

**MOISES BATISTA DA SILVA**

**INDUÇÃO DE ESCLERÓTICAS *in vitro* E ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE DOS PACIENTES  
DE CROMOBLASTOMICOSE EM TRATAMENTO COM ITRACONAZOL**

**BELÉM**

**2009**

**MOISES BATISTA DA SILVA**

**INDUÇÃO DE ESCLERÓTICAS *in vitro* E ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE DOS PACIENTES  
DE CROMOBLASTOMICOSE EM TRATAMENTO COM ITRACONAZOL**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de doutor em Neurociências e Biologia Celular, área de concentração biologia celular.**

**Orientador: Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado.  
Instituto de Ciências Biológicas - ICB  
Universidade Federal do Pará - UFPA**

**BELÉM  
2009**

Dados Internacionais da Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca de Pós-Graduação do ICB-UFPA – Belém (PA)

---

Silva, Moises Batista da

Indução de escleróticas *in vitro* e análise da resposta imune dos pacientes de cromoblastomicose em tratamento com itraconazol / Moises Batista da Silva; orientador, Claudio Guedes Salgado. – 2009.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2009.

1. Micose. 2. Antimicóticos. 3. Fungos patogênicos. 3. Imunidade. 4. Células escleróticas. I. Título.

---

CDD – 22. ed. 616.969

---

**MOISES BATISTA DA SILVA**

**INDUÇÃO DE ESCLERÓTICAS *in vitro* E ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE DOS PACIENTES  
DE CROMOBLASTOMICOSE EM TRATAMENTO COM ITRACONAZOL**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de  
Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará,  
como requisito parcial para a obtenção do grau de  
doutor em Neurociências e Biologia Celular, área de  
concentração biologia celular.**

Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado (Orientador)  
Instituto de Ciências Biológicas, ICB - UFPA

Profa. Dra. Sonia Rozental  
Instituto Carlos Chagas Filho  
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof. Dr. Jorge Pereira da Silva  
Faculdade de Farmácia, ICS - UFPA

Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito Junior  
Instituto de Ciências Biológicas, ICB - UFPA

**BELÉM**

**2009**

## SUMÁRIO

CAPA	I
FOLHA DE ROSTO	ii
BANCA AVALIADORA	iii
SUMÁRIO	iv
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	08
1.1 A CROMOBLASTOMICOSE	08
1.2 CLÍNICA, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO	09
1.3 ECOEPIDEMIOLOGIA	11
1.4 AGENTES ETIOLÓGICOS	13
1.5 O PRINCIPAL AGENTE <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	14
1.6 INDUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS ESCLERÓTICAS	15
1.7 RESPOSTA IMUNE	16
1.7.1. TIPOS DE RESPOSTA IMUNE	16
1.7.2. CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENOS (APC)	17
1.8 RESPOSTA IMUNE NA CROMOBLASTOMICOSE	19
2. ARTIGOS PUBLICADOS	20
2.1 DEVELOPMENT OF NATURAL CULTURE MEDIA FOR RAPID INDUCTION OF <i>Fonsecaea pedrosoi</i> SCLEROTIC CELLS <i>IN VITRO</i>	23
2.2 HISTOPATHOLOGIC EVALUATION AND IMMUNOLOGICAL PATTERNS OF CHROMOBLASTOMYCOSIS PATIENTS TREATED FOR ONE YEAR WITH ITRACONAZOLE	34
3. DISCUSSÃO	54
4. PERSPECTIVAS	57
4.1 EXPERIMENTOS DE ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA	57
4.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	57
4.3 MODELOS DE GRANULOMA <i>in vitro</i>	58
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, pai filho e espírito santo, fonte de inspiração e louvor, senhor sob todas as coisas e salvador único, digno de toda glória e louvor, que me concedeu muitas bênçãos, como: minha família, minha noiva, meu trabalho e amigos, além de saúde e prosperidade, obrigado meu Deus.

A minha FAMÍLIA, minha mãe **Raimunda Maria Soares Batista**, sempre apoiando, permitindo e facilitando a concretização de meus sonhos, sem você seria impossível chegar até aqui e continuar sonhando. Agradeço ao meu pai **Alberto Oliveira**, meus irmãos **Rui e Polyana** pela alegria transmitida por eles no meu dia-a-dia. A **Rivanice** e **Leonardo** por toda a estima e incansável dedicação.

A **Simone Campelo**, minha noiva, amiga, o melhor presente que Deus poderia ter me concedido. Amor, obrigado por tudo o aquilo que fazes por nós, por acreditares que podíamos dar certo, mesmo com todas as adversidades. Obrigado por sua paciência e apoio incansável, pelas incontáveis revisões e discussões sobre os resultados e projetos, espero por toda a vida ter você a meu lado.

Ao LABORATÓRIO DE DERMATO-IMUNOLOGIA, em especial ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. **Claudio Guedes Salgado** pelos ensinamentos profissionais e pessoais, por todo esforço em repassar conhecimento, discutir e planejar projetos e experimentos; ao Dr. **Jorge Pereira da Silva** com seu inesgotável bom humor e palavras de incentivo, mas principalmente por sua amizade e por ter me conduzido ao Laboratório. Este abraço se estende aos amigos de trabalho **Suellen, Beth, Denis, Heleno, Fátima, Gisele e André** pela sólida amizade que construímos durante todos os anos e incontáveis dias e noites de trabalho harmonioso.

Aos laboratórios LIP (lab. de Imunopatologia) coordenado pela **Dra. Aldina Barral** e LIMI (Lab. Integrado de Imunologia e Microbiologia) coordenado pelo **Dr. Manoel Barral Netto**, do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz do Instituto Oswaldo Cruz (CPQGM-IOC) de Salvador-BA, grandes exemplos de pesquisadores, profissionais e humanismo; este abraço se estende aos irmãos **Bruno Bezerril Andrade** e **Lucas Nogueira**, além de **Natali, Jorjão, Jorginho, Valéria Borges**, e demais alunos e funcionários destes laboratórios.

Aos professores: **Dra. Sonia Rozental** (Lab. De biologia celular de fungos -UFRJ) pela cooperação em minha formação em ultra-estrutura e biologia celular de fungos; **Dr. José Antonio Picanço Diniz Jr.** (laboratório de microscopia eletrônica do Instituto Evandro Chagas) pelos ensinamentos em microscopia ótica e eletrônica que são muito úteis no meu dia a dia como biólogo; **Dra. Antonia Vieira** (Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará), amiga e mestra em colocar os alunos no lugar certo; e **Dr. Lacy Cardoso de Brito Jr.**, o mais querido professor do ICB/UFPA.

Este trabalho só foi possível em razão do apoio técnico-financeiro dos seguintes órgãos: Unidade de Referência e Treinamento em Dermatologia Sanitária “Dr. Marcello Candia”; Secretaria Executiva de Saúde Pública do Estado do Pará (SESPA); a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA), ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e a Fundação Nacional de Saúde (FNS).

## RESUMO

A cromoblastomicose (CBM) é uma doença fúngica crônica que acomete a pele, caracterizada pelo desenvolvimento de lesões polimórficas, que apresentam infiltrado inflamatório granulomatoso na presença de células escleróticas, patognomônicas desta doença. Um dos objetivos deste estudo foi avaliar a indução de células escleróticas por meios naturais, com biomassas de *Bactris gasipaes* e de *Theobroma grandiflorum*, cujas respectivas espécies induziram *in vitro* células escleróticas similares àquelas encontradas nos tecidos de lesões humanas, em 10 e 2 dias, respectivamente, o que viabilizou a produção de um meio indutor em pó, já disponibilizado a outros grupos que estudam a CBM. Outro objetivo foi avaliar a imunopatologia da CBM nos pacientes, antes e durante a utilização de itraconazol (ITZ). Para isto, foi utilizada a técnica de ELISA para as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10 circulantes, e a imunohistoquímica de biópsias das lesões em diferentes tempos de tratamento – que permitiu analisar as alterações quantitativas e qualitativas dos tipos celulares durante 12 meses do tratamento com ITZ na dose de 200 mg/dia – com anticorpos anti-CD20, anti-CD8 e anti-CD68. Quanto as citocinas, a IL-10 circulante não mostrou nenhuma mudança significativa, enquanto IL-4 e TNF- $\alpha$  apresentaram um aumento da titulação ao longo de 12 meses de tratamento. Em relação à imunofenotipagem, houve uma diminuição significativa no processo inflamatório e nos infiltrados celulares durante 3 e 6 meses do tratamento, enquanto que apenas aos 12 meses houve a regressão significativa do número de escleróticas. A Imunofenotipagem revelou que os macrófagos estão localizados principalmente nas áreas centrais do granuloma, enquanto que as células TCD8<sup>+</sup> estão na periferia e as células TCD20<sup>+</sup> encontram-se homogeneamente distribuídas, com um aumento significativo após 6 meses do tratamento, retornando aos níveis iniciais após um ano. Os macrófagos e linfócitos citotóxicos são recrutados para o sítio de infecção durante o tratamento, apresentando um aumento significativo após 12 meses de tratamento com ITZ. Estes resultados demonstram que a formação do granuloma na CBM é semelhante àqueles observados em outras doenças infecciosas granulomatosas, e que a presença de IL-4 e IL-10 podem estar relacionadas com a persistência do fungo nas lesões e com a dificuldade de cura observada nestes pacientes.

## ABSTRACT

Chromoblastomycosis (CBM) is a chronic fungal disease which affects the skin, characterized for slowing development of polymorphic skin, that present infiltrated inflammatory granulomatous in the presence of sclerotic cells, characteristic of this illness. One of the objectives of this study was to evaluate the induction of sclerotic cells for natural mediums, with biomasses of *Bactris gasipaes* and *Theobroma grandiflorum*, whose respective species had induced *in vitro* similar sclerotic cells to those found in tissue of patients, in 10 and 2 days, respectively, what it made possible the production of a powder medium inductor, already donated to other groups that study the CBM. Another objective was to evaluate the histopathology of the CBM in the patients, before and during the use of itraconazole (ITZ). For this, the technique of ELISA for the cytokines was used TNF- $\alpha$ , circulating IL-4 and IL-10, and the immunohistochemistry of biopsias in different times of treatment - that it allowed to analyze the quantitative and qualitative alterations of the cellular types during 12 months of the treatment with ITZ in the 200 dose of mg/dia - with antibodies anti-CD20, anti-CD8 and anti-CD68. How much the cytokines, the circulating IL-10 did not show significant change, while IL-4 and TNF- $\alpha$  had presented an increase of the levels throughout 12 months of treatment. In relation to the immunophenotyping, it had a significant reduction in the inflammatory process and the cellular infiltrated during 3 and 6 months of the treatment, whereas only to the 12 months had the significant regression of the number of sclerotic cells. The immunophenotyping disclosed that the macrophages are mainly located in the areas central areas of granuloma, whereas cells TCD8+ are in the periphery and cells TCD20+, which were found throughout the tissues, with a significant increase after 6 months of the treatment, returning to the initial levels after one year. The cytotoxic macrophages and lymphocytes were having presented a significant increase after 12 months of treatment with ITZ. These results demonstrate that the formation of granuloma in the CBM is similar to those observed in other granulomatous infectious disease, and that the presence of IL-4 and IL-10 can be related with the persistence of fungi in the injuries and with the difficulty of cure observed in these patients.



## 1. INTRODUÇÃO

Fungos patogênicos humanos são alvo de estudos em todos os continentes, devido a importância que estes organismos apresentam pela casuística, principalmente em pacientes com comprometimento imunológico. A micologia médica tem dedicado seus esforços para o entendimento e combate a estes microrganismos, e reuni resultados obtidos nas mais diferentes áreas da ciência, como taxonomia, fisiologia e biologia celular e molecular. Desta maneira, podemos didaticamente dividir as principais patologias da seguinte maneira: 1) micoses superficiais, que acometem somente a camada queratinizada da pele, sendo os agentes agrupados como fungos queratinofílicos, causadores das Tineas, entre outras patologias; 2) micoses subcutâneas, com patologias que atingem as camadas mais profundas da pele, ocorrendo a transmissão por traumatismo, e neste grupo estão patologias de grande importância amazônica, como a lobomicose e a CBM, nosso objeto de estudo; 3) micoses sistêmicas, adquiridas pela inalação dos esporos em suspensão, sendo aí incluídas a paracoccidioidomicose e a histoplasmose; e 4) micoses oportunistas, como as candidoses.

### 1.1. A CROMOBLASTOMICOSE

A cromoblastomicose (CBM) é também conhecida como cromomicose, dermatite verrucosa, feoesporotricose, cladosporiose, figueira, formigueiro, pé-musgoso, doença de Fonseca, doença de Pedroso, micose de Carrión, micose de Lane-Pedroso ou blastomicose negra (LACAZ C.S. & MARTINS E.J., 1991; RIPPON J.W., 1988). O primeiro caso foi observado em 1904 por Guiteras e Alexandrino Pedroso, em Cuba, e somente em 1911 ocorreu o primeiro relato de caso no Brasil, que foi realizado no estado de São Paulo (LACAZ C.S. & MARTINS E.J., 1991).

A patologia inicia-se após a implantação traumática, normalmente por material vegetal em decomposição (MARQUES *et al.*, 2006) ou viável (SALGADO *et al.*, 2004b) contendo as unidades formadoras de colônia de um dos agentes etiológicos

(LOPEZ & MENDEZ TOVAR, 2007; RUBIN *et al.*, 1991). A CBM é crônica e acomete a pele e o tecido subcutâneo, tendo as lesões um aspecto verrucoso.

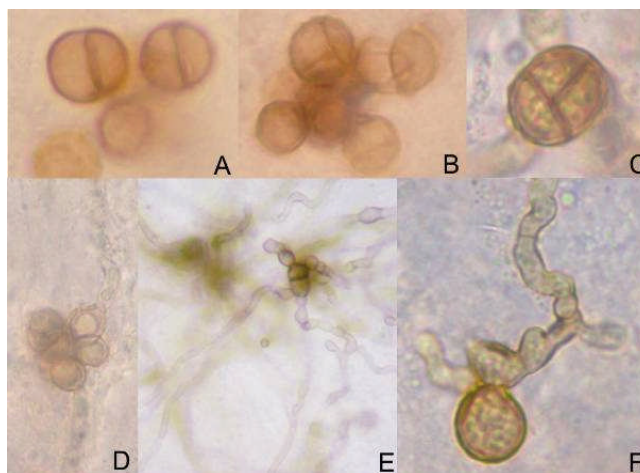
## 1.2. CLÍNICA, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO.

A CBM apresenta aspectos clínicos bastante diversos, podendo ser observadas lesões nodulares, verrucosas, em placas, cicatriciais e tricofitíides, variando desde lesões localizadas até disseminadas, caracterizando a CBM cutânea disseminada (SALGADO *et al.*, 2005). Essa variação levou a tentativa de graduação da severidade do quadro em leve, moderado e grave, considerando-se o número, extensão e a disseminação das lesões (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 1992). Contudo, as lesões observadas em pacientes portadores de CBM podem ser representadas pela presença de placas verrucosas, únicas ou múltiplas, de limites nítidos e bordas bem definidas, associadas a nódulos que podem ulcerar, tornando-se vegetantes, adquirindo aspecto papilomatoso semelhante a couve-flor (LACAZ C.S. & MARTINS E.J., 1991). As lesões localizam-se principalmente nos membros inferiores, atingindo pessoas que têm contato com áreas de floresta, como agricultores, lavradores e madeireiros (ESTERRE *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 1998b) (Figura 01).



**Figura 01.** Diferentes aspectos clínicos das lesões de CBM. A) Anular, B) Em placa, C) Nodular, D) Cutâneo difusa. Fonte: Arquivo do Laboratório de Dermato-Imunologia.

Os aspectos clínicos não são suficientes para que o diagnóstico de CBM seja confirmado, sendo necessário o diagnóstico laboratorial, através do exame micológico direto, onde são observadas células arredondadas de coloração acastanhada denominadas de células escleróticas, corpos fumagóides ou células muriformes (MATSUMOTO, 1984). Estas células podem ser observadas isoladamente ou em pequenos grumos a partir do raspado da lesão ou mesmo do material purulento ali encontrado (MATTE *et al.*, 1997). As células escleróticas no tecido apresentam classicamente a divisão multiplanária, que se caracteriza pela formação de septos em diferentes planos celulares (RIPPON J.W., 1988) e comumente são também observadas hifas que se originam destas estruturas (Figura.02).



**Figura 02. Exame micológico direto.** Células escleróticas observadas ao exame micológico direto da lesão de pacientes, evidenciando a coloração acastanhada e as septações multiplanárias (A, B, C e E), assim como a existência de hifas em alguns dos casos (C, D, E e F). Fonte: Arquivo do Laboratório de Dermato-Imunologia.

O tratamento da CBM não é padronizado, existindo inúmeros esquemas terapêuticos, desde intervenções cirúrgicas como a exérese cirúrgica para pequenas lesões e a crioterapia, que além de onerosa é bastante agressiva, deixando marcas permanentes no paciente tratado (BONIFAZ *et al.*, 1997). Também é possível optar por uma terapêutica baseada em antifúngicos como o itraconazol, utilizado em concentrações que variam entre 100 mg/dia (RESTREPO *et al.*, 1988) até 400mg/dia (UNGPAKORN & REANGCHAINAM, 2006) ou em pulso terapia (UNGPAKORN & REANGCHAINAM, 2006), além de outras drogas que podem também ser empregadas, como terbinafina, anfotericina B e 5-fluocitocina (VITALE *et al.*, 2003), com estudos

demonstrando diferentes graus de sucesso, apesar dos tratamentos serem longos e dispendiosos (BONIFAZ *et al.*, 1997;ESTERRE *et al.*, 1996b).

