos, e a Fração F2 e fungo inativado a migração de linfócitos.

A Fração F1 que constitui a parede celular de vários fungos como o *Fonsecaea pedrosoi*, o *Histoplasma capsulatum* e a *Candida albicans*, é formada principalmente de  $\beta$ -1,6-glucana, que possui atividade imunomodulatória e é capaz de desempenhar atividade quimioatraente para neutrófilos (Sato *et al*, 2006) e macrófagos (Medeiros *et al*, 2004), confirmando os nossos resultados. Além de recrutar também leucócitos para o foco inflamatório através produção de mediadores como os leucotrienos, conforme demonstrado por Medeiros *et al*, 2004.

No experimento de 4 horas observou-se a migração intensa de neutrófilos, que possuem capacidade de interação com os componentes da parede celular do fungo. Esta migração comprova o papel importante que os neutrófilos desempenham na eliminação do fungo, cujo mecanismo de ação é a produção de  $O_2$  e a ativação da mieloperoxidase como descrito por Rozental *et al* (1996). A fração F1 induziu a migração tanto de macrófagos como dos neutrófilos provavelmente através da interação da  $\beta$ -glucana presente nesta fração com o receptor dectin-1. A capacidade dos macrófagos e também neutrófilos de se ligarem a  $\beta$ -1-3-glucana foi descrita por Brown (2006).

Neutrófilos e macrófagos são células fundamentais para a imunidade inata apresentando um papel de extrema importância no controle do crescimento de diversos fungos. Estas células são capazes de influenciar as formas clínicas das doenças e também a severidade de infecções causadas pelos fungos. O sistema imune inato, é capaz detectar a invasão de patógenos através do reconhecimento dos antígenos conhecidos como padrões

moleculares associados aos patógenos (PAMPs) desenvolvendo assim uma resposta imune mais apropriada. Os PAMPs são reconhecidos pelo hospedeiro através de moléculas chamadas de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Os PRRs são altamente expressos em macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. A maior fonte de PAMPs nos fungos é encontrada em sua parede celular e os PRRs das células do hospedeiro são alguns receptores como os *Toll-like* (TLR-2 e 4), colectinas (SP-A e D), as integrinas (CR3), as lecitinas tipo-C (receptor de manose) e mais recentemente descritas as lecitinas tipo-C não clássicas, cujo principal representante é o dectin-1. O reconhecimento desses polissacarídeos na superfície do fungo inicia uma resposta imediata como a fagocitose, a produção de componentes microbicidas e a indução de citocinas pró-inflamatórias que ativam e recrutam outras células imunes efetoras (Reppleye *et al.*, 2007).

Entre os receptores tipo-C não clássico, o Dectin-1 é o principal e foi originalmente descrito como um receptor específico de célula dendrítica. Esse receptor reconhece  $\beta$ -1-3-glucana, que está presente na Fração F1 de alguns fungos dimórficos, e por essa razão pode reconhecer algumas espécies de fungos que incluem, *Candida albicans* (Taylor *et al.*, 2007), *Pneumocystis carinii* (Saijo *et al.*, 2007), *Coccidioides posodaii* (Viriyakosol *et al.*, 2005), *Aspergillus fumigatus* (Gersuk *et al.*, 2006), *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum* (Rappleye & Goldman, 2006). Sua expressão em macrófagos é regulada positivamente por IL-4 e IL-13 e negativamente por LPS, IL-10 e dexametasona. A diminuição da expressão deste receptor pode estar relacionada com o mecanismo de escape desenvolvido por alguns fungos (Reppleye *et al.*, 2007).

Após 72 horas de inoculação, as células predominantes são os macrófagos, que também têm um papel importante na infecção pelo *Fonsecaea pedrosoi* e são capazes de fagocitar o fungo e destruí-lo após a sua ativação (Rozental *et al.*, 1994). Estas células podem desempenhar também a função de célula apresentadora de antígeno aos linfócitos T, estimulando a produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), e podem participar da formação da resposta inflamatória granulomatosa (Teixeira de Souza *et al.*, 2006).

A ligação da  $\beta$ -1-3-glucana com a dectin-1 é um evento importante na indução da resposta imune inata nas infecções induzidas por *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus fumigatus* (Brown, 2006). A  $\beta$ -1-3-glucana da parede celular de *Paracoccidioides brasiliensis* e do *Histoplasma capsulatum* promovem o recrutamento de células inflamatórias (Rappleye & Goldman, 2006). Como a fração F1 de *Fonsecaea pedrosoi* estimulou a migração de neutrófilos e também possui  $\beta$ -1-3-glucana é sugestivo que esse

mecanismo de reconhecimento de  $\beta$ -1-3-glucana pelos receptores dectin-1 presentes nos neutrófilos possa estar acontecendo.

A fração F1 também estimulou a migração de linfócitos, células que estão importantes na efetivação da resposta inflamatória granulomatosa. No paciente, o granuloma formado pelas lesões eritematosas apresenta um infiltrado celular misto e difuso, composto de macrófagos, neutrófilos, linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, células epidermóides, células multinucleadas gigantes isoladas e de muitos mastócitos. E o granuloma formado a partir das lesões verrucosas apresenta-se do tipo tuberculóide e formado por células epitelióides com arranjo compacto, células de Langerhans e linfócitos (D'Ávila, 2002). Independentemente do tipo do granuloma desenvolvido, a presença de linfócito nesta lesão é importante para a sua manutenção. A fração F1 tanto do *Fonsecaea pedrosoi* (Silva *et al.*, 1985) como do *Paracoccidioides brasiliensis* (Silva & Fazioli, 1985) foi capaz de induzir uma reação inflamatória granulomatosa em pulmão de camundongos, o que confirma a migração de linfócito induzida pela fração F1 observada nos nossos experimentos.

A fração F2, em todos os tempos analisados, estimulou a migração de macrófagos e também de linfócitos. A fração F2 é constituída, principalmente, de melanina e  $\alpha$ -1-3-glucana.

A  $\alpha$ -1-3-glucana é um polissacarídeo de parede celular que está presente em todos os fungos patogênicos e está relacionado com a virulência de alguns como descrito para o *Paracoccidioides brasiliensis* e o *Histoplasma capsulatum* (Kurokawa *et al.*, 1998; Rappleye & Goldman, 2006). A diminuição desse polissacarídeo na parede celular do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* resultou em uma diminuição da sua virulência (San-Blas *et al.*, 1987).

