

SUELLEN SIRLEIDE PEREIRA YAMANO

Análise da interação *in vitro* entre *Fonsecaea pedrosoi* e macrófagos peritoneais de camundongos C57/BL6 e BALB/c

**BELÉM
2008**

SUELLEN SIRLEIDE PEREIRA YAMANO

**Análise da interação *in vitro* entre *Fonsecaea pedrosoi* e
macrófagos peritoneais de camundongos C57/BL6 e BALB/c**

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado - Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

**BELÉM
2008**

SUELLEN SIRLEIDE PEREIRA YAMANO

**Análise da interação *in vitro* entre *Fonsecaea pedrosoi* e
macrófagos peritoneais de camundongos C57/BL6 e BALB/c**

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Data de aprovação: 02/04/08

Banca examinadora:

Claudio Guedes salgado – Orientador
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Prof. Dra. Norma Tiraboschi Foss
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Prof. Dr. José Augusto da Costa Nery
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ

Prof. Dra. Leda Quércia Vieira
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

BELÉM
2008

AGRADECIMENTOS

A Deus, criador do mundo, fonte de sabedoria e bondade.

À Família, principalmente à minha mãe Maria Auxiliadora e minha avó Maria dos Reis por todo apoio, dedicação e amor em todos os momentos, sempre ajudando a realizar os meus sonhos; meus pais Valdeci Almeida e João pereira Lima; meus irmãos Edson e Valdiellen, por todo carinho e alegria; meus tios Evandro, Lucia e Henrique; meus primos Arlem, Mara, Samara, Pedro Paulo, Fatiane e meu avô Henrique Pereira (*In memorian*), por toda a estima e incentivo.

Ao Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado, pelas orientações neste trabalho, pela paciência, compreensão e pelo conhecimento compartilhado.

À equipe do Laboratório de Dermato-Imunologia UFPA/UEPA/MC, em especial ao Prof. Dr. Jorge Pereira da Silva e aos amigos e companheiros de trabalho Msc. Moisés Silva e Simone Campelo, por todo o conhecimento recebido e dias de trabalho e alegria vividos. Agradeço ainda aos técnicos de laboratório Sidnei e Elaine, e aos funcionários Cleide, Fátima, Nilce e Leide.

Ao meu esposo, Ernesto Yamano, pelo amor e incentivo em todos os momentos.

Aos Amigos, que sempre estiveram ao meu lado, Sheyla, Anna Elizabeth, Maria Eugenia, Alcione, Marly, Reinaldo, Daniela e Elizabeth.

Aos diretores e amigos do Laboratório Beneficente de Belém, pela compreensão.

Aos professores, coordenadores e demais funcionários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

À Unidade de Referência e Treinamento em Dermatologia Sanitária “Dr. Marcello Candia”; ao Instituto Evandro Chagas; à Secretaria Executiva de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente e à Secretaria Executiva de Saúde Pública do Estado do Pará.

A todos que contribuíram para a realização desta obra.

Muito obrigada!

RESUMO

A cromoblastomicose é uma infecção subcutânea crônica, granulomatosa, causada pela implantação traumática de diversas espécies de fungos demáceos, sendo *Fonsecaea pedrosoi* o principal agente etiológico. O Brasil possui a segunda maior prevalência mundial da doença, sendo o estado do Pará a maior área endêmica. Histologicamente, a cromomicose é caracterizada pela presença de células gigantes, onde podem ser observadas células escleróticas fagocitadas por macrófagos. O objetivo do presente estudo foi analisar os diferentes aspectos da interação de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57/BL6 com conídios ou células escleróticas de *F. pedrosoi*, determinando os índices de infecção, fagocitose e fusão celular. Os resultados mostraram índices de fagocitose e infecção maiores em conídios do que em células escleróticas para BALB/c ($p < 0.05$), ocorrendo efeito inverso no índice de fusão, com a formação de células gigantes do tipo Langhans na interação com células escleróticas e células gigantes do tipo corpo estranho na interação com conídios. Os macrófagos de BALB/c em interação com conídios produziram mais TNF- α que o controle nos tempos de 3 à 72h; e mais IL-10 após 3h. Macrófagos interagindo com células escleróticas produziram mais TNF- α que o controle nos tempos de 1h e 3h; e a quantidade de IL-10 foi maior após 72h de interação. No co-cultivo de macrófagos de C57/BL6 com conídios observou-se a presença de vacúolos aumentados após 24h, enquanto na interação com células escleróticas, os macrófagos se desprenderam da lamínula nos tempos posteriores a 24 h. A quantidade de TNF- α é maior na interação de conídios comparado ao controle em 1 e 72 h; e a quantidade de IL-10, no tempo de 48h. Já na interação com células escleróticas, apenas a quantidade de IL-10 diferiu do controle, sendo maior nos tempos de 1 à 48h. Estes dados sugerem que a resposta de macrófagos ao fungo é diferente entre os camundongos de BALB/c e C57/BL6, diferindo também a resposta de um mesmo tipo de macrófago para cada forma fúngica, sendo as células escleróticas aparentemente mais imunogênicas que os conídios.

Palavras-chave: Cromoblastomicose. *Fonsecaea pedrosoi*. Macrófagos. Interação. Fagocitose. Fusão celular. L-10. TNF- α .