Na tentativa de obter esquemas terapêuticos eficientes, diferentes drogas têm sido estudadas, assim como esforços vêm sendo canalizados no sentido de analisar as variações das cepas de *F. pedrosoi* (ANDRADE *et al.*, 2004b) e a composição estrutural da parede celular (CUNHA *et al.*, 2005b;NIMRICHTER *et al.*, 2005), que é o principal alvo para a ação de drogas fungicidas. Contudo, para testes mais precisos da ação destas drogas em fungos dimorficos, é necessário que estes testes sejam realizados em modelos experimentais da patologia, assim como, nas formas teciduais dos agentes que podem ser induzidas em laboratório pela utilização de meios de cultura sintéticos como o Butterfield acrescido de DL-Propanolol (ALVIANO *et al.*, 1992) ou de fator agregador plaquetário (ALVIANO *et al.*, 2003b), tendo estas células a ultraestrutura e a antigenicidade similares as células escleróticas teciduais (DA SILVA *et al.*, 2002c).

### 1.3. ECOEPIDEMIOLOGIA

A CBM é uma patologia cosmopolita, descrita nas Américas, Europa, Ásia, Austrália, Oceania e África, com maior prevalência em área tropicais e sub-tropicais de clima quente e úmido (MCGINNIS & HILGER, 1987). A República de Madagascar apresenta-se como área endêmica da patologia, com 1.323 casos relatados entre os anos de 1955 e 1995 (ESTERRE *et al.*, 1996a). As últimas descrições evidenciam a dispersão mundial da CBM, com casos registrados na Tunísia (EZZINE-SEBAI *et al.*, 2005), Tailândia (UNGPAKORN, 2005), Nepal (AGARWALLA *et al.*, 2002), México (BONIFAZ *et al.*, 2001), Jamaica (BANSAL A.S. & PRABHAKAR P., 1989), Ilhas Comoro (POIRRIEZ *et al.*, 2000), EUA (SEVIGNY & RAMOS-CARO, 2000) e Japão (KONDO *et al.*, 2005;TANUMA *et al.*, 2000) (Figura 03).

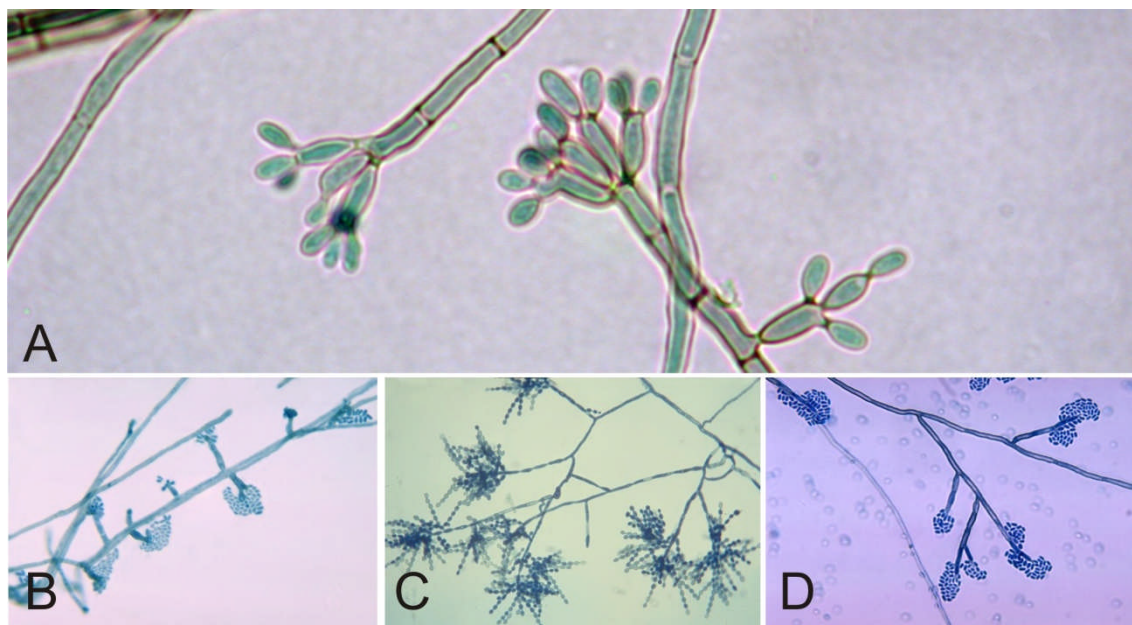


O Estado do Pará é a principal área endêmica do País com 325 casos registrados em 55 anos (SILVA *et al.*, 1998b). Recentemente entre os anos de 2001 e 2006, foram diagnosticados na Unidade de Referência e Treinamento em Dermatologia Sanitária “Dr. Marcello Candia” (URE Marcello Candia) mais de 80 novos casos de CBM (dados não publicados), ficando o estado do Rio Grande do Sul com a segunda maior prevalência nacional apresentando 100 casos registrados entre os anos de 1963 e 1998 (MINOTTO *et al.*, 2001).

O isolamento dos agentes da CBM de material ambiental é comum, ocorrendo a partir de material vegetal vivo (SALGADO *et al.*, 2004b), em decomposição ou diretamente do solo (GEZUELE *et al.*, 1972), sendo relatado por grande parte dos pacientes atendidos na URE Dr. Marcello Candia que o início da lesão ocorreu após traumatismo com este tipo de material, assim como ocorre com os coletores e quebradeiras dos babaçuais maranhenses (SILVA *et al.*, 1995) de onde já foi isolado e classificado o principal agente da CBM o fungo melânico *Fonsecaea pedrosoi* (MARQUES *et al.*, 2006), assim como já foi possível a observação das formas patológicas em cortes histológicos de tecidos vegetais de cactáceas (ZEPPELFELDT *et al.*, 1994b) assim levantamos a hipótese de que a forma infectante pode não ser a forma filamentosa e sim as próprias células escleróticas presentes em tecidos vivos de vegetais, ou a inoculação simultânea destas formas.

#### 1.4. AGENTES ETIOLÓGICOS

A CBM é causada por uma variedade de fungos melânicos, que são agrupados em quatro principais gêneros, a saber: *Cladophialophora*, *Phialophora*, *Exophiala* (BARBA-GOMEZ *et al.*, 1992) e *Fonsecaea*, sendo este considerado o principal agente (MCGINNIS, 1983; SILVA *et al.*, 1998b) (Figura 05). Em alguns casos, podemos encontrar ainda o gênero *Rhinochrysiella* (ARANGO *et al.*, 1998), sendo que todos estes apresentam ocorrências saprofíticas bem documentadas (RIOS-FABRA *et al.*, 1994).



**Figura 05: Principais agentes da CBM, A) *Fonsecaea pedrosoi*, B) *Phialophora verrucosa*, C) *Cladophialophora carrioni* e D) *Exophiala spinifera*. Fontes: A)Arquivo do Laboratório de Dermato-Imunologia; B,C e D) <http://www.medicalhealthcareinfo.com>**

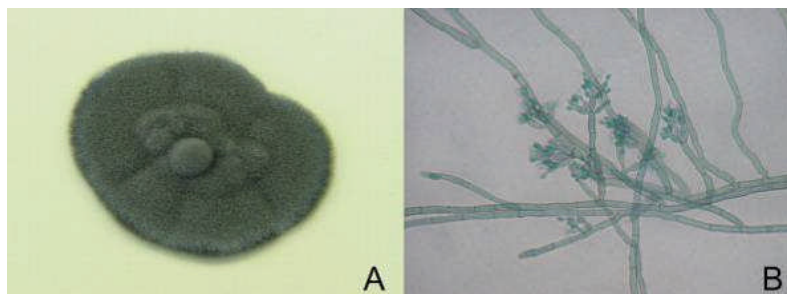
### 1.5. O PRINCIPAL AGENTE: *Fonsecaea pedrosoi*

Os agentes da CBM têm baixo poder patogênico e apresentam um dimorfismo que depende tanto do hospedeiro como da cepa inoculada (MATSUMOTO, 1984), contudo este mecanismo ainda não está esclarecido (WALTER *et al.*, 1982). O gênero *Fonsecaea* está inserido taxonomicamente na divisão Amastigomycota, classe Hyphomycetes, onde estão agrupadas espécies pertencentes a duas outras classes: Ascomycetos e Basidiomycetes que apresentam a parte sexuada do seu ciclo, muito rara, desconhecida ou mesmo inexistente, sendo então os Hyphomycetes uma classificação artificial que incorpora os estados anamórficos dos Ascomycetes e Basidiomycetes e inseridos na família Dematiaceae (DE HOOG *et al.*, 2000b).

A taxonomia do principal agente da CBM fica assim estabelecida: Reino Fungi, divisão Amastigomycota, Classe dos Hyphomycetes, Família Dematiaceae, Gênero *Fonsecaea* e aEspécie: *Fonsecaea pedrosoi*

A macroscopia da colônia de *F. pedrosoi* é aveludada de anverso escuro, indo do verde-oliva ao negro, e reverso também negro, apresentando uma conidiação do tipo holoblástica e simpodial, onde os conídios são formados com tempos

diferentes pelas células conidiogênicas e não rompem a parede destas para exteriorizarem-se, sendo essa conidiação conhecida como do tipo Cladosporium (Figura 06) (DE HOOG et al., 2001).



**Figura 06: Aspectos morfológicos de *F. pedrosoi*.** A) Macroscopia do anverso da cultura e B) Microcultivo revelando os conidióforos tipo cladosporium, com a conidiação simpodial. Fonte: Arquivo do Laboratório de Dermato-Imunologia.

## 1.6. INDUÇÃO *in vitro* DE CÉLULAS ESCLERÓTICAS

O processo de indução *in vitro* de células escleróticas dos agentes de CBM vem sendo estudado há quase cinquenta anos. Inicialmente, os estudos de Margarita Silva (1957) baseavam-se em trabalhos similares realizados com outros fungos, o que resultou na elaboração de um meio de cultura denominado “linfa sintética”, onde se obteve células esféricas articuladas em fragmentos de hifas similares a clamidósporos (MARGARITA SILVA, 1957). Posteriormente, Ibrain-Granet (1985) cultivou por 30 dias uma cepa de *F. pedrosoi* e obteve células arredondadas que, no entanto não apresentaram septação característica das escleróticas observadas *in vivo*, sendo então denominadas *yeast-like* (IBRAIN-GRANET O., 1985).

Mendoza (1993) obteve sucesso no processo de transformação das hifas e conídios em células escleróticas utilizando  $\text{Ca}^+$ , e propôs um meio quimicamente composto por: 3g de  $\text{NaNO}_3$ ; 1g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,5g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,01g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,265g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e 0,003g de Tiamina, contendo ainda 30g de glicose e pH ajustado para 2,5,. Resultado similar foi obtido também com a utilização de EGTA ( $2 \mu\text{mol}^{-1}$ ), e ambos os experimentos foram realizados com cultivos a  $25^\circ\text{C}$ , necessitando de aproximadamente 21 dias para a diferenciação (MENDOZA *et al.*, 1993a).

As formas teciduais de *F. pedrosoi* (células escleróticas ou células muriformes) são atualmente induzidas *in vitro* pela utilização do meio Butterfield pH



2,7, acrescido de DL-propranolol em uma concentração final de 800mM e cultivado sob agitação a 37°C por 45 dias, obtendo-se então as células escleróticas similares às observadas *in vivo* (ALVIANO *et al.*, 1992; DA SILVA *et al.*, 2002c). As células escleróticas também podem ser obtidas pela substituição do  $\beta$ -bloqueador (DL-Propranolol) pelo Fator Agregador de Plaquetas (PAF), em uma concentração final de  $10^{-6}$ M, no entanto, sem reduzir o tempo de indução ou os recursos técnicos exigidos (ALVIANO *et al.*, 2003b).

## 1.7. RESPOSTA IMUNE

### 1.7.1. TIPOS DE RESPOSTA IMUNE

Duas principais subdivisões compõem o sistema imunológico: a imunidade inata e a adaptativa (também conhecida como adquirida). O sistema imune inato é a primeira linha de defesa contra patógenos, e seus mecanismos incluem a fagocitose por macrófagos e granulócitos, o sistema complemento, quimiocinas, citocinas e a ação de células matadoras naturais (natural killer ou NK) (STEINMAN, 2007). A imunidade adaptativa está envolvida na eliminação do patógeno na fase tardia da infecção, bem como na geração de memória imunológica.

A ativação do sistema imune inato leva à captação de antígenos estranhos por células apresentadoras de antígenos (APC) profissionais, que podem migrar para órgãos linfoides secundários para apresentá-los aos linfócitos. Estes antígenos são processados em fragmentos menores chamados peptídeos e expostos na superfície de APC, ligados a moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), sendo então reconhecidos pelo receptor de célula T (TCR), representando o primeiro sinal para a ativação (ABBAS & JANEWAY, Jr., 2000).

No entanto, somente a apresentação do antígeno não é suficiente. Para estimular a resposta mediada por células T é necessário haver também a co-estimulação (HOWARD *et al.*, 2004), um segundo sinal que é fornecido por moléculas presentes na superfície celular, denominadas moléculas co-estimulatórias, que amplificam ou modulam os sinais provenientes dos receptores de células T (TCR)

(KROCZEK *et al.*, 2004). Portanto, ambos os sinais levam a expansão clonal e ao desenvolvimento de células T efectoras (ABBAS & JANEWAY, Jr., 2000).

Embora várias moléculas tenham demonstrado propriedade co-estimuladora, as mais potentes são restritas às APCs profissionais (KROCZEK *et al.*, 2004), sendo as mais importantes e bem caracterizadas as moléculas da família B7 (MARELLI-BERG *et al.*, 2007), como B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), que se ligam aos membros da família CD28 (GREENWALD *et al.*, 2005). As moléculas B7-1 e B7-2 apresentam especificidade para dois membros desta família: o receptor estimulador CD28 e o receptor CTLA-4, que inibe a resposta por célula T e regula a tolerância periférica por esta célula (GREENWALD *et al.*, 2005). CD40 é outra molécula que desempenha importante função co-estimulatória, e que apresenta como ligante o receptor CD40L (CD154), expresso principalmente em células T ativadas (GREWAL & FLAVELL, 1998).

Após ativação, as células T CD4<sup>+</sup> podem se diferenciar nos subtipos de Th1 ou Th2, distinguidas pelos tipos de genes de citocinas que elas expressam. Muitos fatores influenciam nessa diferenciação, incluindo a dose de antígeno, a natureza e o grau da co-estimulação, e as citocinas produzidas durante a diferenciação (FEILI-HARIRI *et al.*, 2005), como por exemplo, IL-12 e IL-4 que desempenham um papel dominante na diferenciação de células Th1 e Th2, respectivamente (O'GARRA & ARAI, 2000). A IL-12 é produzida por APCs e células fagocíticas, como monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (CDs), e atua principalmente em células T e NK, estimulando a proliferação, a produção de IFN- $\gamma$  e o aumento das atividades citotóxicas destas células (WATFORD *et al.*, 2003). Mastócitos e basófilos são os principais produtores de IL-4, citocina que além de promover a diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> em Th2, também determina a produção de classes específicas imunoglobulinas por células B (NELMS *et al.*, 1999)

### 1.7.2. CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENOS (APC)

Os macrófagos são as células da primeira linha de defesa do sistema imunológico, e atuam principalmente nos processos inflamatórios, infecciosos e no controle do surgimento de células tumorais (ZHANG & MOSSER, 2008). São células

fagocíticas que podem ser estimuladas ou inibidas pelo contato com diferentes agentes ou por citocinas produzidas por outras células (MA *et al.*, 2003a), efetuando a destruição e a eliminação de patógenos e células estranhas, além de atuar nos processos de reparo tecidual (HUME *et al.*, 2002). Suas funções de reconhecimento na imunidade inata são mediadas principalmente por receptores presentes em sua superfície, tal como receptores Fc, receptores de moléculas do sistema complemento, receptores tipo lectina e receptores toll-like (TLR), também ocorrendo o reconhecimento direto de carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos. Os diversos estímulos existentes podem gerar a produção de citocinas pró-inflamatórias, produção de óxido nítrico (NO) e seus derivados e o aumento da expressão de moléculas de co-estimulação, o que favorece sua função como apresentadora de antígenos (GORDON, 2003).

A ativação dos macrófagos também ocorre em resposta à produção de IFN- $\gamma$  pelas células T CD4<sup>+</sup> durante as respostas Th1, um processo chave na imunidade celular contra infecções com patógenos intracelulares. Além desta via de ativação, conhecida como via clássica, a ativação dos macrófagos também pode ocorrer pelas citocinas IL-4 e IL-13, resultando em macrófagos ativados que apresentam um fenótipo distinto, porém consistente com seu papel na imunidade humoral e reparo (GORDON, 2003). Portanto, estas células são críticas na defesa contra diversos tipos de infecções, apresentando uma variedade de mecanismos utilizados no reconhecimento e destruição de patógenos (RAVETCH & ADEREM, 2007). A ativação dos macrófagos é de fundamental importância, não somente na iniciação da resposta inflamatória, mas também na resolução desta resposta (ZHANG & MOSSER, 2008).

A interação entre fagócitos e fungos pode ser dividida em reconhecimento fúngico, fagocitose e destruição intracelular (NICOLA *et al.*, 2008). O reconhecimento de partículas fúngicas por macrófagos e neutrófilos geralmente leva a ativação de mecanismos de defesa imediatos, como a fagocitose e produção de reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio, bem como a produção de diversos sinais pró-inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-12) que ativam outros componentes da resposta imune (RAPPEYE & GOLDMAN, 2008). A importância da indução do recrutamento de monócitos e macrófagos para os sítios de infecção tem sido bastante estudada, especialmente com relação à formação de granulomas.