Em estudos recentes, Rappleye *et al.* (2007) afirmam que a  $\alpha$ -1-3-glucana da parede celular de *Histoplasma capsulatum* é capaz de bloquear o reconhecimento da  $\beta$ -1-3-glucana pelo receptor dectin-1. A parede da forma leveduriforme do *Histoplasma capsulatum* contém três polissacarídeos: quitina,  $\beta$ -(1-3)-(1-6)-glucana e  $\alpha$ -1-3-glucana, e a  $\alpha$ -1-3-glucana está presente na parte mais externa da parede celular do fungo. Esta organização da  $\alpha$ -1-3-glucana na parte mais externa sugere que ela pode dificultar a exposição da  $\beta$ -1-3-glucana e conseqüentemente o reconhecimento do fungo pelas células do sistema imunológico, Essa falta de reconhecimento de  $\beta$ -1-3-glucana diminui a produção de TNF- $\alpha$  pelos fagócitos e o desenvolvimento de mecanismos microbicidas envolvidos após a interação deste carboidrato com a dectin-1 (Rappleye *et al.*, 2007). Como a  $\alpha$ -1-3-glucana está na parede celular de vários fungos patogênicos primários, como o *P. brasiliensis* e o *H. capsulatum* e não está presente na

parede celular dos fungos oportunistas como a *C. albicans*, ela pode ser considerada um mecanismo de virulência de fungos (Rappleye *et al*, 2007).

Outro componente presente na fração F2 é a melanina. A melanina é um pigmento polimérico escuro que pode influenciar no armazenamento de água e íons, proteger da irradiação solar e luz ultravioleta, aumentar a resistência do fungo à lise por fagócitos e evitar a destruição por radicais livres (Alviano *et al*, 1991; Franzen *et al*, 1999). Sua presença está relacionada com a patogenicidade do microorganismo, embora o mecanismo não esteja totalmente compreendido.

A capacidade da melanina de aumentar a resistência à lise dos fungos pelos fagócitos do hospedeiro é o principal foco dos estudos sobre esse pigmento, essa função já foi relatada para alguns fungos que produzem melanina em situações de estresse como o *Cryptococcus neoformans* (Wang *et al*, 1995), *Wangiella dermatitidis* (Wang *et al*, 1995), *Lacazia loboi* (Silva *et al*, 2005), *Histoplasma capsulatum* (Silva *et al*, 2005), *Sporothrix schenckii* (Silva *et al*, 2005), *Aspergillus fumigatus* (Silva *et al*, 2005), *Paracoccidioides brasiliensis* (Silva *et al*, 2005) e *Fonsecaea pedrosoi* (Alviano *et al*, 1991).

A melanina presente tanto nas leveduras como nos conídios do *H. capsulatum* pode proteger o fungo da fagocitose por células imunes efectoras, protegendo o fungo contra o óxido nítrico produzido e os outros mecanismos fungicidas desenvolvidos pelos macrófagos (Nosanchuk *et al.*, 2002). A fagocitose das leveduras do *Paracoccidioides brasiliensis* pelos macrófagos é reduzida e a presença da melanina está associada a esta resistência (Taborda *et al*, 2005). A melanina também aumenta a resistência dos fungos aos antifúngicos convencionais, o que contribui para a persistência da infecção em humanos (Limongi *et al*, 1997; Franzen *et al*, 1999). Leveduras mutantes do *C. neoformans* para a produção de melanina mostraram uma redução de sua virulência em modelo animal (Wang *et al*, 1994).

Outros componentes presentes na composição da melanina são capazes de permitir a aderência e ligação do fungo à membrana plasmática de macrófagos permitindo sua entrada através dos receptores de manose (Alviano *et al*, 1991; Alviano *et al*, 2003; Mendes-Giannini *et al*, 2005). Limongi *et al* (2001) isolaram uma adesina de 50kDa de *Fonsecaea pedrosoi* e a caracterizaram como uma lecitina ligadora de manose e N-acetil-D-glucosamina, responsável pela entrada do fungo em fagócitos.

O receptor para manose (MR) também está envolvido na imunidade inata. O MR é um receptor de lectina tipo-C, expresso na superfície de muitos patógenos (Kanazawa, 2007), sendo capaz de reconhecer uma grande variedade de antígenos desde os presentes na superfície de patógenos até estruturas próprias do hospedeiro (Geijtenbeek *et al.*, 2004). A interação dos



fungos com este receptor auxilia na indução da imunidade inata como após a interação entre macrófagos alveolares e o *Pneumocystis carinii* onde ocorre a liberação de IL-8 importante na transcrição de fator NF-KappaB, ERK ½ e JNK MAPKs, (Tachado *et al.*, 2007). A importância deste receptor também é descrita para a *Candida albicans* (Netea *et al.*, 2006) e para o *P. brasiliensis* (Jiménez *et al.* 2006).

Considerando os dados da literatura, podemos sugerir que a incompetência dos macrófagos em destruir o *Fonsecaea pedrosoi* pode estar relacionada com a ação da  $\alpha$ -1-3-glucana e da melanina presente na fração F2.

A eliminação do *F. pedrosoi* está relacionada com a produção de mecanismos microbicidas eficientes. Um dos mecanismos microbicidas descritos é a produção de óxido nítrico (NO). Após analisar a produção do NO pelas células que migraram ao peritônio nos dois tempos avaliados observados que após 4 horas, as células que migraram pelo estímulo com a fração F2 foram capazes de produzir este mediador. A produção de NO pelas células que migraram pelos estímulos da fração F1 ou fungo inativado produziram níveis menores que os observados pelo grupo controle. A estimulação das células com LPS e IFN- $\gamma$  não apresentou aumento na produção de NO. Após 72 horas observamos uma diminuição da produção deste mediador para todos os grupos quando comparado com o grupo controle.

O óxido nítrico (NO) é liberado após a oxidação da guanidina terminal da L-arginina durante a produção da citrulina (Marletta *et al.*, 1988). Esta reação é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), cuja expressão nos macrófagos é induzida após estímulos do microambiente (Lorshbach *et al.*, 1993). O NO reage covalentemente com o ferro intracelular. Grupos prostéticos de ferro-sulfur de enzimas susceptíveis (ex: aconitase e complexos I e II) podem ser degradados pelo NO e liberados como complexo nitrosil-ferro-sulfur (Granger & Lehninger, 1982; Drapier & Hibbs, 1988). O NO é responsável pela inibição da síntese de DNA e da respiração mitocondrial em várias células, sendo também capaz de inibir o transporte ativo na membrana dos fungos, bactérias e bacteriófagos (Drapier & Hibbs, 1988; Rosen & Klebanoff, 1985).