As micoses sistêmicas e subcutâneas produzem uma reação inflamatória granulomatosa, com recrutamento de células envolvidas na resposta inata para o sítio de infecção, principalmente neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), macrófagos e monócitos, que são os principais fagócitos que englobam e digerem fungos. Os PMNs ativados sintetizam quimiocinas e citocinas que recrutam e regulam a resposta inflamatória de outras células como os macrófagos, células T e outros neutrófilos inativos, fagocitando e destruindo o patógeno ou simplesmente criando uma cápsula de retenção para este organismo, formando um processo cicatricial fibrótico, muito comum em pacientes de CBM durante o tratamento.

Macrófagos são células fagocíticas que podem ser estimuladas ou inibidas pelo contato com diferentes agentes, assim como através da sua interação com as moléculas co-estimulatórias ou por citocinas produzidas por outras células (MA *et al.*, 2003b). O processo de fagocitose está intimamente relacionado aos fenômenos de adesão celular, onde ocorre uma série de alterações estruturais envolvendo a ativação e agrupamento de receptores de membrana para moléculas da matriz extracelular, como fibronectina, vitronectina e laminina. A ativação dos receptores desencadeia cascatas de sinalização intracelular, mediadas por tirosinoquinases, promovendo a reorganização de elementos do citoesqueleto, como microtúbulos e filamentos de actina, e a redistribuição de organelas citoplasmáticas, possibilitando o aumento da área de contato da membrana plasmática dos macrófagos com a superfície dos microorganismos a serem fagocitados. Além disso, o aumento da polimerização de filamentos de actina próximos à membrana plasmática acarreta a formação de projeções celulares e pseudópodos, que se estendem ao redor das partículas-alvo e promovem sua internalização (KLINGEMANN & DEDHAR, 1989)

## **1.8. RESPOSTA IMUNE NA CBM**

A imunopatogenese da CBM ainda é pouco estudada, no entanto, um trabalho recente correlacionou citocinas circulantes de pacientes (IL-10 e IFN- $\gamma$ ) e a proliferação linfocitária com as diferentes formas clínicas da doença, demonstrando a existência de uma polaridade. As formas clínicas mais exuberantes apresentavam altos índices de IL-10, baixos níveis de IFN- $\gamma$  e uma linfoproliferação ineficiente. Em

contraste, um quadro oposto foi observado nos pacientes com as formas mais brandas da patologia, apresentando níveis IL-10 diminuído, IFN- $\gamma$  aumentado e uma linfoproliferação eficiente (MAZO, V *et al.*, 2005). Estes resultados sugerem que a evolução clínica apresentada pelo paciente pode estar relacionada com o perfil de células T ativadas, levantando a possibilidade de que diferentes cepas de *F. pedrosoi* possam modular diferentemente o balanço da resposta imune do hospedeiro.

Outro recente estudo analisou a resposta de cepas do agente da CBM a antifúngicos, mostrando uma baixa correlação entre a susceptibilidade das cepas testadas com diferentes drogas e as respostas clínicas (ANDRADE *et al.*, 2004a). No entanto, o mesmo trabalho revelou uma importante diferença na susceptibilidade para as cepas fúngicas, o que corrobora a hipótese de diferentes níveis de infecção e virulência para as cepas do agente da CBM, desencadeando então uma resposta imune celular ou humoral.

A presença de anticorpos circulantes em pacientes de CBM foi relatada em um estudo, onde altos níveis de anticorpos específicos anti-*Fonsecaea pedrosoi* foram detectados no soro de pacientes, assim como anticorpos antineutrofílicos (ESTERRE *et al.*, 2000). A produção de anticorpos específicos já havia sido descrita em um trabalho prévio, que mostrou uma relevante proteção antigênica em moradores de áreas endêmicas de CBM no Estado de Falcon, na Venezuela (YEGRES, 1985). Entre os antígenos específicos já estudados de *F. pedrosoi* estão treze proteínas solúveis com pesos moleculares variando de 32 a 115 Kd, que são fracamente reconhecidas pelo soro de pacientes, mas são isoladas no anti-soro de coelhos, onde as IgGs destes animais, previamente desafiados com o extrato de protéico do fungo, apresentam entre 50 e 60% de reação positiva na inibição do crescimento fúngico (IBRAHIM-GRANET *et al.*, 1988), mostrando que há formação de anticorpos específicos contra o agentes.

Um dos alvos para estes anticorpos pode ser a DHN-melanina, um componente estrutural da parede celular (FRANZEN *et al.*, 2006), esta molécula influencia na resposta imune durante a infecção, sendo capaz de ativá-la por gerar anticorpos anti-melanina que podem ser isolados do soro de pacientes de cromomicose. A molécula de melanina isolada das formas filamentosas de *Fonsecaea pedrosoi* é capaz aumentar, em cultura, a associação entre as formas fúngicas e

neutrófilos humanos sugerindo que a presença da melanina pode estimular a capacidade fagocitária destas células (ALVIANO *et al.*, 2004b). Porém, esse aumento da capacidade fagocitária não é necessariamente efetivo na destruição do fungo, pois a fagocitose das formas fúngicas por macrófagos peritoneais de camundongos é eminentemente fungistático, e não fungicida (ROZENTAL *et al.*, 1994). No entanto, o bloqueio da via melanogênica pela utilização do triciclazol leva a um aumento da interação e fagocitose e destruição dos fungos por macrófagos peritoneais (CUNHA *et al.*, 2005c).

A capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c contra os diferentes agentes da CBM é maior para as cepas de *Fonsecaea pedrosoi* quando comparada as demais, como observado na viabilidade após a fagocitose desta espécie em relação a todas as demais, além da estimulação da produção de IL1- $\beta$  e IL-6. Estes resultados são condizentes com a menor estimulação da produção de radicais intermediários do estresse oxidativo, como o óxido nítrico (HAYAKAWA *et al.*, 2006).

O entendimento da imunopatogênica da cromomicose vem sendo construído, e para a melhor caracterização do papel dos linfócitos T durante este processo infeccioso, o grupo do departamento de análises clínicas da faculdade de farmácia da universidade de São Paulo utilizou camundongos deficientes em linfócitos CD4 e CD8, demonstrando que no processo infeccioso experimental por *Fonsecaea pedrosoi*, os clones CD4<sup>-</sup> desenvolvem uma apresentação clínica mais exacerbada do que em camundongos CD8<sup>-</sup> (TEIXEIRA DE SOUSA *et al.*, 2006).

Também já foi demonstrada a modulação da ativação de células de Langerhans isoladas e purificadas da epiderme de camundongos BALB/c pelas diferentes formas do fungo. Estas células, que são apresentadoras de antígeno profissionais, são capazes de fagocitar os conídios, mas não as células escleróticas, e esta fagocitose resulta em uma diminuição da expressão das moléculas co-estimulatórias CD40 e B7-2, demonstrando a inibição da função fisiológica destas células no processo de montagem da resposta imune no hospedeiro (DA SILVA *et al.*, 2007d).

Na CBM a clínica e a resposta ao tratamento são bastante variadas, o que dificulta a compreensão dos resultados obtidos com as diferentes terapias aplicadas

em diferentes grupos. Estas diferentes formas de tratar a patologia revelam o conhecimento escasso a respeito do processo inflamatório crônico observado na CBM, que é pouco estudado, principalmente em relação às moléculas responsáveis pela interação entre as células envolvidas na resposta imune celular. O entendimento das interações celulares é o ponto chave para a compreensão das imunopatogênia da doença, sendo os experimentos *in vitro* da modulação promovida pelas diferentes formas fúngicas para avaliação das alterações celulares, a produção de anticorpos e as principais moléculas de regulação e quimiotaxia envolvidas no processo, e desta forma, será possível entender a relação da evolução clínica com processo imunes pertinentes a esta patologia, de grande importância para o Brasil.

## 2. ARTIGOS PUBLICADOS

**JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Nov. 2008, p. 3839–3841**

### TITLE

Development of natural culture media for rapid induction of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells *in vitro*

### AUTHORS

Moises Batista da Silva<sup>1</sup>, Jorge Pereira da Silva<sup>1,2</sup>, Suellen Sirleide Pereira Yamano<sup>1</sup>, Ubirajara Imbiriba Salgado<sup>1,3</sup>, José Antonio Picanço Diniz<sup>4</sup> & Claudio Guedes Salgado<sup>1,5</sup>.

1-Laboratório de Dermato-Imunologia Universidade do Estado do Pará (UEPA), Universidade Federal do Pará (UFPA) and Unidade de Referência em Dermatologia Sanitária do Estado do Pará “Dr. Marcello Candia” (MC); 2-Departamento de Farmácia, UFPA; 3- Serviço de Dermatologia, UEPA; 4-Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Evandro Chagas; 5- Departamento de Patologia, UFPA.

### KEYWORDS

*Fonsecaea pedrosoi*, sclerotic cells, *Theobroma grandiflorum*, *Bactris gasipaes*, natural medium.

### CORRESPONDING AUTHOR

Claudio Guedes Salgado. Laboratório de Dermato-Imunologia UEPA/UFPA/MC. Av. João Paulo II, 113, Bairro Dom Aristides, 67200-000. Marituba, Pará, Brasil. Tel/Fax: (55)(91)3256-9097. E-mail: [csalgado@ufpa.br](mailto:csalgado@ufpa.br)

### Abstract

*Fonsecaea pedrosoi* is the main agent of chromoblastomycosis, a skin disease presenting verrucous lesions, in which round, thick-walled sclerotic cells are found. *In vitro* induction of sclerotic cells is time-consuming (20-45 days) and temperature-



dependent. We present two new natural media that reduce the sclerotic cell induction time to only 2 days.

### **Text**

Chromoblastomycosis is a subcutaneous mycosis with verrucous-nodular lesions, usually localized on the lower limbs of rural workers (SILVA *et al.*, 1998a), appearing after accidental inoculation with thorns presenting dematiaceous fungi, like *Fonsecaea pedrosoi* and *Cladophyalophora carrionii* (SALGADO *et al.*, 2004a; ZEPPELFELDT *et al.*, 1994a). Laboratory diagnosis is realized by direct microscopic examination of skin scrapings after 10% KOH treatment, in which round shaped, brownish fungal cells named sclerotic or muriform cells, characterized by a multi-septate division, are observed in small aggregates or isolated in the lesion (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2003).

The vast majority of *in vitro* work done with *F. pedrosoi*, including tests with drugs, uses only hyphae (CERMENO-VIVAS & TORRESRODRIGUEZ, 2001) or the conidia stage of the life cycle of the fungus, which, in contrast to sclerotic cells, are never found in the lesions. Initial attempts to produce sclerotic cells *in vitro* were made in 1957 using a “synthetic lymph medium” made with alcoholic extracts of hair and nails in which spherical bodies, articulated in hyphae fragments similar to chlamydospores, were obtained (SILVA, 1957). In 1985, *F. pedrosoi* strains cultured under constant shaking in Sabouraud medium, 2.5 pH, after 30 days produced round, *yeast-like* cells, with no septation (IBRAHIM-GRANET *et al.*, 1985). In 1993, a chemically defined medium, pH 2.5, 25°C, with  $0.1 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Ca}^{+2}$  or the calcium chelator, EGTA  $2 \text{ mmol l}^{-1}$ , induced sclerotic cells after 21 days of culture, under constant shaking (MENDOZA *et al.*, 1993b).

*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum. (cupuassu) is a native Amazonian tree, which has a slightly fibrous, yellowish mesocarp, containing potassium (34.3), phosphorus (15.7), magnesium (13.0 mg/100 g of fresh weight mesocarp), and amino acids (ROGEZ *et al.*, 2004). *Bactris gasipaes* Kunth (peach palm) is an American palm tree, containing potassium (289.3), calcium (24.7) and magnesium (17.6 mg/100 g mesocarp), and a fatty acid-rich composition, with oleic (46.3%), palmitic (38.2%) and palmitoleic (7.4%) acids (YUYAMA *et al.*, 2003).

Three different *F. pedrosoi* strains, obtained from skin scrapings, were used in this study. All samples presented the classic sclerotic cells (Fig. 1A, B), were isolated in mycosel (Beckton-Dickinson, USA), and perpetuated in Sabouraud agar (Merck, Germany). The media promoted formation of greenish-black colonies (Fig. 1C) which were analyzed by microculture (Fig. 1D) where dematiaceous hyphae with cylindrical, intercalary or terminal, loosely branched conidiophores with small conidia compatible with *F. pedrosoi* (DE HOOG *et al.*, 2000a) were observed.

*T. grandiflorum* and *B. gasipaes* fruits were washed in the laboratory; the mesocarp was separated from the seeds, diluted 1:3 with distilled and deionized water, homogenized using a shaker, and centrifuged at 4000 rpm for 5 min. The supernatant was collected and filtered through a 0.22 µm filter (Advantec, USA), the pH was adjusted to 2.7 with 1 M HCl, and the medium was autoclaved. The media and the process for obtaining them were registered with the Brazilian National Institute for Intellectual Property (INPI, patent pending, PI0520730-4).

Five fungal colonies of around 2-3cm each (Fig. 1C), cultured for 15 to 20 days in potato agar (Merck, Germany), were harvested, suspended in 10 ml of distilled and deionized water, homogenized in a vortex mixer for 30 seconds, and filtered by a nylon

membrane to separate hyphae from conidia. The conidia were collected and centrifuged at 4000 rpm for 5 min and the pellet resuspended to a final volume of 1 ml for counting using a Neubauer chamber. The induction of sclerotic cells from previously isolated conidia was performed in 24-well cell culture plates (TPP, Switzerland), at a concentration of  $10^3$  conidia/ml, with 20  $\mu\text{g/ml}$  of Gentamicin. For optical microscopy, Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM), sclerotic cells were prepared as previously described (DA SILVA *et al.*, 2007c).

More than 90% of conidia cultured for 48 h differentiated into sclerotic cells which were very similar to those found in lesional tissue, with a multi-septate division, a very thick wall, and a brownish color. After 15 days with no changes in the medium, there was differentiation from sclerotic cells towards hyphae. Where the medium had been changed before 15 days, there was no hyphal formation and it was possible to keep viable sclerotic cells for 15 more days and so on, which enlarge and septate, making small aggregates, with no individualization of sclerotic cells. The longest culture time was one year, indicating the long-lasting viability of these cells.

The sclerotic cells induced *in vitro* displayed the same characteristics of size, color and type of cellular division and multi-septation (Fig. 2A). An interesting characteristic of *F. pedrosoi* differentiation was observable for the first time: the conidia cellular wall breaks at one point and a new sclerotic cell is formed by the expansion of the cytoplasm which was previously contained by the conidia wall (Fig. 2B). Multi-septation can be well observed by both SEM and TEM (Fig. 2C and D). Besides the well-defined septation, TEM also made it possible to observe vesicles and electron dense granules near the thick cellular wall.

Present techniques available for inducing sclerotic cells from *F. pedrosoi* hyphae or conidia are based on the chemically defined Butterfield medium, which, following addition of 800 µM DL-Propranolol/L, 2.5 pH under constant shaking, can induce sclerotic cells after 45 days culture (ALVIANO *et al.*, 2003a).

Phytopathogenic fungi are common in the analyzed species, such as *Crinipellis pernicioso* the etiologic agent of witches' broom disease in *T. grandiflorum*, or *Mycospharella sp*, responsible for brown leaf spot in *B. gasipaes*. Also, the pathogenic forms of chromoblastomycosis are observed in plant tissues, as shown in histological specimens of cactus species *Ritterocereus griseus* and *R. deficiens* (ZEPPENFELDT *et al.*, 1994a), indicating that different plant species can be natural substrates for the growth of pathogenic fungi. Here, we report that plant species can be employed in an *in vitro* media to grow *F. pedrosoi*.

Using this natural media it was possible to reduce the induction time required for sclerotic cells from about 45 days to only 48 hours with no addition of other chemical components or the use of specific conditions of temperature or shaking. SEM and TEM enabled us to evaluate the morphological similarity between our *in vitro* generated sclerotic cells and those of others (DA SILVA *et al.*, 2002b; HARADA & KUSUNOKI, 1983) or between *in vitro* generated and lesional sclerotic cells. The main similarities are size, multi-septation, and the formation of a thick and pigmented cellular wall. Additionally, the vesicles observed inside the sclerotic cell cytoplasm by TEM are consistent with previous findings (DA SILVA *et al.*, 2002a).