A atividade microbicida do NO tem sido demonstrada em diversos trabalhos onde este mediador participa do controle de infecções causadas pela *Leishmania major* (Buchmuller-Rouiller & Mariel, 1987; Green *et al.*, 1990; Assreuy *et al.*, 1994), *Escherichia coli* (Stuehr & Marletta, 1985), *Schistosoma mansoni* (James & Glavesn, 1989), *Toxoplasma gondii* (Adams *et al.*, 1990), *Entamoeba histolytica* (Lin & Chadee, 1992), *Cryptococcus neoformans* (Granger *et al.*, 1988), *Candida albicans* (Vazquez-Torres *et al.*, 1995) e *Paracoccidioides brasiliensis* (Bocca *et al.*, 1998, González *et al.*, 2000). Contudo, em algumas infecções, a

atividade microbicida do macrófago parece não depender da produção desse mediador, como foi demonstrado para o *Aspergillus fumigatus* (Michaliszyn *et al.*, 1995).

Analisando a produção de NO para os diferentes agentes etiológicos da cromomicose, como a *C. carrionii*, *F. pedrosoi*, *P. verrucosa* e *R. aquaspersa* observou-se que o *F. pedrosoi* é o fungo que induz a produção de menores níveis de NO pelos macrófagos *in vitro* apesar de ser a espécie mais fagocitada pelos macrófagos (Hayakawa *et al.*, 2005). Estes dados foram confirmados em modelo experimental onde os animais apresentaram, no curso da infecção, baixa produção de NO pelos macrófagos peritoneais (Bocca *et al.*, 2006).

A produção de NO pode ser aumentada pela estimulação dos macrófagos por várias citocinas como o IFN- $\gamma$  que é capaz de sinergizar com outras que são produzidas preferencialmente por Th1, como o TNF- $\beta$  (Goodrum *et al.*, 1995), a IL-2 (Cox *et al.*, 1992) ou por produtos de microrganismos como o LPS, as exotoxinas e os antígenos de *Staphylococcus aureus* (Cunha *et al.*, 1993). Algumas citocinas podem também suprimir a síntese de NO como a IL-4 e a IL-10, produzidas preferencialmente pela subpopulação Th2 e capazes de inibir a indução de NO em células estimuladas com IFN- $\gamma$  e LPS (Liew *et al.*, 1991, Cunha *et al.*, 1992).

A inoculação da fração F2 ou do fungo inativado nos tempos analisados induziu uma migração crescente de linfócitos. Após 72 horas da estimulação observamos um aumento significativo de linfócitos B (CD20+) e baixa expressão de linfócitos TCD4+ e TCD8+. A integridade da resposta imune celular está diretamente relacionada com a severidade da cromomicose. A depleção de linfócitos TCD4+ contribuiu para a severidade da infecção induzida pelo *F. pedrosoi* em modelo experimental. No entanto a depleção de TCD8+ não alterou o curso da infecção (Teixeira de Souza *et al.* 2006). Os pacientes com cromomicose apresentam níveis aumentados de anticorpos, como a IgG1, IgM e IgA (Esterre *et al.* 2000).

Os anticorpos produzidos pelos pacientes com cromomicose que reagiram com a melanina presente na parede celular do fungo aumentaram a fagocitose pelos macrófagos e neutrófilos das leveduras do *Fonsecaea pedrosoi* (Alviano *et al.*, 2004).

Durante a indução de uma resposta imune celular ou humoral os macrófagos e linfócitos B respectivamente, desempenham um importante papel como células apresentadoras de antígeno. Na presença de IL-10 a expressão de MHC de classe II diminuir nas superfícies dos macrófagos, mas aumenta na superfície dos linfócitos B. Os linfócitos B podem fazer a apresentação antigênica aos linfócitos T de alguns peptídios, mas são incapazes de processar e apresentar peptídios de proteínas glicolisadas com manose, como a MP65 de *Candida albicans* (Nisini *et al.*, 2001).

Assim como a presença de linfócitos TCD4+ é importante para a evolução da doença, foi demonstrado que as citocinas do padrão Th1 também estão correlacionadas com uma melhor progressão da doença, quando comparado com as citocinas do padrão Th2 (Altamura *et al.*, 2001). Analisando o padrão de citocinas produzidas nos tempos avaliados após a estimulação com os componentes de parede observamos que as células que migraram após 4 horas com o estímulo da fração F1 apresentaram uma alta produção de TNF- $\alpha$ . A fração F1 é composta por quitina e  $\beta$ -1-3-glucana e foi demonstrado que a  $\beta$ -glucana apresentava uma atividade inflamatória maior que a  $\alpha$ -glucana, tanto pela indução da migração de células para o foco inflamatório (Carareto-Alves *et al.*, 1987) quanto pela liberação de TNF- $\alpha$  que estimularia a migração e diferenciação dos monócitos (Silva *et al.*, 1994). Esta capacidade da  $\beta$ -1-3-glucana de produzir TNF- $\alpha$  foi descrito para o *Paracoccidioides brasiliensis* e o *Histoplasma capsulatum* (Rappleye & Goldman, 2006). Após 72 horas da inoculação o fungo inativado e a fração F2 foram capazes de aumentar a produção desta citocina provavelmente em decorrência da presença de outros componentes presentes como a manose, capaz de estimular os macrófagos através do MR.

Analisando a produção de IL-12 e IL-10 pelas células que migraram para o peritônio após 72 horas de inoculação dos estímulos observamos que a fração F1 induziu uma alta produção de IL-12 e o fungo inativado e a fração F2 induziram a produção de IL-10. A fração F1 induziu a migração de macrófagos, neutrófilos e linfócitos, células que são produtoras de IL-12 e a Fração F2 e o fungo inativado estimularam a migração de linfócitos, identificados como sendo linfócito B, um importante produtor de IL-10.

As citocinas são consideradas reguladoras chaves no desenvolvimento de uma resposta imune Th1 ou Th2. No início da infecção por fungo, a neutralização das células Th1 (IFN- $\gamma$ ) determina um tipo de resposta Th2 maior que Th1, enquanto que a neutralização de citocinas Th2 (IL-10) permite o desenvolvimento de resposta Th1 (Altamura *et al.*, 2001) As células Th1 induzem a ativação de macrófagos e uma resposta imune mediada por células, enquanto que as células Th2 induzem uma resposta imune mediada por anticorpos (Coffman *et al.*, 1988; Stout & Bottoly, 1989). Muitos fatores podem influenciar esta diferenciação, como as características do antígeno, sua concentração e via de administração, as células apresentadoras de antígenos e, principalmente, as citocinas presentes no microambiente. (Bretescher, 1991; Willians *et al.*, 1991; Gajewski & Fitch, 1991; Gajewski *et al.*, 1989).