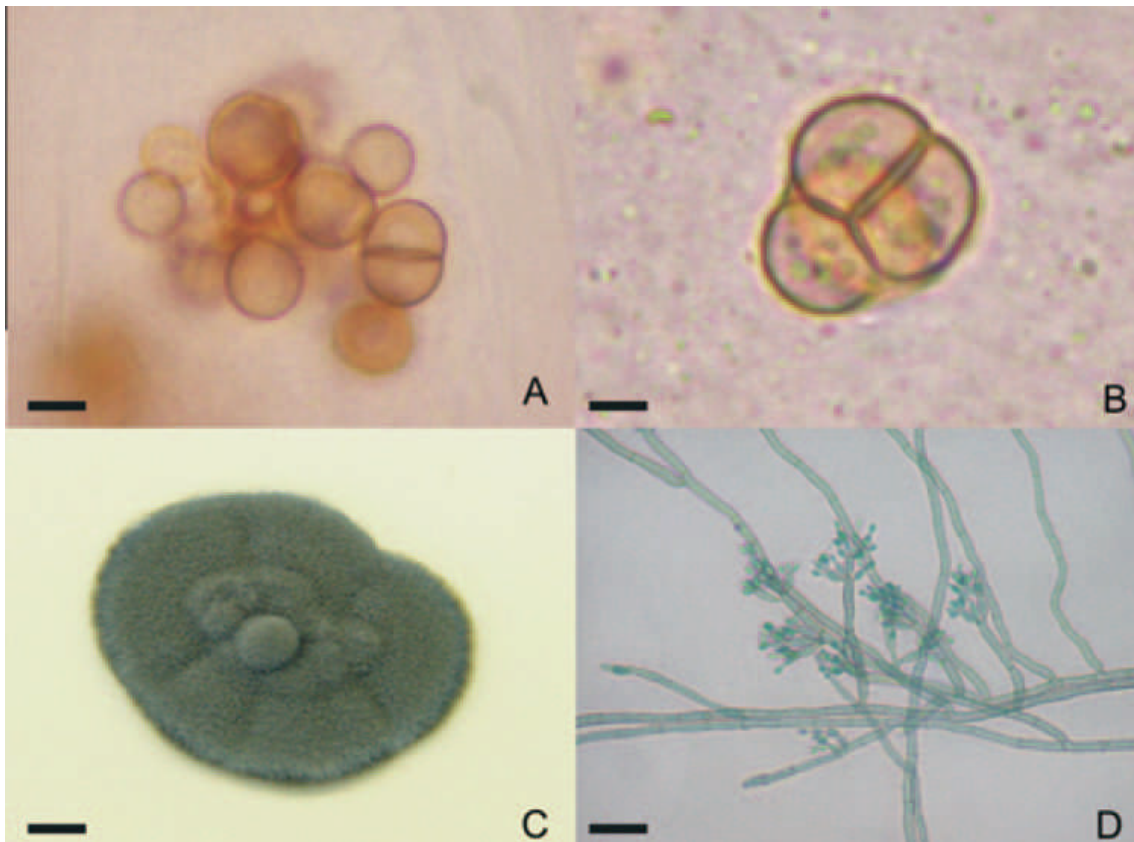
The new culture medium presented here significantly reduces the time necessary for induction of sclerotic cells, making labor intensive conditions such as constant shaking or controlled temperature unnecessary, and opens up new possibilities for

studying *F. pedrosoi* pathogenic forms *in vitro* using a simple and economical technique.

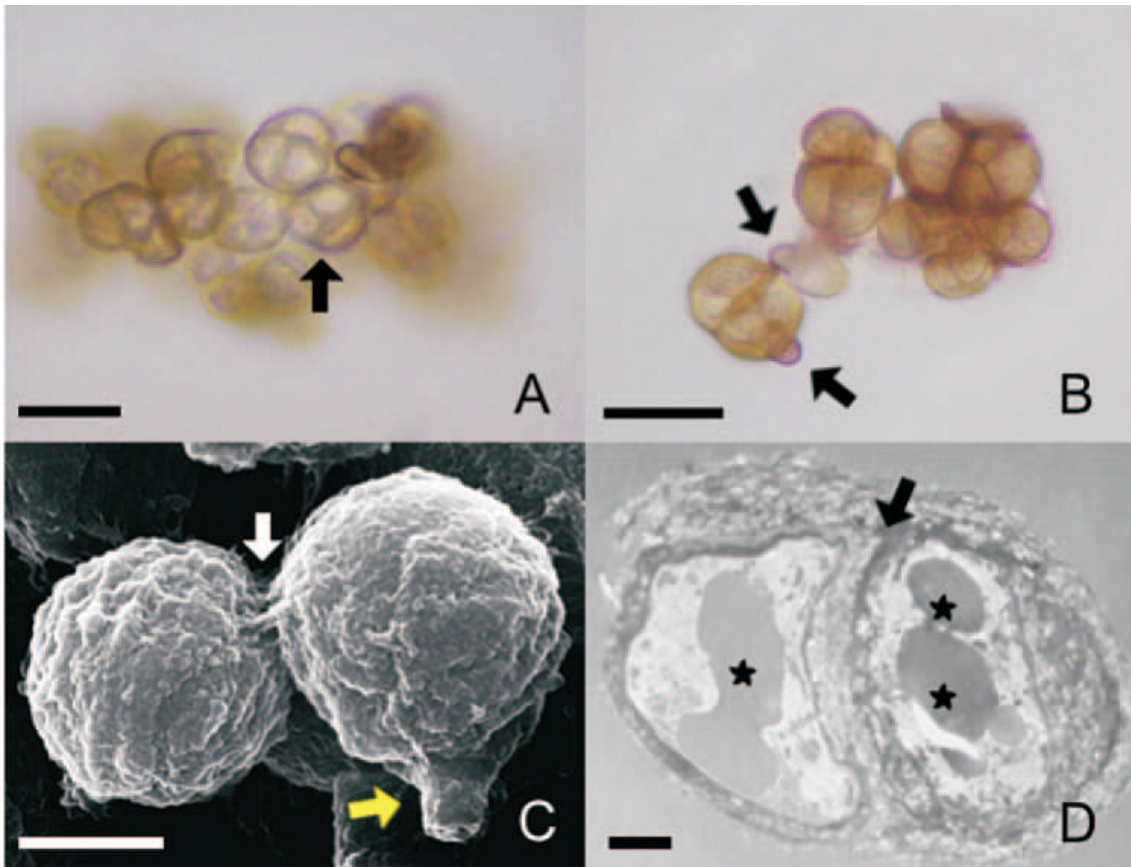
### **Acknowledgments**

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA), by Programa de Apoio à Pesquisa da Universidade do Estado do Pará, by Secretaria Executiva de Saúde Pública (SESPA), by Secretaria de Vigilância Epidemiológica/MS-Instituto Evandro Chagas, by Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Ministério da Saúde do Brasil and by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## FIGURE LEGENDS



**Figure 1.** *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells were obtained after chromoblastomycosis lesion scrapings, and originated hyphae and conidia after *in vitro* culture. Skin scrapings were collected and analyzed after 20% KOH clarification, revealing well-defined, septated, sclerotic cells (A, B). Greenish-black colonies grew from culture of this material on Mycosel (C), and characteristic dematiaceous hyphae originating cylindrical terminal conidiphores with small subhyaline conidia were observed upon microculture (D). Bars: A: 4  $\mu\text{m}$ ; B: 3  $\mu\text{m}$ ; C: 0.5 cm; D: 10  $\mu\text{m}$ .



**Figure 2. Morphologic characteristics of sclerotic cells induced in each natural media are similar.** Sclerotic cells obtained after conidia culture in *Theobroma grandiflorum* or *Bactris gasipaes* natural media were analyzed by optical microscopy with no special staining, where brownish, multisepated cells (A, arrow) were evident, and remnant conidia were observed adhered to the new formed sclerotic cells (B, arrows). Scanning electron microscopy of sclerotic cells aggregates demonstrates septated division (C, white arrow) and also remnant conidia (C, yellow arrow). Transmission electron microscopy of a sclerotic cell (D) shows typical thick-walled septation (arrow) and vesicles containing electron dense material (asterisk). Data are representative of one in three independent experiments, which were performed in triplicate. Bars: A, B: 10  $\mu\text{m}$ ; C: 5  $\mu\text{m}$ ; D: 1  $\mu\text{m}$  .

## REFERENCES

1. **Alviano, D. S., L. F. Kneipp, A. H. Lopes, L. R. Travassos, J. R. Meyer-Fernandes, M. L. Rodrigues, and C. S. Alviano.** 2003. Differentiation of *Fonsecaea pedrosoi* mycelial forms into sclerotic cells is induced by platelet-activating factor. Res.Microbiol. **154**:689-695.
2. **Cermeno-Vivas, J. R. and J. M. Torresrodriguez.** 2001. *In vitro* susceptibility of dematiaceous fungi to ten antifungal drugs using an agar diffusion test. Rev.Iberoam.Micol. **18**:113-117.
3. **da Silva, J. P., D. S. Alviano, C. S. Alviano, W. de Souza, L. R. Travassos, J. A. Diniz, and S. Rozental.** 2002. Comparison of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells obtained in vivo and in vitro: ultrastructure and antigenicity. FEMS Immunol.Med.Microbiol. **33**:63-69.
4. **da Silva, J. P., M. B. da Silva, U. I. Salgado, J. A. Diniz, S. Rozental, and C. G. Salgado.** 2007. Phagocytosis of *Fonsecaea pedrosoi* conidia, but not sclerotic cells caused by Langerhans cells, inhibits CD40 and B7-2 expression. FEMS Immunol.Med.Microbiol. **50**:104-111.
5. **De Hoog, G. S., J. Guarro, J. Gené, and M. J. Figueras.** 2000. Atlas of Clinical Fungi, p. 1-1126. Centraalbureau voor Schimmelcultures and University Rovira i Virgili, Utrech and Reus.



6. **Harada, S. and T. Kusunoki.** 1983. Scanning electron microscopic observation of the parasitic forms of *Fonsecaea pedrosoi* in a human skin lesion. *Mycopathologia* **82**:33-37.
7. **Ibrahim-Granet, O., C. de Bievre, F. Romain, and S. Letoffe.** 1985. Comparative electrophoresis, isoelectric focusing and numerical taxonomy of some isolates of *Fonsecaea pedrosoi* and allied fungi. *Sabouraudia*. **23**:253-264.
8. **Mendoza, L., S. M. Karuppayil, and P. J. Szanislo.** 1993. Calcium regulates in vitro dimorphism in chromoblastomycotic fungi. *Mycoses* **36**:157-164.
9. **Queiroz-Telles, F., M. R. McGinnis, I. Salkin, and J. R. Graybill.** 2003. Subcutaneous mycoses. *Infect.Dis.Clin.North Am.* **17**:59-85, viii.
10. **Rogez, H., R. Buxant, E. Mignolet, J. N. S. Souza, E. M. Silva, and Y. Larondelle.** 2004. Chemical composition of the pulp of three typical Amazonian fruits: araca-boi (*Eugenia stipitata*), bacuri (*Platonia insignis*) and cupuacu (*Theobroma grandiflorum*). *European Food Research and Technology* **218**:380-384.
11. **Salgado, C. G., J. P. da Silva, J. A. Diniz, M. B. da Silva, P. F. da Costa, C. Teixeira, and U. I. Salgado.** 2004. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo* **46**:33-36.

12. **Silva, J. P., W. de Souza, and S. Rozental.** 1998. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil). *Mycopathologia* **143**:171-175.
13. **Silva, M.** 1957. The Parasitic phase of the fungi os chromoblastomycosis: Development of sclerotic cells in vitro and in vivo. *Mycologia* **49**:318-331.
14. **Yuyama, L. K. O., J. P. L. Aguiar, K. Yuyama, C. R. Clement, S. H. M. Macedo, D. I. T. Favaro, C. Afonso, M. B. A. Vasconcellos, S. A. Pimentel, E. S. G. Badolato, and H. Vannucchi.** 2003. Chemical composition of the fruit mesocarp of three peach palm (*Bactris gasipaes*) populations grown in Central Amazonia, Brazil. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **54**:49-56.
15. **Zeppenfeldt, G., N. Richard-Yegres, and F. Yegres.** 1994. *Cladosporium carrionii*: hongo dimórfico en cactáceas de la zona endémica para la cromomicosis en Venezuela. *Rev.Iberoam.Micol.* **11**:61-63.

**HUMAN PATHOLOGY, artigo submetido.**

**TITLE**

Histopathologic evaluation and immunological patterns of chromoblastomycosis patients treated for one year with Itraconazole.

**Autors**

*Moises Silva<sup>a</sup>, Bruno B Andrade<sup>b</sup>, Simone Campelo<sup>a</sup>, José SC Andrade<sup>b</sup>, Suellen Yamano<sup>a</sup>, Jorge Silva<sup>a, c</sup>, Eduardo Ramos<sup>b</sup>, Aldina Barral<sup>b</sup>, Manoel Barral-Neto<sup>b</sup> and Claudio Salgado<sup>a, d</sup>*

<sup>a</sup> Laboratório de Dermato-Imunologia UEPA/UFPA/MC

<sup>b</sup> Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

<sup>c</sup> Instituto de Farmácia da Universidade Federal do Pará

<sup>d</sup> Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará

**Keywords**

Chromoblastomycosis, granuloma, immunity, treatment.

**Contact**

Claudio Guedes Salgado. Laboratório de Dermato-Imunologia UEPA/UFPA/MC. Av. João Paulo II, 113, Bairro Dom Aristides, 67200-000. Marituba, Pará, Brasil. Tel/Fax: (55)(91)3256-9097. E-mail: [csalgado@ufpa.br](mailto:csalgado@ufpa.br)

## **Abstract**

Chromoblastomycosis (CBM) is a chronic fungal disease which affects the skin. Its pathogenesis is poorly studied and the most efficient treatment is not clearly defined. CBM is characterized by the slow development of polymorphic skin lesions, with a granulomatous inflammatory process, but the host defense mechanism in this disease has not been extensively investigated. The objective of the study was to evaluate the histopathology and immunological patterns of CBM over a one year period of treatment with Itraconazole. Biopsies from 10 patients, with a clinical diagnosis of CBM were stained for mycologic evaluation by microscopy and for cellular immunophenotyping analysis of the inflammatory infiltrate using CD20, CD8 and CD68 antibodies. Serum samples were collected and the TNF- $\alpha$ , IL-4 and IL-10 levels were quantified by ELISA. A complete disappearance of the lesions was not achieved, but there was a significant decrease in the inflammatory and infiltrative process during the treatment with 200mg/day of Itraconazole. There were also decreases in the histopathologic features of degeneration, which diminished after three and six months of treatment, while the number of fungi had significant differences only after 12 months of treatment. Immunophenotyping showed macrophages localized mainly at central areas and TCD8+ cells in the periphery. TCD20+ cells, which were found throughout the tissues, had a significant increase after six months of treatment and returned to initial levels after one year. Macrophages and cytotoxic lymphocytes were both increased all over the period evaluated. Serum IL-10 showed no significant changes during treatment, while IL-4 and TNF- $\alpha$  had increased. The IL-4 increase noticed at the end point may be related to tissue fibrosis and also to the low cure rates observed after a 12 month period of treatment.

## Introduction

Chromoblastomycosis (CBM) is a human chronic fungal disease acquired by traumatic inoculation of a variety of agents (RUBIN *et al.*, 1991), in particular, *Fonsecaea pedrosoi*. The highest prevalence is found in the tropical and sub-tropical regions of the African and South American continents (MCGINNIS & HILGER, 1987).

Approximately five hundred cases have been recorded in nine states in Brazil. The state of Pará in the Amazonic region has more than three hundred cases and is classified as the main endemic area (SILVA *et al.*, 1998).

CBM cutaneous-subcutaneous disease, typically affecting a lower extremity, with a slow evolution, but not affecting deep organs and bones (FADER & MCGINNIS, 1988).

It is characterized by a slow development of polymorphic skin lesions, composed by erythematous papules which enlarge and display varying morphologies (nodules, verrucas and plaques) (Bonifaz *et al* 2001).

Little is known about the host response against agents that cause CBM, but it has been suggested that the cellular immune response is the main effector in the course of this infection (AHRENS *et al.*, 1989). Some studies have shown a predominant cell-mediated immune response, with activated macrophages involved in fungal phagocytosis and have described a bipolar Th1/Th2 spectral pattern of immune response (d'AVILA *et al.*, 2003). The most severe clinical forms of the disease are associated with high levels of IL-10, low levels of IFN- $\gamma$  and inefficient lymphproliferation, when compared to patients with the less severe forms of the disease. T cells from these individuals fail to proliferate *in vitro* after induction with CBM antigen (chromoAg), possibly indicating that T cells secreting IFN- $\gamma$  are required to

induce protective immunity against *F. pedrosoi* (MAZO, V *et al.*, 2005). Moreover, monocytes purified from patients with the severe form of CBM express lower levels of HLA-DR and costimulatory molecules than those purified from patients with the mild form (SOUSA, MG *et al.* 2008).

Treatment options in CBM include oral antifungals, surgical excision of small lesions with cryosurgery (CASTRO *et al.*, 2003) or topical heat therapy with a carbon dioxide laser (HIRA *et al.*, 2002), but a standard procedure is still not available. Therapeutic schemes with the use of antifungal chemotherapy such as terbinafine daily may also be effective (ESTERRE *et al.*, 1996b). Several authors indicate itraconazole as the best choice of therapy (QUEIROZ-TELLES 1992), which is a synthetic triazolic derivative with a great antifungal spectrum. It inhibits the synthesis of ergosterol and increases cell membrane permeability. Itraconazole is effective in the treatment of CBM and may be used with or without flucytosine (DE HOOG *et al.*, 2000b) in daily pulse therapy for 7 days per month (UNGPAKORN & REANGCHAINAM, 2006) or in combination with liquid nitrogen (BONIFAZ *et al.*, 1997). Finally, posaconazole, which is a derivative of itraconazole, has also been used in treatment of invasive CBM in adults who are refractory or intolerant to other antifungal agents (PAUGAM, 2007).

One of the most characteristic features of CBM is its refractoriness to treatment. There is a high rate of recurrence and the most common complications are ulceration, secondary infection and lymphedema. There is also a potential association with the growth of epidermoid carcinoma in the affected areas. Antifungal therapy is associated to adverse side effects such as hepatic and heart toxicity, electrolyte disorders and drug interactions (WALSH TJ *et al.*, 2002). New treatment options for CBM are necessary, and multidrug therapy seems to be a possible approach.

There are few studies analyzing the immune response against CBM agents over the time, and the possible alterations caused by antifungal therapy. In this study we wanted to evaluate the histopathology and immunological patterns of patients with CBM treated for one year with Itraconazole. We also compared the immune response and therapy efficacy between the different CBM agent strains.