A produção distinta destas duas citocinas está relacionada com a capacidade dos diferentes componentes do fungo de induzir uma resposta imune do tipo Th1 ou Th2. A

produção destas citocinas também está relacionada com a severidade das manifestações clínicas na cromomicose. Os pacientes que apresentaram a forma severa da doença produziram altos níveis de IL-10, baixos níveis de IFN- $\gamma$  e proliferação de células T ineficiente, e os pacientes que apresentaram a forma branda da doença produziram altos níveis de IFN- $\gamma$ , baixos níveis de IL-10 e alta proliferação de células T. Quando a resposta imune humoral foi avaliada, pacientes com a forma branda da doença produziram mais anticorpos quando comparados com pacientes que apresentam a forma severa da doença. O restabelecimento da resposta imune celular não depende do tempo de tratamento dos pacientes, mas da forma clínica da doença. Pacientes com a forma severa que estavam em tratamento a mais de um ano apresentaram IFN- $\gamma$  diminuído e IL-10 elevado enquanto que os pacientes que apresentaram a forma branda da doença com 6 meses de tratamento apresentavam níveis séricos de IFN- $\gamma$  elevado e IL-10 diminuído. O padrão de produção de TNF- $\alpha$  não foi alterado nem pela forma clínica e nem pelo tempo de tratamento (Gimenes *et al.*, 2006). Nas infecções causada por fungos a resposta Th1 é essencial para o controle bem sucedido da infecção enquanto a resposta Th2 está correlacionada com a exacerbação da doença e a patologia (Altamura *et al.*, 2001).

A internalização de conídios do *Fonsecaea pedrosoi* por macrófagos de camundongos leva a liberação de grânulos de melanina no citosol destas células (Farbiarz *et al.*, 1990). Esta melanina, assim como a melanina associada aos componentes de parede secretada pelo fungo e são capazes de interferir na resposta imune do hospedeiro. Os neutrófilos que entraram em contato com a melanina aumentaram o metabolismo oxidativo do oxigênio e a ingestão de corpos escleróticos e de leveduras de *C. albicans* demonstrando a capacidade de ativação dos neutrófilos (Alviano *et al.*, 2004).

Nossos resultados demonstraram que o contato prévio dos fagócitos que migraram após 4 horas de inoculação com tioglicolato apresentaram uma redução no índice de fagocitose, porém após a estimulação com IFN- $\gamma$  e LPS apresentou níveis maiores que os do controle. Observamos o mesmo comportamento para as células que migraram após 72 horas da inoculação com o tioglicolato.

Os dados da literatura demonstram que a presença de melanina é capaz de reduzir a fagocitose por macrófagos em cultura (Rappleye & Goldman, 2006), alterar a fagocitose ou proteger o fungo contra óxido nítrico e outros mecanismos fungicidas dos macrófagos (Nosanchuk *et al.*, 2002).

No controle, o reconhecimento da  $\beta$ -1-3-glucana presente na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Brown, 2006) pelo dectin-1 presente nos fagócitos pode ter estimulado a

fagocitose dessas leveduras, porém a presença da fração F2 que contém  $\alpha$ -1-3-glucana está competindo com a  $\beta$ -1-3-glucana diminuindo assim o índice de fagocitose observado. O estímulo com LPS e IFN- $\gamma$  promove a fagocitose das leveduras através de outras vias de interação com o fagócito, como o TLR, que recruta moléculas envolvidas na sinalização como o MyD88 e o NF $\kappa$ B, levando a modulação de vários genes envolvidos na ativação celular (Brown, 2006).

A produção de NO foi apresentada apenas pelos fagócitos de 4h estimulados com a fração F2. A estimulação com LPS e IFN- $\gamma$  não foi capaz de aumentar a liberação desse mediador. Os neutrófilos são células produtoras de óxido nítrico e utilizam esse mecanismo para a destruição de diversos fungos (Machado *et al*, 2004). A participação do NO nos mecanismos microbicidas efetivos desenvolvidos pelos neutrófilos na cromomicose ainda não foi demonstrada.

Nos fagócitos de 72 horas após a estimulação com a fração F2 não foi observada a produção de NO. A estimulação com LPS e IFN- $\gamma$  não foi capaz de aumentar a liberação desse mediador.

Bocca *et al* (2006) demonstraram que macrófagos *in vitro* na presença de células de *Fonsecaea pedrosoi* aumentaram a produção de peróxido de hidrogênio e diminuíram a produção de óxido nítrico.

Os mecanismos pelos quais macrófagos e neutrófilos realizam sua ação fungicida estão ligados à produção de reativos do oxigênio e à mieloperoxidase. Neutrófilos e macrófagos produzem reativos de oxigênio, mas a via da mieloperoxidase é produzida apenas pelos neutrófilos, o que sugere que é através desse mecanismo que a ação fungicida dos neutrófilos acontece, além da ação dos reativos do oxigênio.

Os fagócitos na presença da fração F2 produziram TNF- $\alpha$ , apesar de Reppley *et al* (2007) relatarem que a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos é reduzida por  $\alpha$ -1-3-glucana, a fração F2 é constituída por outros componentes capazes de ativar outras vias indutoras da produção de TNF- $\alpha$ , como o TLR-2 (Brown, 2006).

A estimulação dos fagócitos de 72 horas com a fração F2 induziu produção de IL-10, o estímulo com LPS e IFN- $\gamma$  aumentou a produção dessa citocina. Diferentemente o estímulo com a fração F2 não alterou a produção de IL-12, mesmo após a estimulação com LPS e IFN- $\gamma$ . Esses dados sugerem que a fração F2 contribui para a polarização da resposta imune do tipo Th2 e conseqüentemente com o aumento da severidade da doença.

## 6. Conclusão

Considerando os resultados obtidos é possível concluir que a manutenção de um granuloma misto, com características da resposta imunológica do tipo Th1 e Th2, é sustentado pela persistência do fungo, pela incompetência dos macrófagos em destruí-lo e pela presença de componentes como a  $\beta$ -1-3-glucana presente na Fração F1, e a  $\alpha$ -1-3-glucana e a melanina presentes na Fração F2 do fungo *Fonsecaea pedrosoi*. Entretanto, a fração F1 isolada do *Fonsecaea pedrosoi* contribui para uma polarização da resposta imune do tipo Th1 o que levaria a um mecanismo de resolução da cromomicose, enquanto que a fração F2 isolada contribui para uma polarização da resposta imune do tipo Th2 e está envolvida no mecanismo de manutenção da patologia e da persistência do fungo.