## 1. Material and Methods

### a. Patients

A total of 10 male patients (age range between 32 and 71 years) seen in the Specialized Reference Unit in Marituba-Pará-Brazil with a clinical diagnosis of CBM were included in this study after providing informed written consent. All cases showed verrucous lesions, and diagnosis was confirmed by direct mycologic examination (clarification with KOH 20%), culture (on plates containing Sabouraud with chloramphenicol and cycloheximide), and histopathology. The patients were treated with itraconazole (200mg/day) for twelve months.

### b. Microscopic analysis

Tissue sections were obtained by punch biopsy before treatment, and 3, 6 and 12 months thereafter. The specimens were fixed in 10% buffered-formalin, embedded in paraffin, sectioned at 4 $\mu$ m, and stained with Hematoxilin-Eosin, Grocott, Fite-Faraco, and Pifig. The following parameters were evaluated: fibrosis, keratosis, parakeratosis, granulomas and fungal count. Estimates of the different cell subsets in each biopsy were obtained by counting cells in ten high power fields ( $\times$ 400) from the area with the

highest density of inflammatory infiltrate (ESTERRE *et al.*, 1993). These characteristics were graded from 0 to 3 (UNGPAKORN & REANGCHAINAM, 2006).

c. Immunohistochemical analysis

Cellular immunophenotype analysis was performed on the same samples used for histopathologic serial biopsies, which are four for each patient, totalizing 40 samples. The tissue sections were placed on sinalized glass slides, deparafinized, dehydrated, and incubated in citrate solution (1x concentrade) for 30 minutes at 98°C. The endogenous peroxidase activity was blocked (10 min), protein blocking was performed (5 min), and slides were incubated with the specific primary CD20, CD8, and CD68 antibodies (4°C over-night) and then incubated with HRP polymer (30 min T.A.), and DAB (5 min T.A.). The number of positive cells was obtained by counting 10 high power fields (×400) in the area with the highest density of the inflammatory infiltrate (ESTERRE *et al.*, 1993). These characteristics are graded from 0 to 3 (UNGPAKORN & REANGCHAINAM, 2006)

d. Serum cytokine levels

Serum levels of IL4, IL10 and TNF were determined by ELISA using commercial kits [BD Biosciences 555194, 555157 and 555212] according to the manufacturer's instructions. The reproducibility of the data was monitored by including one control serum sample and a standard curve of serial dilutions of each cytokine on each ELISA plate.



## 2. Results

The characteristics of patients in the study shows 80% of lesions in inferior members and confirms the chronic development of disease, with a 15 years media of evolution and 14 cm media of verrucous lesions size (**Table 1**). The histopathologic analysis of biopsies before treatment evidenced a chronic granulomatous process with a neutrophilic inflammatory infiltrate and mildly isolated and confluent granulomas (**Figure 1A**). There was also observed abundant keratosis, parakeratosis and fibrosis (**Figure 1C-E**). Giant Langerhans cells (**Figure 1B**) were frequently found with fagocitated sclerotic cells in the cytoplasm.

Thereafter, three months of treatment with Itraconazole at 200mg/day resulted in decreases of parakeratosis and keratosis (**Figure 2**). In contrast, the hiperkeratosis and granuloma count decreased only after the sixtieth month of therapy. Nevertheless, the extent of fibrosis was higher in the third month and returned to initial levels. There was a significant difference in fungi count only after the twelfth month of treatment. The immunophenotype analysis demonstrated a defined localization of cell types in the granuloma, where macrophages (CD68<sup>+</sup>) (**Figure 3C and 3F**) occupied central areas, cytotoxic lymphocytes (TCD8<sup>+</sup>) (**Figure 3A and 3D**) were on the peripheral areas of the granuloma, and B lymphocytes (CD20<sup>+</sup>) (**Figure 3B and 3E**) were disseminated without a particular localization. The same cell distribution was observed over the time, but there were changes in the cell density, with significant increases in cytotoxic lymphocytes and B lymphocytes after six months of treatment (**Figure 4**). The B lymphocytes quantification showed a return to the initial levels after one year of

treatment, whereas macrophages were increased and cytotoxic lymphocytes continued to increase (**Figure 4**).

The quantification of circulating IL-10 did not significantly modified before and after treatment (**Figure 5A**). However, interleukin 4 (IL-4) showed significant increases since the third month and maintained this growth tendency until the last month (**Figure 5B**).

The TNF levels were initially higher compared to control patients, but after the twelfth month of treatment, TNF levels had significantly increased close to four folds (**Figure 5C**).

The treatment regimen was associated with evident cicatrization and involution of nodules and plaques, although cure was not achieved, as noted by the presence of remaining active lesions (**Figure 6C**). Using oral Itraconazole at 200mg/day was non-toxic and showed excellent results in CBM patients, without important alterations in plasma levels of AST and ALT enzymes during the follow-up. Increases in AST and ALT were not superior than three times of the reference values (data not shown). Only one case out of ten failed to respond to the scheme utilized.

## Discussion

CBM usually initiate as erythematous papules, which gradually enlarge to display polymorphic morphology such as verrucous nodules, cauliflower-like tumors and psoriasis-like plaques (ROZENTAL, 2007). The infection assumes a chronic course in the cutaneous and sub-cutaneous tissues, and systemic invasion is very rare. The unique aspect of the lesions and the local epidemiology are part of the clinical suspect, and the laboratory diagnosis is easily accomplished because the sclerotic bodies can be identified by direct examination and histological study of the crusts and exudates of the lesions (ROZENTAL, 2007).

We applied a therapeutic scheme with oral Itraconazole and evaluated the immunopathological features of the treatment evolutionally. Itraconazole 200mg/day for one year was associated with a regression of lesions without significant alterations in hepatic profile. There is also an increase in the recruitment of TCD8<sup>+</sup> and TCD20<sup>+</sup> cells and a significant increase of the anti-inflammatory cytokine IL4, and an increase in TNF concentration on the twelfth month of treatment. Macrophages are an important phagocytic population, presenting functions which include fungistatic and fungicidal activities, cytokine and chemokine production, and antigen presentation (ALVIANO, D. S. 2004). Macrophages are broadly important in the tissues, and they express high levels of mannose and  $\beta$ -glucan receptors (GORDON & HUGHES, 1997). The fungal cell wall polysaccharide has been identified as a possible target for the induction of protective antibodies (TOROSANTUCCI *et al.*, 2005) as well as other common components of the fungal cell wall-like DHN-melanin in *Fonsecaea pedrosoi*, a pigment related to virulence in pathogenic fungi (CUNHA *et al.*, 2005c). Macrophages play the most important role in the cellular immune response by controlling fungal growth. Macrophages are also an abundant cellular type in granulomatous processes, which is in conformation with our results demonstrating a high CD68<sup>+</sup> cell staining in CBM. Macrophages have a central position in granuloma formation (**Figure 3C**), and they are often aggregated and form giant cells (**Figures 1B and 3F**). Some studies have focused on fungus–host interactions and have shown less fungicidal power of these isolated cells, possibly leading to infection maintenance (HAYAKAWA *et al.*, 2006; ROZENTAL *et al.*, 1994). However, this effect may be explained by fungi depigmentation influence on the macrophages (CUNHA *et al.*, 2005c).

The frequent observation of giant cells in the chronic inflammatory response present in CBM may be explained by fungal persistence caused by an inefficient immune response, not capable of destroying these agents (HAYAKAWA *et al.*, 2006). The process of giant cell formation by macrophages-monocytes is stimulated by IL-4 (MCNALLY & ANDERSON, 1995). IL-4 has anti-inflammatory effects and a possible role in repair and tissue modeling processes, but several authors have proposed that alternatively activated macrophages might contribute to a range of inflammatory and non-inflammatory immune response in some diseases. IL-4 can be a potent stimulator of antibody production by CD20<sup>+</sup> cells, besides their other effects on macrophage alternative activation (GORDON, 2003). Other studies with sera from individuals with CBM indicate the presence of anti-melanin antibodies. (ALVIANO *et al.*, 2004b;BUCKLEY & MURRAY, 1966;VIDAL *et al.*, 2003b;VILLALBA & YEGRES, 1988). The increase in CD20<sup>+</sup> cells in inflammation regions described in our results from immunohistochemistry after the sixth month of treatment may be connected with the antibody production against *Fonsecaea pedrosoi* or melanin. *In vitro* studies with mice macrophages co-cultured with conidia agents of CBM show the presence of melanin granules in the cytosol of these cells (FARBIARZ *et al.*, 1990). This suggests an antigen processing activity and possibly a role of these cells in antigen presentation, although further studies are necessary to prove this hypothesis. A previous study, analysing chemokines in inflammatory infiltrates of CBM, has characterized the chemokine MIP-1 $\alpha$  as having a role in macrophage tissue infiltration. There is probably a multifactorial interaction of chemokines, tissue elements and factors released by the parasite killing, that together contribute to cell infiltration, maintenance and function within the granuloma. IL-4 is known to stimulate macrophage fusion to promote giant cells

development (Helming, 2007). Th2 cytokines, such as IL-4, are related to tissue damage reduction in exuberant and destructive inflammatory responses (CUTLER *et al.*, 2007). In our study, serum IL-4 increase was observed in agreement with regression of parakeratosis, keratosis, hiperkeratosis and granuloma count in histopathologic samples. These changes are also congruent with the clinical regression of lesions. In contrast, there is some data suggesting that IL-4 is related to susceptibility and fungi persistence in the tissues, leading to impairment of the cure and cicatrization processes (Vultaggio, 2007). In our results, a complete resolution of the infection was not observed, what is possibly related to the high concentrations of IL-4. Further studies are necessary to evaluate the role of IL-4 in CBM and other fungal diseases. Our data show that there are quantitative changes in the cell populations over the treatment in CBM. The change in the cell profile may be caused by the functional action of itraconazole to promote lysis of fungi cells, which is capable to induce a cellular immune response. Macrophages are also stimulated to present antigens of *Fonsecaea pedrosoi* to CD20<sup>+</sup> lymphocytes and to attract CD8<sup>+</sup> cells and new macrophages. High levels of circulating TNF and IL-4 may contribute to clinical involution of lesions, but also to low cure rates.

### 3. Conclusion

These data provide new information about the imunopathology of CBM, including the association of regression of cellular infiltrates with an increase in circulating levels of IL4 and TNF in CBM patients being treated with low doses of itraconazole. This is the first description to our knowledge of the clinical and histopathological aspects of CBM during treatment. We also observed numeric changes in the cell profile in the

granulomatous process, with recruitment of T and B lymphocytes and macrophages. In this manner, Itraconazole is functional and applicable in the treatment of CBM and promotes macroscopic, histological and immunologic alterations in the course of the disease.

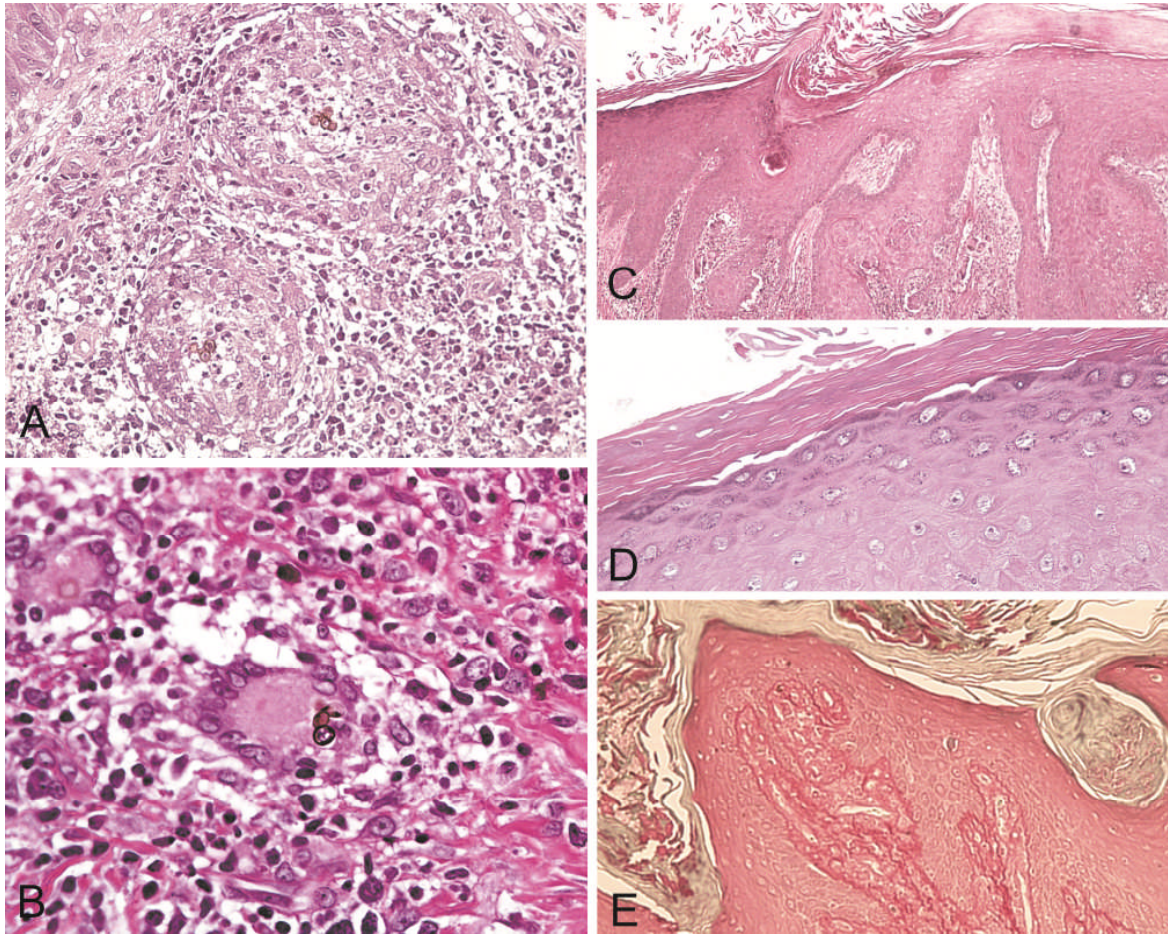
#### 4. Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA), by Secretaria Executiva de Saúde Pública (SESPA), by Conselho Nacional de Pesquisa (CNPQ), by Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Ministério da Saúde do Brasil and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

**Table 1.** Patient characterization

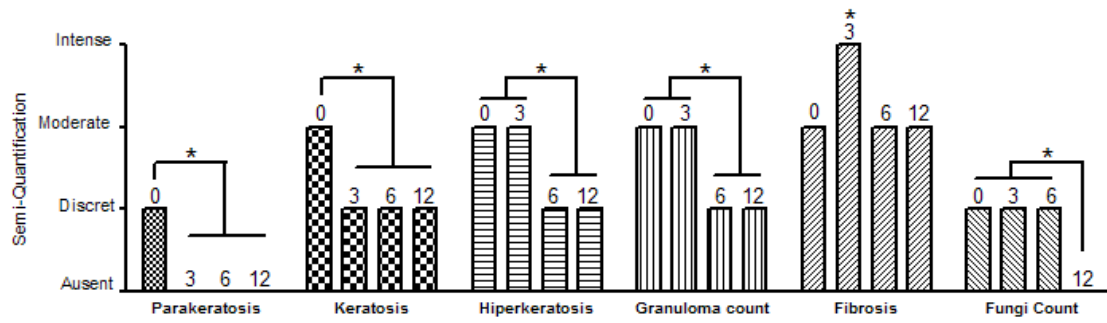
<b>Patient Number</b>	<b>Age (years)</b>	<b>Occupation</b>	<b>Time of disease (years)<sup>a</sup></b>	<b>Lesion extension (cm)<sup>a</sup></b>	<b>Lesion localization</b>
#1	32	Farmer	1,5	ND	Left ankle posterior face
#2	33	Farmer	8	10	Right ankle
#3	49	Farmer	10	20	Left elbow
#4	55	Farmer	20	4	Left calf posterior face
#5	56	Retired	25	2,5	Left ankle
#6	56	Farmer	12	ND	Left lower limb
#7	57	Farmer	15	15	Left knee
#8	66	Farmer	ND	15	Right knee
#9	69	Retired	30	30	Right arm and Right forearm
#10	71	Retired	10	ND	Right thigh

<sup>a</sup> Not determined

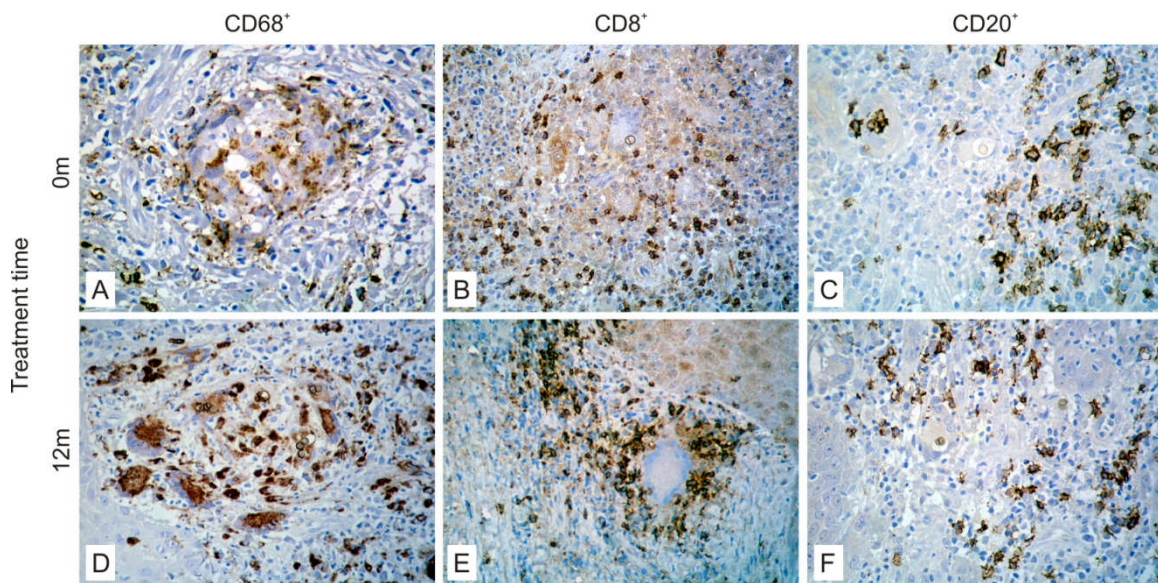


**Figure 01.** Histopathologic characterization before treatment, with neutrophilic inflammatory infiltrate on the chronic granulomatous process, which shows: **(A)** isolated and confluent granulomas, **(B)** giant Langerhans cells with sclerotic cell inclusions, **(C)** Keratosis, **(D)** Parakeratosis and **(E)** Fibrosis.