## 7. Perspectivas

- Purificar os componentes das frações F1 e F2 para analisar a influência destas na ativação dos neutrófilos e macrófagos.
- A participação do NO como mecanismo microbicida do *Fonsecaea pedrosoi*

## 8. Referências

- Adams L.B., Hibbs J.B.; Cointor R.R.; Krahenbuhl, J.L. Microbistatic effect of murine activated macrophages for *Toxoplasma gondii*: role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *Journal Immunol*, 144 (7), 2725-30, April 1, 1990.
- Al-Doory Y. *Chromoblastomycosis*. Missoula, Editora Montain Press, 1972.
- Altamura M., Casale D., Pepe M., Tafaro A. Immune responses to fungal infections and therapeutic implications. *Current Drug Target Immune Endocrine Metabolic Disorders*, 1(3), 189-97, Nov, 2001.
- Ahrens J., Graybill J. R., Abishawl F. O. T., Rinaldi M. G. Experimental murine chromomycosis mimicking chronic progressive human disease. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, 40(6), 651-658, Jun, 1989.
- Alviano C. S., Farbiarz S. R., Souza W., Angluster J., Travassos L. R. Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *Journal of General Microbiology*, 137(4), 837-844, Apr, 1991.
- Alviano C. S., Farbiarz S. R., Travassos L. R., Angluster J., Souza W. Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propanolol. *Mycopathologia*, 119(1), 17-23, Jul, 1992.
- Alviano D. S., Franzen 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 Immunity*, 72(1), 229-237, Jan, 2004.
- Alviano D. S., Kneipp L. F., Lopes A. H., Travassos L. R., Meyer-Fernandes J. R., Rodrigues M. L., Alviano C. S. Differentiation of *Fonsecaea pedrosoi* mycelial forms into sclerotic cells is induced by platelet-activating factor. *Res. Microbiology*, 154(10), 689-695, Dec, 2003.
- Assrey J., Cunha F.Q., Epperlein M., Noronha-Dutra A., O'Donnell C.A., Liew F.Y., Moncada S. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *Eur.J.Immunol*, 24(3), 672-76, Mar, 2004
- Baqueiro G. F., Lopez P.B., Lescay B. R. *Chromoblastomycosis experimental*. *Bol. Sec. Cuba Derm. Sif*, 18, 19-28, 1961.
- Bocca A. L., Brito P. P. M. S., Figueiredo F., Tosta C. E. Inhibition of nitric oxide production by macrophages in chromoblastomycosis: a role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *Mycopathologia*, 161(4), 195-203, Apr, 2006
- Bocca A. L., Hayashi E. E., Furlanetto A. B., Campanelli A. P., Cunha F. Q., Figueiredo F. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with the nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. *J. Immunol.*, 161(6), 3056-3063, Sep 15, 1998.



- Bretescher P. A., Wei G., Menon J. N. Biellefeldt-Ohman H. Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes “susceptible” mice resistant to *Leishmania major*. *Science*, 257(5069), 539-542, Jul 24, 1992.
- Brygoo E. R., Destombes P. Epidemiologia de la chromoblastomycose humaine. *Bull Inst. Pasteur*, 74, 219-43, 1975.
- Brown K.D., Zurawski S.M., Mosmann T.R., Zurawski G. A family of small inducible proteins superfamily that includes leukocytes and fibroblast-derived factors, and indicators of various activation processes. *J.Immunol*, 142(2), 679-687, Jan 15, 1989.
- Brown G. D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat. Rev. Immunol*, 6(1), 33-43, Jan, 2006.
- Buchmuller-Rouiller Y., Mariel J. Impairment of the oxidative metabolism of mouse peritoneal macrophages by intracellular *Leishmania* spp. *Infect.Immunol*,55(3), 587-593, Mar, 1987.
- Carareto-Alves L. M., Figueiredo F., Brandão-Filho S. L., Tincani I. & Silva C. L. The role of fraction from *Paracoccidioides brasiliensis* in the genesis of inflammatory response. *Mycopathologia*, 97(1), 3-7, Jan, 1987.
- Cardona-Castro N., Agudelo-Flórez P., Restrepo-Molina R. Chromoblastomycosis murine model and in vitro test to evaluate the sensitivity of *Fonsecaea pedrosoi* to ketoconazole, itraconazole and saperconazole. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 91(6), 779-784, Nov-Dec, 1996.
- Cardona-Castro N., Agudelo-Flórez. Development of a chronic chromoblastomycosis model in immunocompetent mice. *Medical Mycology*. 37(2), 81-83, Apr, 1999.
- Cherwinski H. M., Mosmann T. R., Bond M. W., Giedlin M. A., Coffman R. L. Two types of murine helper T cell clone I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted protein. *J. Immunol.*, 136(7), 2348-57, Apr 1, 1986.
- Corbellini V. A., Scroferneker M. L., Carissimi M., Santolin L.D. Delayed-type hypersensitivity response to crude and fractionated antigens from *Fonsecaea pedrosoi* CMMI 1 grow in different culture media. *Mycopathologia*, 162(1), 51-55, Jul, 2006.
- Coffman R. L., Seymour B., Lebman D., Hiraki D., Chritiansen J., Shrader B., Cherwinski H., Savelkoul H., Filkenman F., Bond M., Mosmann T. M. The role of helper t cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol, Rev.* 102: 5-28, Feb, 1988.
- Cox G.W., Melillo G., Chattopadhyay U., Mullet D., Fertel R.H., Varesio L. Tumor necrosis factor-alpha-dependent production of reactive nitrogen intermediates mediates INF-gamma plus IL-2-induced murine macrophage tumoricidal activity. *J.Immunol*, 149(10), 3290-6, Nov 15, 1992.
- Cunha F.Q., Noncadas S., Liew F.Y. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. *Biochem.Res.Commun*, 182(3), 1155-9, Feb 14, 1992.