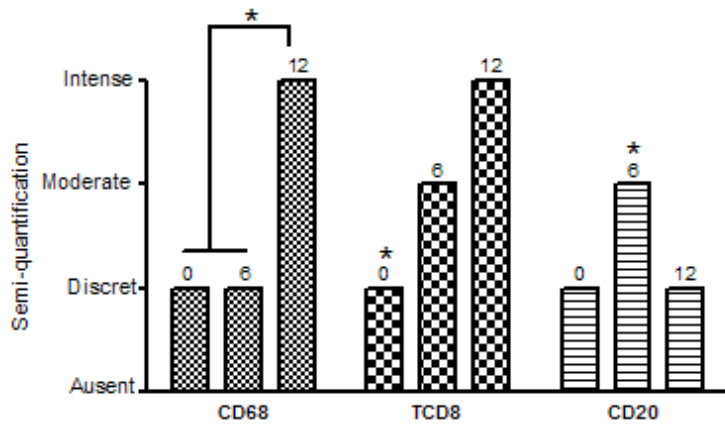




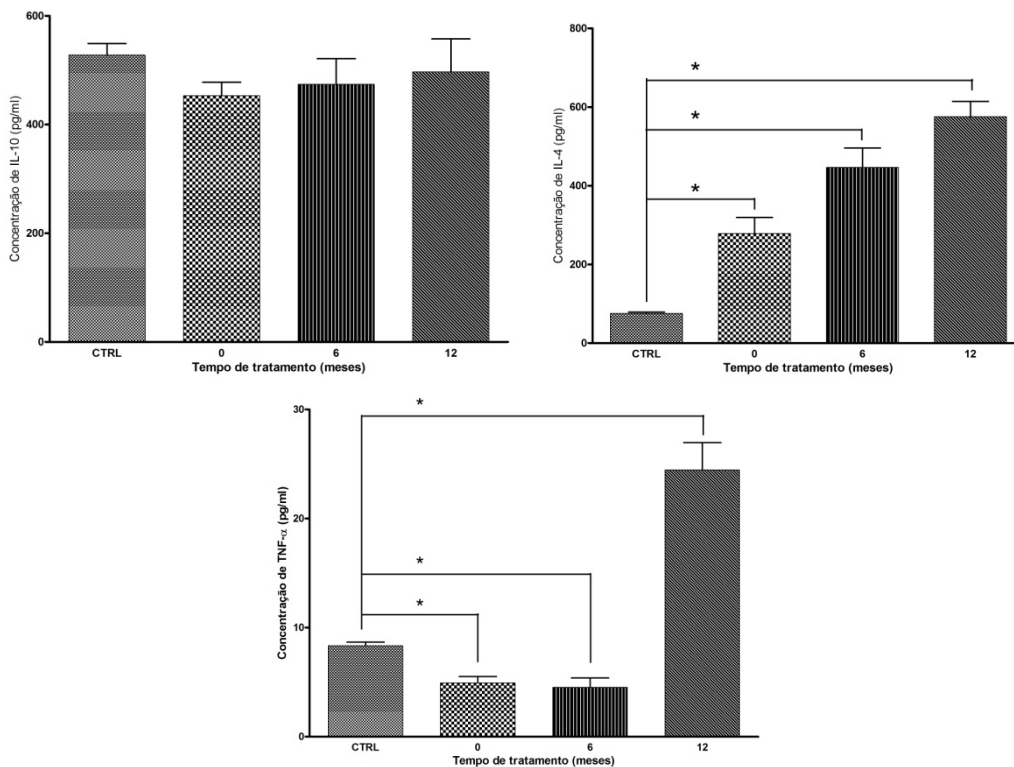
**Figure 2:** Semi-quantitative analysis of histological degeneration evaluation over time following treatment with low dose itraconazole at 200mg/day for CBM. A significant reduction of parakeratosis, keratosis, hiperkeratosis, granuloma and fungi count during is observed.



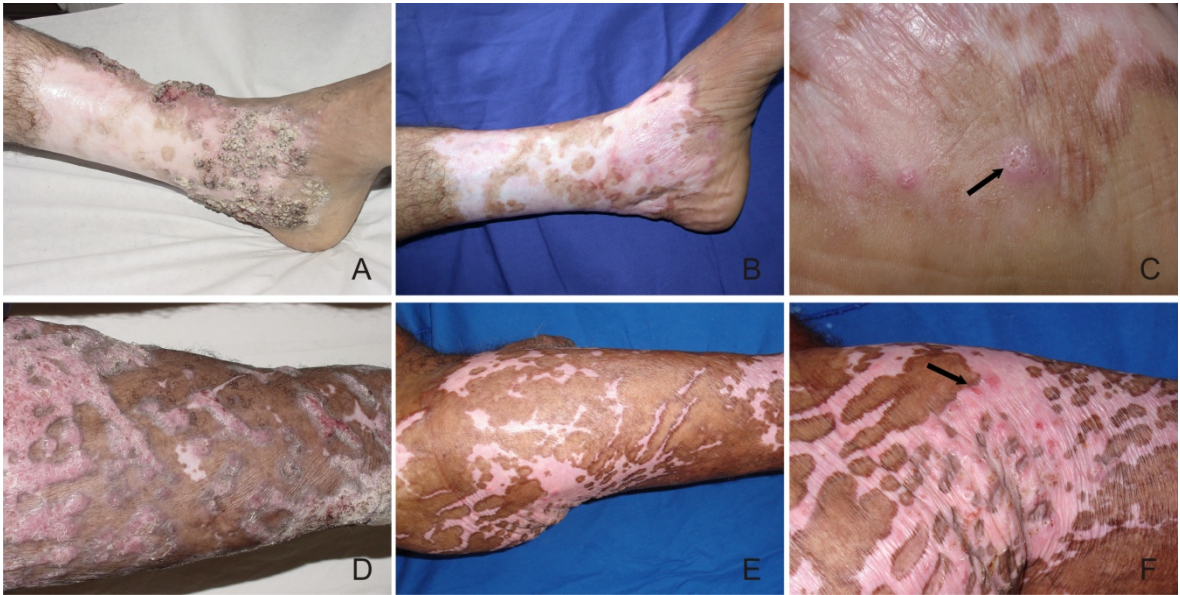
**Figure 3.** Immunophenotyping of the cell in granulomatous chromoblastomycosis. A and D) CD68<sup>+</sup> cells with the central distribution granuloma, B and E) surrounded by cytotoxic T lymphocytes (CD8<sup>+</sup>), and C and F) in the plasma more uniform provision (CD20<sup>+</sup>).



**Figure 4:** Semi-quantitative analysis of cellular phenotypes of granuloma processes analyzed by immunohistochemistry over time following treatment with low dose itraconazole at 200mg/day for CBM. Showing a statistically significant increase (\*  $p < 0.05$ ) of CD68<sup>+</sup> cells, CD8<sup>+</sup> and CD20<sup>+</sup> in 6 months of treatment.



**Figure 5.** Serum cytokine quantification by ELISA at 0, 6 and 12 months compared to control samples. There is a continuing growth in the IL-4 detection and a four fold increase in the TNF levels as compared to the initial concentrations.



**Figure 6.** Clinical evolution of two patients (A-C and D-F) treated for one year with Itraconazole. A and D correspond to the aspect of the lesions before treatment and B-F correspond to the post-treatment aspect, still showing active lesions (Black arrows).

## Reference List

1. AHRENS, J., GRAYBILL, J. R., ABISHAWL, A. et al. Experimental murine chromomycosis mimicking chronic progressive human disease. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* v.40, p.651-658, 1989.
2. ALVIANO, D. S., FRANZEN, A. J., TRAVASSOS, L. R. et al. Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of phagocytes. *Infect.Immun.* v.72, p.229-237, 2004.
3. BONIFAZ, A., MARTINEZ-SOTO, E., CARRASCO-GERARD, E. et al. Treatment of chromoblastomycosis with itraconazole, cryosurgery, and a combination of both. *Int.J.Dermatol.* v.36, p.542-547, 1997.
4. BUCKLEY, H. R. & MURRAY, I. G. Precipitating antibodies in chromomycosis. *Sabouraudia.* v.5, p.78-80, 1966.
5. CASTRO, L. G., PIMENTEL, E. R., LACAZ, C. S. Treatment of chromomycosis by cryosurgery with liquid nitrogen: 15 years' experience. *Int.J.Dermatol.* v.42, p.408-412, 2003.
6. CUNHA, M. M., FRANZEN, A. J., ALVIANO, D. S. et al. Inhibition of melanin synthesis pathway by tricyclazole increases susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* against mouse macrophages. *Microsc.Res.Tech.* v.68, p.377-384, 2005a.
7. \_\_\_\_\_. Inhibition of melanin synthesis pathway by tricyclazole increases susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* against mouse macrophages. *Microsc.Res.Tech.* v.68, p.377-384, 2005b.
8. CUTLER, J. E., DEEPE, G. S., JR., KLEIN, B. S. Advances in combating fungal diseases: vaccines on the threshold. *Nat.Rev.Microbiol.* v.5, p.13-28, 2007.
9. DE HOOG, G. S., QUEIROZ-TELLES, F., HAASE, G. et al. Black fungi: clinical and pathogenic approaches. *Med.Mycol.* v.38 Suppl 1, p.243-250, 2000.
10. ESTERRE, P., INZAN, C. K., RAMARCEL, E. R. et al. Treatment of chromomycosis with terbinafine: preliminary results of an open pilot study. *Br.J.Dermatol.* v.134 Suppl 46, p.33-36, 1996.
11. ESTERRE, P., PEYROL, S., SAINTE-MARIE, D. et al. Granulomatous reaction and tissue remodelling in the cutaneous lesion of chromomycosis. *Virchows Arch.A Pathol.Anat.Histopathol.* v.422, p.285-291, 1993.
12. FADER, R. C. & MCGINNIS, M. R. Infections caused by dematiaceous fungi: chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis. *Infect.Dis.Clin.North Am.* v.2, p.925-938, 1988.
13. FARBIARZ, S. R., DE CARVALHO, T. U., ALVIANO, C. et al. Fine structure and cytochemistry of the interaction between *Fonsecaea pedrosoi* and mouse resident macrophages. *J.Med.Vet.Mycol.* v.28, p.373-383, 1990.

14. GORDON, S. Alternative activation of macrophages. *Nat.Rev.Immunol.* v.3, p.23-35, 2003.
15. GORDON, S. & HUGHES, D. A. *Lung Macrophages and Dendritic Cells.* New York, 1997.
16. HAYAKAWA, M., GHOSN, E. E., DA GLORIA TEIXERIA DE SOUSA et al. Phagocytosis, production of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines by macrophages in the presence of dematiaceous [correction of dematiaceus] fungi that cause chromoblastomycosis. *Scand.J.Immunol.* v.64, p.382-387, 2006a.
17. \_\_\_\_\_. Phagocytosis, production of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines by macrophages in the presence of dematiaceous [correction of dematiaceus] fungi that cause chromoblastomycosis. *Scand.J.Immunol.* v.64, p.382-387, 2006b.
18. HIRA, K., YAMADA, H., TAKAHASHI, Y. et al. Successful treatment of chromomycosis using carbon dioxide laser associated with topical heat applications. *J.Eur.Acad.Dermatol.Venereol.* v.16, p.273-275, 2002.
19. MAZO, F. G., V, DA GLORIA, D. S., FERREIRA, K. S. et al. Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. *Microbes.Infect.* v.7, p.708-713, 2005.
20. MCGINNIS, M. R. & HILGER, A. E. Infections caused by black fungi. *Arch.Dermatol.* v.123, p.1300-1302, 1987.
21. MCNALLY, A. K. & ANDERSON, J. M. Interleukin-4 induces foreign body giant cells from human monocytes/macrophages. Differential lymphokine regulation of macrophage fusion leads to morphological variants of multinucleated giant cells. *Am.J.Pathol.* v.147, p.1487-1499, 1995.
22. PAUGAM, A. [The latest data on posaconazole]. *Med.Mal Infect.* v.37, p.71-76, 2007.
23. ROZENTAL, S., ALVIANO, C. S., DE SOUZA, W. The in vitro susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* to activated macrophages. *Mycopathologia* v.126, p.85-91, 1994.
24. TOROSANTUCCI, A., BROMURO, C., CHIARI, P. et al. A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *J.Exp.Med.* v.202, p.597-606, 2005.
25. UNGPAKORN, R. & REANGCHAINAM, S. Pulse itraconazole 400 mg daily in the treatment of chromoblastomycosis. *Clin.Exp.Dermatol.* v.31, p.245-247, 2006c.
26. \_\_\_\_\_. Pulse itraconazole 400 mg daily in the treatment of chromoblastomycosis. *Clin.Exp.Dermatol.* v.31, p.245-247, 2006a.
27. \_\_\_\_\_. Pulse itraconazole 400 mg daily in the treatment of chromoblastomycosis. *Clin.Exp.Dermatol.* v.31, p.245-247, 2006b.

28. VIDAL, M. S., DE CASTRO, L. G., CAVALECATE, S. C. et al. Immunoprecipitation techniques and Elisa in the detection of anti-Fonsecaea pedrosoi antibodies in chromoblastomycosis. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo* v.45, p.315-318, 2003.
29. VILLALBA, E. & YEGRES, J. F. Detection of circulating antibodies in patients affected by chromoblastomycosis by *Cladosporium carrionii* using double immunodiffusion. *Mycopathologia* v.102, p.17-19, 1988.

### 3. DISCUSSÃO

A obtenção de células escleróticas de boa qualidade, em grande quantidade e em um curto espaço de tempo, é uma condição essencial para avaliar a modulação do processo inflamatório característico da cromoblastomicose *in vitro*. Contudo, *F. pedrosoi* não é um fungo termo-dimórfico clássico, como *Paracoccidioides brasiliensis*. O conhecimento dos processos envolvidos na formação de células escleróticas é fundamental para o entendimento da relação fungo-hospedeiro, ou seja, da biologia dos agentes da cromoblastomicose, aumentando assim o conhecimento dos processos intrínsecos ao patógeno e possibilitando o estudo de novas metodologias terapêuticas, bem como o entendimento dos processos necessários para a instalação desta patologia.

As tentativas de indução das células escleróticas *in vitro* têm hoje como maior preocupação mimetizar o modo mais natural da diferenciação, como é visto na tentativa de substituição do DL-Propranolol, pelo PAF (ALVIANO *et al.*, 2003b), o que resulta na obtenção de células com similaridade morfológica e imunogênica as das formas teciduais, o que possibilitaria estudos sobre a relação fungo-hospedeiro *in vitro* mais próximos das interações que ocorrem *in vivo*.

Como as células escleróticas são observadas tanto em tecido animal como vegetal (ZEPPENFELDT *et al.*, 1994b), é de se esperar que em meios de cultura que tenham como base extratos vegetais, o mecanismo de indução seja muito mais próximo ao ocorrido *in vivo*, conferindo então uma maior significância aos resultados obtidos com estudos realizados utilizando estes meios de cultura.

A metodologia aplicada na produção dos meios naturais nos leva a supor que eles contêm apenas substâncias hidrossolúveis, íons e aminoácidos, já que as proteínas e vitaminas existentes nas fontes são desnaturadas durante o processo de esterilização por autoclave. Os açúcares também são componentes destes meios, o que aproxima muito das condições existentes *in vivo*, indicando que a indução das células escleróticas provavelmente ocorre na natureza de forma mais comum a que possamos supor.

As células escleróticas que são observadas nos processos inflamatórios da cromoblastomicose, comumente presentes em células gigantes, ou seja, fagocitadas por macrófagos que ficam envoltos por células CD8<sup>+</sup> e mais externamente por CD20<sup>+</sup>,

conforme demonstrado pela imunofenotipagem, estão presentes até o 6º mês de tratamento com itraconazol, tornando-se ausentes, na maioria dos casos estudados, aos 12 meses de tratamento. No entanto, apesar de as análises histológicas serem negativas para estruturas fúngicas, não refletem a cura clínica, sendo necessários exame micológico direto e cultura de tecido, já que a interrupção do tratamento neste momento pode levar a recidiva, como observado em casos em que a medicação foi interrompida.

Experimentos de interação *in vitro* relatam a inibição de moléculas co-estimulatórias por conídios quando fagocitados por macrófagos (DA SILVA *et al.*, 2007b), concordante com o observado em outros fungos, como *Aspergillus fumigatus* (BALLOY *et al.*, 2005) Em experimentos com hifas de outras espécies de fungos, os macrófagos e células dendríticas adquirem a capacidade de ativar a resposta inflamatória, principalmente através do receptor Dectin-1, que reconhece as  $\beta$ -glucanas (GERSUK *et al.*, 2006), inexistentes em conídios, mas presentes em hifas e células escleróticas.