- Cunha F.Q., Moss D.W., Leal L.M.C.C., Moncada S., Liew F.Y. Induction of macrophage parasiticidal activity by *Staphylococcus aureus* and endotoxins through the nitric oxide synthesis pathway. *Immunology*, 78(4), 563-7, Apr, 1993.
- Dafaveri J., Graybill J. R. Treatment of chronic murine chromoblastomycosis with the triazole SCH39304. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 42(6), 601-606, 1990.
- David D. Chromomycosis. *Mycoses and algal infections*, 567, 1998.
- D'Ávila S. C. G. P., Pagliari C., Duarte M. I. S. The cell-mediated immune reaction in the cutaneous lesion of Chromoblastomycosis and their correlation with different clinical forms of the disease. *Mycopathologia*, 156(2), 51-60, 2002.
- Diamond R. D. Immune response to fungal infection. *Reviews of Infectious Disease*, 11 Suppl 7, S1600-1604, Nov-Dec, 1989.
- Drapier J.C. Hibbs Jr J.B. Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells. *J.Immunology*, 140(8), 2829-2838, Apr 15, 1988.
- Esterre P., Jahevitra M., Andriantsimahavandy A. Humoral immune response in chromoblastomycosis during and after therapy. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 7(3), 497-500, May, 2000.
- Farbiarz S. R., de Carvalho T. V., Alviano C., de Souza W. Inhibitory effect of melanin on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with mammalian cells in vitro. *J. Med. Vet. Micol*, 30(4), 265-273, 1992.
- Fiorentino D. F., Bond M. W., Mosmann T. R. Two types of mouse helper T cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med*, 170(6), 2081-95, Dec 1, 1989.
- Franzen A. J., Souza W., a M., Alviano C. S., Rozental S. Morphometric and densitometric study of the biogenesis of electron-dense granules in *Fonsecaea pedrosoi*. *FEMS Microbiology Letters*, 173(2), 395-402, Apr, 1999.
- Fuchs J., Pecher S. Partial suppression of cell mediated immunity in chromoblastomycosis. *Mycopathologia*, 119(2), 73-76, Aug, 1992.
- Gajewski T.F., Joyce J., Fitch F.W. Antiproliferative effect of IFN-gamma in immune regulation III. Differential selection of Th1 and Th2 murine helper T lymphocyte clones using recombinant IL-2 and recombinant INF- $\gamma$ . *J.Immunol*, 143(1), 15-22, Jul 1, 1989.
- Gajewski T.F., Fitch F.W. Differential activation of murine Th1 and Th2 clones. *Res.Immunol*, 142(1), 19-23, Jan, 1991.
- Galperin C., Shoenfeld Y., Bilburd B., Esterre P., Meroni P.L., Del Papa N., Halpern G. M., Andriantsimahavandy A., Greshwin M. E. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in patients with chromomycosis. *Clin. Exp. Rheumatol*, 14(5), 479-83, Sep-Oct, 1996.

- Geijtenbeek T. B., van Vliet S. J., Engering A., 't Hart B. A., van Kooyk Y. Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol*, 22, 33-54, 2004.
- Gersuk G. M., Underhill D. M., Zhu L., Marr K. A. Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states. *J Immunol.*, 176(6), 3717-24, Mar 15, 2006.
- Gimenes V. M. F., Souza M. G., Ferreira K. S., Marques S. G., Gonçalves A. G., Santos D. V. C. L., Pedroso e Silva C.M., Almeida S. R. Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. *Microbes and Infection*, 7(4), 708-713, Apr, 2005.
- Gimenes V. M. F., Criado P. R., Martins J. E. C., Almeida S. R. Cellular immune response of patients with chromoblastomycosis undergoing antifungal therapy. *Mycopathologia*, 162 (2), 97-101, Aug, 2006.
- Gopal P. K., Shepherd M. G., Sullivan P. A. Analysis of wall glucans from yeast, hyphal and germ-tube forming cells of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol*, 130(12), 3295-301, Dec, 1984.
- Granger D.L., Lehninger A.L. Site of inhibition of mitochondrial electron transport in macrophage-injured neoplastic cells. *J.Cell.Biol.*, 95(2 Pt 1), 527-535, Nov, 1982.
- Granger D.L., Hibbs J. B. Jr., Perfect J.R., Durack D.T. Specific amino acid (L-arginine) requirement for the microbistatic activity of murine macrophage. *J.Clin.Invest*, 81(4), 1129-1136, Apr, 1988.
- Green L. C., Wagner D. A., Ruiz de Luzureaga K., Istfan N., Young V.R., Tannenbaum S. R. Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 78 (12), 7764-8, Dec, 1981.
- Green S.J., Crawford R.M., Hockmeyer J.T., Meltzer M., Nacy C.A. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in INF-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J.Immunol*, 145(12), 4290-7, Dec 15, 1990.
- González A., de Gregori W., Velez D., Restrepo A., Cano L. E. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma-interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Infect. Immunol*, 68(5), 2546-52, May, 2000.
- Goodrum K. J., Dierksheide J., Yoder B. J. Tumor necrosis factor alpha acts as an autocrine second signal with gamma interferon to induced nitric oxide in group B *Streptococcus*-treated macrophages. *Inf. Immun*, 63(9), 3715-17, Sep, 1995.
- Hayakawa M., Ghosn E. E. B., Teixeira de Sousa M. G., Ferreira K. S., Almeida S. R. Phagocytosis, production of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines by macrophages in the presence of dematiaceous fungi that causes chromoblastomycosis. *Scandinavian Journal of Immunology*, 64(4), 382-387, Oct, 2006.

- Heinzell F.P., Sadick M.D., Holaday B.J., Coffman R.L., Locksley R. M. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J.exp.Med.*, 169(1), 59-72, Jan 1, 1989.
- Howard R. J., Ferrari M. A., Roach D. H., Money N. P. Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(24):11281-4, Dec 15, 1991.
- James S.L., Glaven J. Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. *J.Immunol.*, 143(12), 4208-12, Dec 15, 1989.
- Jiménez M., Restrepo A., Danuta R., Cano L. E., García L. F. Importance of complement 3 and mannose receptors in phagocytosis of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by Nramp1 congenic macrophages lines. *FEMS Immunol Med. Microbiol.*, 47(1), 56-66, Jun, 2006.
- Kanazawa N. Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells. *Journal Dermatological Science*, 45(2), 77-86, Feb, 2007.
- Kanetsuna F., Carbonell L. M. Cell wall glucan of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal Bacteriol.*, 101(3), 675-680, Mar, 1970.
- Kanetsuna F., Carbonell L. M., Azuma I., Yamamura Y. Biochemical studies on thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal Bacteriol.*, 110(1), 208-18, Apr, 1972.
- Kurokawa C, S., Sugizaki M. F., Peraçoli M. T. S. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 40(3), 125-35, May-Jun, 1998.
- Lacaz C.S., Porto E., Martins J. E. C., Melo N. T. *Tratado de Micologia Médica*. 9ª Edição. São Paulo: Sarvier, 2002 cap. 18, p. 451-458.
- Limongi C. L., Rozental S., Alviano C. S., de Souza W. The influence of surface carbohydrates on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with Chinese hamster ovary glycosylation mutant cells. *Mycopathologia*, 138(3), 127-135, 1997.
- Liew F.Y., Severina A., Millot S., Schimidt J., Salter M., Moncada S. A possible novel pathway of regulation by murine T helper type-2 (Th2) cells of a Th1 cell via the modulation of the induction of nitric synthase on macrophages. *Eur.J.Immunol.*, 21(10), 2489-94, Oct, 2001.
- Lin J.Y., Chadee K. Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J.Immunol.*, 148(12), 3999-4005, Jun 15, 1992.
- Lorsbach R.B., Murphy W.J., Lowenstein C.J., Snyder S.H., Russel S.W. Expression of the nitric oxid synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide. *J.Biol.Chem.*, 268(3), 1908-13, Jan 25, 1993.

Machado P. R.L., Araújo M.I.A.S., Carvalho L., Carvalho E. M. Mecanismos de resposta imune às infecções. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 79(6), 647-664, nov/dez, 2004.

Marletta M.A., Yoom P.S., Iyengar R., Leaf C. D., Wishnok J.S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrate and nitrite: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry*, 27(24), 8706-8711, Nov 29, 1988.

Marques S.G., Silva C. M. P., Saldanha P.C., Rezende M.A., Vicente V. A., Queiroz-Telles F., Costa J. M. L. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of the Babassu Coconut (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon Region of Maranhão Brazil. *Jpn J. Mycol*, 47(4), 305-311, Jul 26, 2006.

Matte S. M. W., Lopes J. O., Melo I. S., Espadim L. E. R., Pinto M. S. Cromoblastomicose no Rio Grande do Sul: relato de 12 casos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30(4), 309-311, Jul-Aug, 1997.

Medeiros A. I., Malheiros A., Jose P. J., Conroy D. M., Williams T. J., Faccioli L. H. Differential release of MIP-1 alpha and eotaxin during infection of mice by *Histoplasma capsulatum* or inoculation of beta-glucan. *Inflammation Reseach*, 53, 351-54, Mar, 2004.

Mendes-Giannini M. J. S., Soares C. P., Silva J. L. M., Andreotti P. F. Interation of pathogenic fungi with host cells: Molecular and cellular approaches. *FEMS Immunology and Medical Mirobiology*, 45, 383-94, Jul, 2005.

Michaliszyn E., Senechal S., Martel P., Repentigny L. Lack of involvement of nitric oxide in killing *Aspergillus fumigatus* conidia by pulmonary alveolar macrophages. *Infect. Immun.*, 63(5), 2075-2078, 1995.

Minotto R., Bernardi C. D. V., Mallmann L. F., Edelweiss M. I. A., Scroferneker M. L. Chromoblastomycosis: a review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 44(4), 585-592, Apr, 2001.

Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Gieldlin M.A., Coffman R.L. Two types of murine T-cell clone. I – Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J.Immunol.*, 136(7), 2248-57, Apr 1, 1986.

Muniz-Junqueira M. I., Prata A., Tosta C. E. Factors influencing phagocytosis of *Salmonella typhimurium* by macrophages in murine schistosomiasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30(2), 101-106, mar-abr, 1997.

Netea M. G., Ferwerda G., van der Graaf C. A., van der Meer J. W., Kullberg B. J. Recognition of fungal pathogens by toll-like receptors. *Curr Pharm Des.*, 12(32), 4195-201, Nov, 2006.

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 Infection*, 6(7), 657-65, Jun, 2004.

- Nisini R., Romagnoli G., Gomez M. J., La Valle R., Torosantucci A., Mariotti S., Teloni R., Cassone A. Antigenic properties and processing requirements of 65-kilodalton mannoprotein, a major antigen target of anti-*Candida* human T-cell response, as disclosed by specific human T-cell clones. *Infection Immunity*, 69(6), 3728-36, Jun, 2001.
- Nosanchuk J. D., Gomez B. L., Youngchim S., Diez S., Aisen P., Zancope-Oliveira R. M., Restrepo A., Casadevall A., Hamilton A. J. *Histoplasma capsulatum* synthesizes melanin-like pigments in vitro and during mammalian infection. *Infect Immun.*, 70(9), 5124-31, Sep, 2002.
- Ogawa M. M., Alchorne M. M. A., Barbiere A., Castiglioni M. V., Penna A. P. B., Tomimori-Yamashita J. Lymphoscintigraphic analysis in chromoblastomycosis. *International Journal of Dermatology*, 42(8), 622-625, Aug, 2003.
- Palaminos J.C., Armenteros J.A. Abscesses hipodermicos metastasicos em um caso de chromoblastomycose. *Ver. Sif. Leprol y Dermat.*, 4, 63-71, 1974.
- Peck R. L. The lipids of fungi with special references to pathogenic fungi. In: Nickerson W. J. Ed. *Biology of pathogenic fungi*. New York: Ronald Press, 1947. 162-188p.
- Queiroz Filho F. A cromoblastomycose no estado do Paraná: etiologia, epidemiologia, clínica e terapêutica com itraconazol. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30(4), 345-346, 1997.
- Rappleye C. A., Engle J. T., Goldman W. E. Mol. RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for alpha-(1-3)-glucan in virulence. *Mol. Microbiol.*, 53(1), 153-65, Jul, 2004.
- Rappleye C. A., Goldman W. E. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. *Annu. Rev. Microbiol.*, 60, 281-303, 2006.
- Rappleye C. A., Eissenberg L. G., Goldman W. E. *Histoplasma capsulatum*  $\alpha$ -(1-3)-glucan blocks innate immune recognition by the  $\beta$ -glucan receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 4 (104), 1366-70, Jan 23, 2007.
- Ricard-Blum S., Hartmann D. J., Esterre P. Monitoring of extracellular matrix metabolism and cross-linking in tissue, serum and urine of patients with chromoblastomycosis, a chronic skin fibrosis. *European Journal of Clinical Investigation*, 28(9), 748-54, Sep, 1998.
- Rosen H., Klebanoff S.J. Oxidation of microbial iron-sulfur centers by the myeloperoxidase – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- halide antimicrobial system. *Infection Immunity*, 47(3), 613-18, Mar, 1985
- Rosen T., Overholt M. Persistent viability of the Medlar body , 35(2), 96-8, Feb, 1996.
- Rozental S., Alviano C. S., de Souza W. The in vitro susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* to activated macrophages. *Mycopathologia*, 126(2), 85-91, May, 1994.
- Rozental S., Alviano C.S, de Souza W. Fine structure and cytochemical study of the interaction between *Fonsecaea pedrosoi* and rat polymorphonuclear leukocyte. *Journal Medical Veterinary Mycology*, 34(5), 323-30, Sep-Oct, 1996.