A infecção crônica na CBM atinge a derme e o tecido subcutâneo, e inicia-se normalmente como lesões verrucosas, que gradualmente evoluem para aspectos polimórficos, desde lesões circinadas (SALGADO *et al.*, 2009), até lesões nodulares. Infecções persistentes ou crônicas mantêm alta a produção de TGF- $\beta$ , e podem levar a uma progressiva deposição de matriz extracelular e tecido fibroso, implicando na formação de cicatrizes hipertróficas (WERNER & ALZHEIMER, 2006), comuns nestas doenças. Esta observação é condizente com os nossos achados da histopatologia onde aos 3 meses de tratamento ocorre uma intensificação da fibrose, que se mantém em níveis moderados até o 12º mês de tratamento, sendo esta fibrose irreversível e com a presença *in situ* de TGF- $\beta$  (ESTERRE *et al.*, 1993).

O tratamento de pacientes revelou uma melhora significativa do processo inflamatório durante a terapia com itraconazol 200mg/dia, com regressão dos quadros de acantose e paraceratose, assim como do processo granulomatoso, sem levar a alterações hepáticas significantes (dados não mostrados).

A ação do itraconazol leva à destruição fúngica, e conseqüentemente a exacerbação do processo inflamatório, com recrutamento de células T CD8<sup>+</sup> e B CD20<sup>+</sup>, observado pela imunofenotipagem no decorrer do tratamento. Além disso, ocorre



simultaneamente um aumento significativo de IL-4, citocina com papel de ativação alternativa de macrófagos e capaz de gerar um reparo tecidual, o que pode contribuir para os processos inflamatórios em algumas doenças (GORDON, 2003).

Os resultados também mostram que macrófagos são recrutados para o sítio de infecção. Essas células ocupam uma posição central no granuloma, agrupando-se para formar células gigantes tipo Langhans, que é estimulado por IL-4 (MCNALLY & ANDERSON, 1995), mas que apresentam um baixo poder fungicida, fato relacionado à manutenção da infecção, ou seja, a cronicidade observada em pacientes de CBM (HAYAKAWA *et al.*, 2006; ROZENTAL *et al.*, 1994). O aumento da IL-4 plasmática foi observado de acordo com a regressão da contagem da paraceratose, ceratose e hiperkeratose, além da contagem de granulomas. Estas mudanças são também congruentes com a regressão clínica das lesões de pacientes tratados com itraconazol 200 mg/dia.

A IL-4 pode ser um potente estimulador para a produção de anticorpos por células CD20<sup>+</sup>, como, por exemplo, anticorpos anti-DHN-melanina, que são encontrados no soro de pacientes de CBM (ALVIANO *et al.*, 2004a; BUCKLEY & MURRAY, 1966; VIDAL *et al.*, 2003a; VILLALBA & YEGRES, 1988). DHN-melanina é um pigmento caracterizado em *F. pedrosoi* e relacionado como um dos fatores de virulência para este fungo (CUNHA *et al.*, 2005a), o que pode estar relacionado com o aumento de IL-4 e, em consequência, de células B CD20<sup>+</sup>, como descrito nos resultados de imunofenotipagem, após o sexto mês de tratamento.

Os resultados demonstram que uma resolução completa da infecção não foi observada após 12 meses de tratamento, o que pode estar relacionado às concentrações elevadas de IL-4. Estudos adicionais são necessários para avaliar o papel da IL-4 na CBM e em outras doenças fúngicas.

Expressões aumentadas de citocinas TH<sub>2</sub>, como IL-4 e IL-10 são observados geralmente na doença crônicas. Os níveis de IL-10 circulantes observados, são similares aos já demonstrados em pacientes de CBM com extensas lesões (MAZO, V *et al.*, 2005), a IL-10 também regula o crescimento e diferenciação de células B (MOORE *et al.*, 2001), que na CBM podem produzir anticorpos anti-DHN-melanina, como anteriormente relatado para o IL-4. Esta citocina também atua na inibição da apresentação de antígenos por moléculas MHC-II, diminuindo a expressão de

receptores como o CD54 (ICAM-1), e moléculas co-estimulatórias como o CD80 (B7-1), e o CD86 (B7-2) em monócitos (DING *et al.*, 1993) possui efeito similar ao observado quando células de Langerhans são co-cultivadas com células escleróticas (DA SILVA *et al.*, 2007a), sugerindo que os níveis de IL-10 estão relacionados com a persistência fúngica no tecido.

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pro-inflamatória eficaz no combate a infecções fúngicas, por ativar a neutrófilos e macrófagos em modelos animais de candidíase, aspergilose e do criptococose (MENCACCI *et al.*, 2000). O aumento dos níveis de TNF- $\alpha$ , ao final de um ano de tratamento com itraconazol, pode ser justificado pela relação com o balanço para a produção continuada de IL-4, assim como por sua atuação na ativação dos macrófagos recém recrutados para o sítio de infecção, o que foi observado nas análises de imunofenotipagem.

Os resultados deste trabalho demonstram que há mudanças quantitativas nas populações celulares durante o tratamento da CBM. Estas mudanças no perfil celular são causadas pela destruição de estruturas fúngicas por ação do itraconazol, resultando na indução de uma resposta imune celular. Os macrófagos estimulados apresentam antígenos de *F. pedrosoi* aos linfócitos B CD20<sup>+</sup> e também recrutam linfócitos T CD8<sup>+</sup>, bem como outros macrófagos. Os níveis elevados de IL-4 circulante contribuem para a involução clínica das lesões por ativarem alternativamente macrófagos, posteriormente ativados pela via clássica. Os níveis de IL-4 e IL-10 colaboram para as baixas taxas de cura, sendo necessário um tempo de tratamento superior a um ano para podermos efetivamente inferir a cura clínica. Os critérios de cura devem associar aspectos clínicos com as análises histopatológicas, sendo indispensáveis a cultura de tecido e o exame micológico direto.

## 4. PERSPECTIVAS

### 4.1. EXPERIMENTOS DE ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA

Os meios naturais representam um avanço no processo de indução *in vitro* de células escleróticas, contudo apresentam como ponto negativo a indisponibilidade sobre a real concentração e composição química. Experimentos futuros de indução de células escleróticas deverão ser acompanhados por análise cinética das alterações por espectrofotometria de absorção atômica, que está disponível no Laboratório de Química Analítica e Ambiental (LAQUANAM) da Faculdade de Química da Universidade Federal do Pará. Esta técnica pode ser assim resumida: As amostras líquidas são nebulizadas (formação de aerossol), vaporizadas (evaporação do solvente e formação de partículas sólidas dos compostos iônicos, que será convertido para os estados gasosos), dissociadas (fissão por aumento de temperatura dos componentes catódicos e anódicos dos compostos), ocorrendo em seguida processo de absorção, onde os diferentes átomos, quando em seu estado fundamental, adquirem a capacidade de absorver a luz emitida por lâmpadas formadas pelo mesmo átomo, e a quantidade de luz absorvida é diretamente proporcional a quantidade daquele átomo estudado presente na amostra, permitindo assim a determinação de aproximadamente 65 elementos que estejam entre 1 a 10 ppm (partes por milhão) com precisão de +/-1%. Desta forma, pretendemos revelar a composição dos meios e quais os compostos que são consumidos de acordo com a evolução do processo de dimorfismo entre conídios e células escleróticas.

### 4.2. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Estudos de biologia molecular das sequências ITS (espaçador transcrito interno de DNA ribossomal) do gênero *Fonsecaea* distinguem duas espécies, *F. pedrosoi* e o *F. monophora*, sendo a distinção molecular divergente da classificação clássica, onde *F. compacta* não parece ser mais que uma variante morfológica de *F. pedrosoi*, contudo ambas são agentes da CBM. No entanto, análises de cepas obtidas em diferentes continentes relacionam mais fortemente *F. pedrosoi* com a patologia do

que *F. monophora*, que é atualmente colocado com um agente oportunista, sendo que esta análise não incluiu cepas da região amazônica, o segundo principal foco mundial da doença. Assim, estudos de caracterização dos polimorfismos, não só da região ITS, mas de microsátélites e genes conservados como o CSH-2 (quitina sintetase-II), podem revelar o caráter e revelar alguma relação com os diferentes aspectos morfológicos macroscópicos das cepas.

Outros aspectos a serem estudados com a utilização das ferramentas de biologia molecular estão relacionados com o poder de virulência ou resistência antifúngica. Devido à elevada casuística atendida na Unidade de Referência e Treinamento em Dermatologia Sanitária de Estado do Pará URE Marcelo Candia, possuímos isolados de formas cutâneas localizadas, formas clássicas (verrucosas) e das formas cutâneo-disseminadas, e poderemos realizar estudos de clonagem e sequenciamento com genes relacionados a estes aspectos.

A caracterização molecular de *F. pedrosoi* permanece ainda indefinida, estudos mais detalhados envolvendo os principais genes responsáveis pela conversão de células escleróticas ou mesmo de expressão gênica envolvendo o ciclo patogênico do fungo negro e também sua interação com células do sistema imune ainda não foram realizados. Assim, novos estudos envolvendo a biologia molecular da relação fungo-hospedeiro são bastante promissores.

#### 4.3. MODELO DE GRANULOMA *in vitro*

A obtenção de células escleróticas *in vitro*, de forma mais rápida e similar ao que é sugerido por achados em plantas (cactos, palmeiras e leguminosas) no meio ambiente, como ocorre pelos meios de cultura aqui apresentados, associado a caracterização com a imunofenotipagem celular do processo inflamatório, incentivam a realização de isolamento de macrófagos, células de Langerhans (células apresentadoras de antígenos presentes na epiderme), linfócitos CD8<sup>+</sup> (linfócitos T citotóxicos) e CD20<sup>+</sup> (linfócitos B ativados ou plasmócitos), bem como TCD4<sup>+</sup> (linfócitos auxiliares) e fibroblastos para comparação do modelo de indução de células gigantes tipo Langhans com as observadas *in vitro*. Este modelo que pode ser gerado por estudos futuros do granuloma *in vitro* induzidos pela interação com células escleróticas

com células do sistema imune, e poderá ser estendido a outras patologias infecciosas granulomatosas.

Estes experimentos, quando realizados em interações simples ou mistas, irão revelar todo o processo de sinalização, pela mensuração das citocinas quantificadas por ELISA, produzidas por cada uma das diferentes células (quando em interações simples), ou por citometria de fluxo, que por dupla marcação podem revelar que célula apresenta o receptor para qual citocina produzida durante as interações. Dessa forma a regulação da formação de células gigantes tipo Langhans será melhor compreendida.

## 5. Referências Bibliográficas

1. ABBAS, A. K. & JANEWAY, C. A., JR. Immunology: improving on nature in the twenty-first century. *Cell* v.100, p.129-138, 2000.
2. AGARWALLA, A., KHANAL, B., GARG, V. K. et al. Chromoblastomycosis: report of two cases from Nepal. *J.Dermatol.* v.29, p.315-319, 2002.
3. AHRENS, J., GRAYBILL, J. R., ABISHAWL, A. et al. Experimental murine chromomycosis mimicking chronic progressive human disease. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* v.40, p.651-658, 1989.
4. ALVIANO, C. S., FARBIARZ, S. R., TRAVASSOS, L. R. et al. Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propranolol. *Mycopathologia* v.119, p.17-23, 1992.
5. ALVIANO, D. S., FRANZEN, A. J., TRAVASSOS, L. R. et al. Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of phagocytes. *Infect.Immun.* v.72, p.229-237, 2004a.
6. \_\_\_\_\_. Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of phagocytes. *Infect.Immun.* v.72, p.229-237, 2004b.
7. ALVIANO, D. S., KNEIPP, L. F., LOPES, A. H. et al. Differentiation of *Fonsecaea pedrosoi* mycelial forms into sclerotic cells is induced by platelet-activating factor. *Res.Microbiol.* v.154, p.689-695, 2003a.
8. \_\_\_\_\_. Differentiation of *Fonsecaea pedrosoi* mycelial forms into sclerotic cells is induced by platelet-activating factor. *Res.Microbiol.* v.154, p.689-695, 2003b.
9. ANDRADE, T. S., CASTRO, L. G., NUNES, R. S. et al. Susceptibility of sequential *Fonsecaea pedrosoi* isolates from chromoblastomycosis patients to antifungal agents. *Mycoses* v.47, p.216-221, 2004b.
10. \_\_\_\_\_. Susceptibility of sequential *Fonsecaea pedrosoi* isolates from chromoblastomycosis patients to antifungal agents. *Mycoses* v.47, p.216-221, 2004a.
11. ARANGO, M., JARAMILLO, C., CORTES, A. et al. Auricular chromoblastomycosis caused by *Rhinocladiella aquaspersa*. *Med.Mycol.* v.36, p.43-45, 1998.
12. BALLOY, V., SI-TAHAR, M., TAKEUCHI, O. et al. Involvement of toll-like receptor 2 in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infect.Immun.* v.73, p.5420-5425, 2005.

13. BANSAL A.S. & PRABHAKAR P. *Tropical Geographi Medicine* v.41, p.222-226, 1989.
14. BARBA-GOMEZ, J. F., MAYORGA, J., MCGINNIS, M. R. et al. Chromoblastomycosis caused by *Exophiala spinifera*. *J.Am.Acad.Dermatol.* v.26, p.367-370, 1992.
15. BONIFAZ, A., CARRASCO-GERARD, E., SAUL, A. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. *Mycoses* v.44, p.1-7, 2001.
16. BONIFAZ, A., MARTINEZ-SOTO, E., CARRASCO-GERARD, E. et al. Treatment of chromoblastomycosis with itraconazole, cryosurgery, and a combination of both. *Int.J.Dermatol.* v.36, p.542-547, 1997.
17. BUCKLEY, H. R. & MURRAY, I. G. Precipitating antibodies in chromomycosis. *Sabouraudia.* v.5, p.78-80, 1966.
18. CASTRO, L. G., PIMENTEL, E. R., LACAZ, C. S. Treatment of chromomycosis by cryosurgery with liquid nitrogen: 15 years' experience. *Int.J.Dermatol.* v.42, p.408-412, 2003.
19. CERMENO-VIVAS, J. R. & TORRESRODRIGUEZ, J. M. [In vitro susceptibility of dematiaceous fungi to ten antifungal drugs using an agar diffusion test]. *Rev.Iberoam.Micol.* v.18, p.113-117, 2001.
20. CUNHA, M. M., FRANZEN, A. J., ALVIANO, D. S. et al. Inhibition of melanin synthesis pathway by tricyclazole increases susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* against mouse macrophages. *Microsc.Res.Tech.* v.68, p.377-384, 2005a.
21. \_\_\_\_\_. Inhibition of melanin synthesis pathway by tricyclazole increases susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* against mouse macrophages. *Microsc.Res.Tech.* v.68, p.377-384, 2005b.
22. \_\_\_\_\_. Inhibition of melanin synthesis pathway by tricyclazole increases susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* against mouse macrophages. *Microsc.Res.Tech.* v.68, p.377-384, 2005c.
23. CUTLER, J. E., DEEPE, G. S., JR., KLEIN, B. S. Advances in combating fungal diseases: vaccines on the threshold. *Nat.Rev.Microbiol.* v.5, p.13-28, 2007.
24. DA SILVA, J. P., ALVIANO, D. S., ALVIANO, C. S. et al. Comparison of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells obtained in vivo and in vitro: ultrastructure and antigenicity. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* v.33, p.63-69, 2002a.
25. \_\_\_\_\_. Comparison of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells obtained in vivo and in vitro: ultrastructure and antigenicity. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* v.33, p.63-69, 2002b.

26. \_\_\_\_\_. Comparison of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells obtained in vivo and in vitro: ultrastructure and antigenicity. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* v.33, p.63-69, 2002c.
27. DA SILVA, J. P., DA SILVA, M. B., SALGADO, U. I. et al. Phagocytosis of *Fonsecaea pedrosoi* conidia, but not sclerotic cells caused by Langerhans cells, inhibits CD40 and B7-2 expression. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.*, 2007d.
28. \_\_\_\_\_. Phagocytosis of *Fonsecaea pedrosoi* conidia, but not sclerotic cells caused by Langerhans cells, inhibits CD40 and B7-2 expression. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* v.50, p.104-111, 2007c.
29. \_\_\_\_\_. Phagocytosis of *Fonsecaea pedrosoi* conidia, but not sclerotic cells caused by Langerhans cells, inhibits CD40 and B7-2 expression. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* v.50, p.104-111, 2007b.
30. \_\_\_\_\_. Phagocytosis of *Fonsecaea pedrosoi* conidia, but not sclerotic cells caused by Langerhans cells, inhibits CD40 and B7-2 expression. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* v.50, p.104-111, 2007a.
31. DE HOOG, G. S., GUARRO, J., GENÉ J. et al. Atlas of clinical fungi. v.2, 2001.
32. DE HOOG, G. S., GUARRO, J., GENÉ, J. et al. Atlas of Clinical Fungi. Utrecht and Reus, v.2nd, p.1-1126, 2000a.
33. DE HOOG, G. S., QUEIROZ-TELLES, F., HAASE, G. et al. Black fungi: clinical and pathogenic approaches. *Med.Mycol.* v.38 Suppl 1, p.243-250, 2000b.
34. DING, L., LINSLEY, P. S., HUANG, L. Y. et al. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J.Immunol.* v.151, p.1224-1234, 1993.
35. ESTERRE, P., ANDRIANTSIMAHAVANDY, A., RAHARISOLO, C. [Natural history of chromoblastomycosis in Madagascar and the Indian Ocean] [Natural history of chromoblastomycosis in Madagascar and the [Natural history of chromoblastomycosis in Madagascar and the Indian Ocean]. *Bull.Soc.Pathol.Exot.* v.90, p.312-317, 1997.
36. ESTERRE, P., ANDRIANTSIMAHAVANDY, A., RAMARCEL, E. R. et al. Forty years of chromoblastomycosis in Madagascar: a review. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* v.55, p.45-47, 1996a.
37. ESTERRE, P., INZAN, C. K., RAMARCEL, E. R. et al. Treatment of chromomycosis with terbinafine: preliminary results of an open pilot study. *Br.J.Dermatol.* v.134 Suppl 46, p.33-36, 1996b.
38. ESTERRE, P., JAHEVITRA, M., ANDRIANTSIMAHAVANDY, A. Humoral immune response in chromoblastomycosis during and after therapy. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* v.7, p.497-500, 2000.



39. ESTERRE, P., PEYROL, S., SAINTE-MARIE, D. et al. Granulomatous reaction and tissue remodelling in the cutaneous lesion of chromomycosis. *Virchows Arch.A Pathol.Anat.Histopathol.* v.422, p.285-291, 1993.
40. EZZINE-SEBAI, N., BENMOUSLY, R., FAZAA, B. et al. Chromomycosis arising in a Tunisian man. *Dermatol.Online.J.* v.11, p.14, 2005.
41. FADER, R. C. & MCGINNIS, M. R. Infections caused by dematiaceous fungi: chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis. *Infect.Dis.Clin.North Am.* v.2, p.925-938, 1988.
42. FARBIARZ, S. R., DE CARVALHO, T. U., ALVIANO, C. et al. Fine structure and cytochemistry of the interaction between *Fonsecaea pedrosoi* and mouse resident macrophages. *J.Med.Vet.Mycol.* v.28, p.373-383, 1990.
43. FEILI-HARIRI, M., FALKNER, D. H., MOREL, P. A. Polarization of naive T cells into Th1 or Th2 by distinct cytokine-driven murine dendritic cell populations: implications for immunotherapy. *J.Leukoc.Biol.* v.78, p.656-664, 2005.
44. FRANZEN, A. J., CUNHA, M. M., BATISTA, E. J. et al. Effects of tricyclazole (5-methyl-1,2,4-triazol[3,4] benzothiazole), a specific DHN-melanin inhibitor, on the morphology of *Fonsecaea pedrosoi* conidia and sclerotic cells. *Microsc.Res.Tech.* v.69, p.729-737, 2006.
45. GERSUK, G. M., UNDERHILL, D. M., ZHU, L. et al. Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states. *J.Immunol.* v.176, p.3717-3724, 2006.
46. GEZUELE, E., MACKINNON, J. E., CONTI-DIAZ, I. A. The frequent isolation of *Phialophora verrucosa* and *Phialophora pedrosoi* from natural sources. *Sabouraudia.* v.10, p.266-273, 1972.
47. GORDON, S. Alternative activation of macrophages. *Nat.Rev.Immunol.* v.3, p.23-35, 2003.
48. GORDON, S. & HUGHES, D. A. *Lung Macrophages and Dendritic Cells.* New York, 1997.
49. GREENWALD, R. J., FREEMAN, G. J., SHARPE, A. H. The B7 family revisited. *Annu.Rev.Immunol.* v.23, p.515-548, 2005.
50. GREWAL, I. S. & FLAVELL, R. A. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu.Rev.Immunol.* v.16, p.111-135, 1998.
51. HARADA, S. & KUSUNOKI, T. Scanning electron microscopic observation of the parasitic forms of *Fonsecaea pedrosoi* in a human skin lesion. *Mycopathologia* v.82, p.33-37, 1983.
52. HAYAKAWA, M., GHOSN, E. E., DA GLORIA TEIXERIA DE SOUSA et al. Phagocytosis, production of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines by

- macrophages in the presence of dematiaceous [correction of dematiaceus] fungi that cause chromoblastomycosis. *Scand.J.Immunol.* v.64, p.382-387, 2006.
53. HIRA, K., YAMADA, H., TAKAHASHI, Y. et al. Successful treatment of chromomycosis using carbon dioxide laser associated with topical heat applications. *J.Eur.Acad.Dermatol.Venereol.* v.16, p.273-275, 2002.
  54. HOWARD, C. J., CHARLESTON, B., STEPHENS, S. A. et al. The role of dendritic cells in shaping the immune response. *Anim Health Res.Rev.* v.5, p.191-195, 2004.
  55. HUME, D. A., ROSS, I. L., HIMES, S. R. et al. The mononuclear phagocyte system revisited. *J.Leukoc.Biol.* v.72, p.621-627, 2002.
  56. IBRAHIM-GRANET, O., DE BIEVRE, C., JENDOUBI, M. Immunochemical characterisation of antigens and growth inhibition of *Fonsecaea pedrosoi* by species-specific IgG. *J.Med.Microbiol.* v.26, p.217-222, 1988.
  57. IBRAHIM-GRANET, O., DE BIEVRE, C., ROMAIN, F. et al. Comparative electrophoresis, isoelectric focusing and numerical taxonomy of some isolates of *Fonsecaea pedrosoi* and allied fungi. *Sabouraudia.* v.23, p.253-264, 1985.
  58. IBRAHIM-GRANET O., E. G. A. C. B. Induction of yeast-like cells in a strain of *Fonsecaea pedrosoi* cultured under very acidic conditions. *Mycopathologia* v.90, p.35-39, 1985.
  59. KLINGEMANN, H. G. & DEDHAR, S. Distribution of integrins on human peripheral blood mononuclear cells. *Blood* v.74, p.1348-1354, 1989.
  60. KONDO, M., HIRUMA, M., NISHIOKA, Y. et al. A case of chromomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* and a review of reported cases of dematiaceous fungal infection in Japan. *Mycoses* v.48, p.221-225, 2005.
  61. KROCZEK, R. A., MAGES, H. W., HUTLOFF, A. Emerging paradigms of T-cell co-stimulation. *Curr.Opin.Immunol.* v.16, p.321-327, 2004.
  62. LACAZ C.S., P. E. & MARTINS E.J. Cromomicose. São Paulo, v.8, 1991.
  63. LOPEZ, M. R. & MENDEZ TOVAR, L. J. Chromoblastomycosis. *Clin.Dermatol.* v.25, p.188-194, 2007.
  64. MA, J., CHEN, T., MANDELIN, J. et al. Regulation of macrophage activation. *Cell Mol.Life Sci.* v.60, p.2334-2346, 2003b.
  65. \_\_\_\_\_. Regulation of macrophage activation. *Cell Mol.Life Sci.* v.60, p.2334-2346, 2003a.
  66. MARELLI-BERG, F. M., OKKENHAUG, K., MIRENDA, V. A two-signal model for T cell trafficking. *Trends Immunol.* v.28, p.267-273, 2007.

67. MARGARITA SILVA. The Parasitic phase of the fungi os chromoblastomycosis: Development of sclerotic cells in vitro and in vivo. *Mycologia* v.49, p.318-331, 1957.
68. MARQUES, S. G., SILVA, C. M., SALDANHA, P. C. et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of the babassu coconut (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon region of Maranhao Brazil. *Nippon Ishinkin.Gakkai Zasshi* v.47, p.305-311, 2006.
69. MATSUMOTO, T. Critical rewiew of humam isolated of *Wangliella dermatidis*. *Mycologia* v.76, p.232-249, 1984.
70. MATTE, S. M., LOPES, J. O., MELO, I. S. et al. [Chromoblastomycosis in Rio Grande do Sul: a report of 12 cases]. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* v.30, p.309-311, 1997.
71. MAZO, F. G., V, DA GLORIA, D. S., FERREIRA, K. S. et al. Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. *Microbes.Infect.* v.7, p.708-713, 2005.
72. MCGINNIS, M. R. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis, and mycology. *J.Am.Acad.Dermatol.* v.8, p.1-16, 1983.
73. MCGINNIS, M. R. & HILGER, A. E. Infections caused by black fungi. *Arch.Dermatol.* v.123, p.1300-1302, 1987.
74. MCNALLY, A. K. & ANDERSON, J. M. Interleukin-4 induces foreign body giant cells from human monocytes/macrophages. Differential lymphokine regulation of macrophage fusion leads to morphological variants of multinucleated giant cells. *Am.J.Pathol.* v.147, p.1487-1499, 1995.
75. MENCACCI, A., CENCI, E., BACCI, A. et al. Cytokines in candidiasis and aspergillosis. *Curr.Pharm.Biotechnol.* v.1, p.235-251, 2000.
76. MENDOZA, L., KARUPPAYIL, S. M., SZANISZLO, P. J. Calcium regulates in vitro dimorphism in chromoblastomycotic fungi. *Mycoses* v.36, p.157-164, 1993a.
77. \_\_\_\_\_. Calcium regulates in vitro dimorphism in chromoblastomycotic fungi. *Mycoses* v.36, p.157-164, 1993b.
78. MINOTTO, R., BERNARDI, C. D. V., MALLMANN, L. F. et al. Chromoblastomycosis: A review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Journal of the American Academy of Dermatology* v.44, p.585-592, 2001.
79. MOORE, K. W., DE WAAL, M. R., COFFMAN, R. L. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu.Rev.Immunol.* v.19, p.683-765, 2001.
80. NELMS, K., KEEGAN, A. D., ZAMORANO, J. et al. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu.Rev.Immunol.* v.17, p.701-738, 1999.

81. NICOLA, A. M., CASADEVALL, A., GOLDMAN, D. L. Fungal killing by mammalian phagocytic cells. *Curr.Opin.Microbiol.* v.11, p.313-317, 2008.
82. NIMRICHTER, L., CERQUEIRA, M. D., LEITAO, E. A. et al. Structure, cellular distribution, antigenicity, and biological functions of *Fonsecaea pedrosoi* ceramide monohexosides. *Infect.Immun.* v.73, p.7860-7868, 2005.
83. O'GARRA, A. & ARAI, N. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol.* v.10, p.542-550, 2000.
84. PAUGAM, A. [The latest data on posaconazole]. *Med.Mal Infect.* v.37, p.71-76, 2007.
85. POIRRIEZ, J., BREUILLARD, F., FRANCOIS, N. et al. A case of chromomycosis treated by a combination of cryotherapy, shaving, oral 5-fluorocytosine, and oral amphotericin B. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* v.63, p.61-63, 2000.
86. QUEIROZ-TELLES, F., MCGINNIS, M. R., SALKIN, I. et al. Subcutaneous mycoses. *Infect.Dis.Clin.North Am.* v.17, p.59-85, viii, 2003.
87. QUEIROZ-TELLES, F., PURIM, K. S., FILLUS, J. N. et al. Itraconazole in the treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*. *Int.J.Dermatol.* v.31, p.805-812, 1992.
88. RAPPLEYE, C. A. & GOLDMAN, W. E. Fungal stealth technology. *Trends Immunol.* v.29, p.18-24, 2008.
89. RAVETCH, J. & ADEREM, A. Phagocytic cells. *Immunol.Rev.* v.219, p.5-7, 2007.
90. RESTREPO, A., GONZALEZ, A., GOMEZ, I. et al. Treatment of chromoblastomycosis with itraconazole. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* v.544, p.504-516, 1988.
91. RIOS-FABRA, A., MORENO, A. R., ISTURIZ, R. E. Fungal infection in Latin American countries. *Infect.Dis.Clin.North Am.* v.8, p.129-154, 1994.
92. RIPPON J.W. Chromoblastomycosis. Philadelphia, v.Saunders, p.276-296, 1988.
93. ROGEZ, H., BUXANT, R., MIGNOLET, E. et al. Chemical composition of the pulp of three typical Amazonian fruits: araca-boi (*Eugenia stipitata*), bacuri (*Platonia insignis*) and cupuacu (*Theobroma grandiflorum*). *European Food Research and Technology* v.218, p.380-384, 2004.
94. ROZENTAL, S., ALVIANO, C. S., DE SOUZA, W. The in vitro susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* to activated macrophages. *Mycopathologia* v.126, p.85-91, 1994.

95. RUBIN, H. A., BRUCE, S., ROSEN, T. et al. Evidence for percutaneous inoculation as the mode of transmission for chromoblastomycosis. *J.Am.Acad.Dermatol.* v.25, p.951-954, 1991.
96. SALGADO, C. G., DA SILVA, J. P., DA SILVA, M. B. et al. Cutaneous diffuse chromoblastomycosis. *Lancet Infect.Dis.* v.5, p.528, 2005.
97. SALGADO, C. G., DA SILVA, J. P., DINIZ, J. A. et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo* v.46, p.33-36, 2004b.
98. \_\_\_\_\_. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo* v.46, p.33-36, 2004a.
99. SALGADO, C. G., DA SILVA, M. B., YAMANO, S. S. et al. Cutaneous localized annular chromoblastomycosis. *J.Cutan.Pathol.* v.36, p.257-261, 2009.
100. SEVIGNY, G. M. & RAMOS-CARO, F. A. Treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi* with low-dose terbinafine. *Cutis* v.66, p.45-46, 2000.
101. SILVA, C. M., DA ROCHA, R. M., MORENO, J. S. et al. [The coconut babacu (*Orbignya phalerata martins*) as a probable risk of human infection by the agent of chromoblastomycosis in the State of Maranhao, Brazil]. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* v.28, p.49-52, 1995.
102. SILVA, J. P., DE SOUZA, W., ROZENTAL, S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil). *Mycopathologia* v.143, p.171-175, 1998a.
103. \_\_\_\_\_. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil). *Mycopathologia* v.143, p.171-175, 1998b.
104. SILVA, M. The Parasitic phase of the fungi os chromoblastomycosis: Development of sclerotic cells in vitro and in vivo. *Mycologia* v.49, p.318-331, 1957.
105. STEINMAN, R. M. Lasker Basic Medical Research Award. Dendritic cells: versatile controllers of the immune system. *Nat.Med.* v.13, p.1155-1159, 2007.
106. TANUMA, H., HIRAMATSU, M., MUKAI, H. et al. Case report. A case of chromoblastomycosis effectively treated with terbinafine. Characteristics of chromoblastomycosis in the Kitasato region, Japan. *Mycoses* v.43, p.79-83, 2000.
107. TEIXEIRA DE SOUSA, M. G., GHOSN, E. E., ALMEIDA, S. R. Absence of CD4+ T cells impairs host defence of mice infected with *Fonsecaea pedrosoi*. *Scand.J.Immunol.* v.64, p.595-600, 2006.
108. TOROSANTUCCI, A., BROMURO, C., CHIARI, P. et al. A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *J.Exp.Med.* v.202, p.597-606, 2005.

109. UNGPAKORN, R. Mycoses in Thailand: current concerns. *Nippon Ishinkin.Gakkai Zasshi* v.46, p.81-86, 2005.
110. UNGPAKORN, R. & REANGCHAINAM, S. Pulse itraconazole 400 mg daily in the treatment of chromoblastomycosis. *Clin.Exp.Dermatol.* v.31, p.245-247, 2006.
111. VIDAL, M. S., DE CASTRO, L. G., CAVALECATE, S. C. et al. Immunoprecipitation techniques and Elisa in the detection of anti-Fonsecaea pedrosoi antibodies in chromoblastomycosis. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo* v.45, p.315-318, 2003a.
112. \_\_\_\_\_. Immunoprecipitation techniques and Elisa in the detection of anti-Fonsecaea pedrosoi antibodies in chromoblastomycosis. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo* v.45, p.315-318, 2003b.
113. VILLALBA, E. & YEGRES, J. F. Detection of circulating antibodies in patients affected by chromoblastomycosis by Cladosporium carrionii using double immunodiffusion. *Mycopathologia* v.102, p.17-19, 1988.
114. VITALE, R. G., DE HOOG, G. S., VERWEIJ, P. E. In vitro activity of amphotericin B, itraconazole, terbinafine and 5-fluocytosine against Exophiala spinifera and evaluation of post-antifungal effects. *Med.Mycol.* v.41, p.301-307, 2003.
115. WALTER, P., GARIN, Y., RICHARD-LENOBLE, D. Chromoblastomycosis. A morphological investigation of the host-parasite interaction. *Virchows Arch.A Pathol.Anat.Histol.* v.397, p.203-214, 1982.
116. WATFORD, W. T., MORIGUCHI, M., MORINOBU, A. et al. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* v.14, p.361-368, 2003.
117. WERNER, S. & ALZHEIMER, C. Roles of activin in tissue repair, fibrosis, and inflammatory disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* v.17, p.157-171, 2006.
118. YEGRES, F. Cromomicosis por Cladosporium carrionii en criadores de caprinos del estado Fálcon. *Investigación Clínica* v.26, p.235-246, 1985.
119. YUYAMA, L. K. O., AGUIAR, J. P. L., YUYAMA, K. et al. Chemical composition of the fruit mesocarp of three peach palm (Bactris gasipaes) populations grown in Central Amazonia, Brazil. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* v.54, p.49-56, 2003.
120. ZEPPENFELDT, G., RICHARD-YEGRES, N., YEGRES, F. Cladosporium carrionii: hongo dimórfico en cactáceas de la zona endémica para la cromomicosis en Venezuela. *Rev.Iberoam.Micol.* v.11, p.61-63, 1994a.
121. \_\_\_\_\_. Cladosporium carrionii: hongo dimórfico en cactáceas de la zona endémica para la cromomicosis en Venezuela. *Rev.Iberoam.Micol.* v.11, p.61-63, 1994b.

122. ZHANG, X. & MOSSER, D. Macrophage activation by endogenous danger signals. *J.Pathol.* v.214, p.161-178, 2008.