Sá-Nunes A., Medeiros A. I., Faccioli L. H. Interleukin-5 mediates peritoneal eosinophilia induced by the F1 cell wall fraction of *Histoplasma capsulatum*. *Brazilian Journal Medical Biological Research*, 37(3), 343-6, Mar, 2004.

Saijo S., Fujikado N., Furuta T., Chung S., Kotaki H., Seki K., Sudo K., Akira S., Adachi Y., Ohno N., Kinjo T., Nakamura K., Kawakami K., Iwakura Y. Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nature Immunology*, 8(1), 34-46, Jan, 2007.

Salgado C. G., Silva J. P., Diniz J. A. P., Silva M. B., Costa P. F., Teixeira C., Salgado U. I. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 46(1), 33-36, Jan-Feb, 2004.

San-Blas, G. The cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host-parasite relationships. *Mycopathologia*, 79(3), 159-184, Sep 17, 1982

San-Blas G., San-Blas F., Rodriguez L. E., Castro C. J. Un modelo de dimorfismo en hongos patógenos: *Paracoccidioides brasiliensis*. *Cur. Microbiol.*, 8, 85-88, 1987.

Sato T., Iwabuchi K., Nagaoka I., Adachi Y., Ohno N., Tamura H., Seyama K., Fukuchi Y., Nakayama H., Yoshizaki F., Takamori K., Ogawa H. Induction of human neutrophil chemotaxis by *Candida albicans*-derived beta-1,6-long glycoside side-chain-branched beta-glucan. *Journal Leukocyte Biology*, 80, 204-11, Jul, 2006.

Scott P. The role of Th1 and Th2 cells in experimental cutaneous leishmaniasis. *Exp.Parasitol.*, 68(3), 369-72, Apr, 1989.

Scott P., Kaufmann S. H. The role of T-cell subsets and cytokines in the regulation of infection. *Immunol. Today.*, 12(10), 346-8, Oct, 1991.

Shaw D. R., Griffin F. M. Antibody-independent phagocytosis. In Adams D. O., Elson P. J., Koren H (eds). *Methods for studying mononuclear phagocytes*. London: Academic Press, 1981.

Silva C. L.; Fazioli R. A. Role of the fungal cell wall in the granulomatous response of mice to the agents of chromomycosis. *Journal Med. Microbiol.*, 20(3), 299-305, Dec, 1985.

Silva C. L.; Fazioli R. A. A *Paracoccidioides brasiliensis* having granuloma-inducing, toxic and macrophage stimulating activity. *Journal Gen. Microbiol.*, 131(6), 1497-501, Jun, 1985.

Silva A.C.P., Silva A.C.M., Marques S.G., Saldanha A. C. R., Nascimento J.D.L., Branco M.R.F.C., Silva R.R., Costa J.M.L. Associação de cromoblastomicose e hanseníase: relato de dois casos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 27(4), 241-44, out-dez, 1994.

Silva J. P., Alviano D. S., Alviano C. S., Souza W., Travassos L. R., Diniz J. A. P., Rozental S. Comparison of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells obtained *in vivo* and *in vitro*: ultrastructure and antigenicity. *FEMS Immunology Medical Microbiology*, 33(1), 63-69, Mar 25, 2002.

Silva J. P., Souza W., Rozental S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil). *Mycopathologia*, 143(3), 171-5, 1998-1999.

Silva M. B., Marques A. F., Nosanchuk J. D., Casadevall A., Travassos L. R., Taborda C. P. Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes and Infection*, 1-9, Set 12, 2005.

Simón R. D., Duque S. M., Garcia M. A. Cromomycosis hongos dematiáceos que intervienen en su etiología. *Ver. Cubana Med.*, 37(3), 136-140, 1998.

Sotto M. N., De Brito T., Silva A. M. G., Vidal M., Castro L. G. M. Antigen distribution and antigen-presenting cells in skin biopsies of human chromoblastomycosis. *J. Cutan Pathol.*, 31(1), 14-18, Jan, 2004.

Stout R.D., Bottomly K. Antigen-specific activation of effector macrophages by INF-gamma producing (Th1) T cell clones. Failure of IL-4-producing (Th2) T cell clones to active effector function in macrophage. *J. Immunol.*, 142(3), 760-5, Feb 1, 1989.

Stuehr D.J., Marletta M.A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Prod. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(22), 7738-42, Nov, 1985.

Szanişzlo P. J., Cooper B. H., Voges H. S., Chemical compositions of the hyphal walls of three chromomycosis agents. *Sabouraudia*, 10(1), 94-102, 1972.

Taborda C. P., Da Silva M. B., Marques A. F., Nosanchuk J. D., Casadevall A., Travassos L. R. Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes Infect.*, 8(1), 197-205, Jan, 2006.

Tachado S. D., Zhang J., Zhu J., Patel N., Cushion M., Koziel H. Pneumocystis-mediated IL-8 release by macrophages requires coexpression of mannose receptors and TLR2. *J Leukoc Biol.*, 81(1), 205-11, Jan, 2007. Epub 2006 Oct 4.

Talhari S., Trindade J. F. *Dermatologia Tropical*. Ed. Médica e Científica LTDA, 1995. Cap. 17, 233p.

Taylor P. R., Tsoni S. V., Willment J. A., Dennehy K. M., Rosas M., Findom H., Haynes K., Steele C., Botto M., Gordon S., Brown G. D. Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol.*, 8(1), 31-8, Jan, 2007.

Teixeira de Sousa M. G., Ghosn E. E. B., Almeida S. R. Absence of CD4<sup>+</sup> T cells impairs host defence of mice infected with *Fonsecaea pedrosoi*. *Scandinavian Journal of Immunology*, 64(6), 595-600, Dec, 2006.

Vazquez-Torres A, Jones-Carson J., Balish E. Nitric oxide production does not directly increase macrophage candidacidal activity. *Infect. Immun.*, 63(3), 1142-4, Mar, 1995.



Viriyakosol S., Fierer J., Brown G. D., Kirkland T. N. Innate immunity to the pathogenic fungus *Coccidioides posadasii* is dependent on Toll-like receptor 2 and Dectin-1. *Infect Immun.*, 73(3), 1553-60, Mar, 2005.

Wang Y., Aisen P., Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. *Infect Immun.*, 63(8):3131-6, Aug, 1995.

Williams M. E., Chang T. L., Burke S. K., Lichtman A. H., Abbas A. K. Activation of functionally distinct subsets of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *Res. Immunol.*, 142(1), 23-8, Jan, 1991.

Wilson J. W. Therapy of systemic fungus infections. *Arch. Intern. Med.*, 108, 292-316, Aug, 1961.

## 9. Anexo