ABSTRACT

Chromoblastomycosis (CBM) is a chronic, subcutaneous, granulomatous infection caused by traumatic implantation in the skin of several dematiaceous fungi, usually *Fonsecaea pedrosoi*. Brazil has second highest disease prevalence in the world and Pará State is the most endemic area. Histologically, CBM is characterized by the presence of multinucleated giant cells and sclerotic cells can be found engulfed by macrophages. The objective of this study was to analyze the different aspects of interaction between peritoneal macrophages from BALB/c or C57/BL6 mice with *F. pedrosoi* conidia or sclerotic cells, calculating infection, phagocytosis and cellular fusion rates. The results showed phagocytosis and infection rates with conidia higher than sclerotic cells to BALB/c ($p < 0.05$), while the rate of cellular fusion was higher for sclerotic cells interaction, with Langhans giant cells formation, in comparison to foreign-body giant cells after interaction with conidia. Macrophages from BALB/c co-cultured with conidia produced more TNF- α than control group after 3 to 72 hours, and more IL-10 after 3h. Macrophages interacting with sclerotic cells produced more TNF- α than control group after 1h and 3h, and the amount of IL-10 was higher after 72h of interaction. In the co-culture of C57/BL6 macrophages with conidia, the presence of large vacuoles after 24h was observed, while in the co-culture with sclerotic cells, macrophages were detached from coverslip glasses after 24 h. Our results indicate higher levels of TNF- α after interaction of conidia compared to controls at 1 and 72 h and increase of IL-10 after 48h. However, after interaction with sclerotic cells, only IL-10 differed from control, being higher after 1 to 48 hours. All of these data suggest that macrophage response to fungus is different between BALB/c and C57/BL6 mice, differing also on the response of the same type macrophage for each fungal form, sclerotic cells apparently being more immunogenic than conidia.

Key-words: Chromoblastomycosis. *Fonsecaea pedrosoi*. Macrophage. Interaction. phagocytosis. Cellular fusion. IL-10. TNF- α .

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01:	Diferentes aspectos clínicos das lesões de cromoblastomicose.....	11
Figura 02:	Distribuição mundial dos casos de cromoblastomicose nos últimos 50 anos	13
Figura 03:	Distribuição nacionais dos casos descritos de cromoblastomicose nos últimos 50 anos.....	13
Figura 04:	Exame micológico direto.....	15
Figura 05:	Esquema mostrando os supostos mecanismos da fusão de macrófagos.....	25
Figura 06:	Macroscopia da colônia de <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	32
Figura 07:	Microcultivo de <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	33
Figura 08:	Células escleróticas obtidas nos meios quimicamente definidos.....	34
Figura 09:	Esquema para a contagem do número total de macrófagos na lamínula.....	36
Figura 10:	Macrófagos de camundongos BALB/c infectados com conídios ou células escleróticas de <i>F. pedrosoi</i>	39
Figura 11:	Macrófagos de camundongos BALB/c ou C57/BL6 infectados com conídios de <i>F. pedrosoi</i>	40
Figura 12:	Co-cultivo de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c com conídios ou células escleróticas de <i>F. pedrosoi</i>	41
Figura 13:	Co-cultivo de macrófagos peritoneais de camundongos C57/BL6 com conídios ou células escleróticas de <i>F. pedrosoi</i>	42
Figura 14:	Comparação entre células gigantes obtidas de biópsia de lesão e células gigantes formadas na cultura <i>in vitro</i> após 24 horas.....	43
Figura 15:	Macrófagos de camundongos BALB/c ou C57/BL6 infectados com células escleróticas de <i>F. pedrosoi</i>	44
Figura 16:	Macrófagos de camundongos C57/BL6 infectados com células escleróticas de <i>F. pedrosoi</i> após 48 horas.....	45
Gráfico 01:	Índice de Infecção em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c co-cultivados com conídios ou células escleróticas de <i>F. pedrosoi</i>	46
Gráfico 02:	Índice de Infecção em macrófagos peritoneais de camundongos C57/BL6 co-cultivados com conídios ou células escleróticas de <i>F. pedrosoi</i>	47
Gráfico 03:	Índice de Infecção em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ou C57/BL6 co-cultivados com células escleróticas de <i>F. pedrosoi</i>	48
Gráfico 04:	Índice de infecção em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ou C57/BL6 co-cultivados com conídios de <i>F. pedrosoi</i>	48
Gráfico 05:	Índice de fagocitose em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c co-cultivados com conídios ou células escleróticas de <i>F. pedrosoi</i>	50
Gráfico 06:	Índice de fagocitose em macrófagos peritoneais de camundongos C57/BL6 co-cultivados com conídios ou células escleróticas de <i>F. pedrosoi</i>	50

Gráfico 07: Índice de fagocitose em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ou C57/BL6 co-cultivados com conídios de <i>F. pedrosoi</i>	51
Gráfico 08: Índice de fagocitose em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ou C57/BL6 co-cultivados com células escleróticas de <i>F. pedrosoi</i>	51
Gráfico 09: Índice de fusão celular em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c co-cultivados com conídios ou células escleróticas de <i>F. pedrosoi</i> ..	53
Gráfico 10: Índice de fusão celular em macrófagos peritoneais de camundongos C57/BL6 co-cultivados com conídios ou células escleróticas de <i>F. pedrosoi</i>	53
Gráfico 11: Índice de fusão celular em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ou C57/BL6 co-cultivados com conídios de <i>F. pedrosoi</i>	54
Gráfico 12: Índice de fusão celular em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ou C57/BL6 co-cultivados com células escleróticas de <i>F. pedrosoi</i> ..	54
Gráfico 13: Produção de TNF- α por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c isolados ou co-cultivados com conídios ou células escleróticas de <i>F. pedrosoi</i>	56
Gráfico 14: Produção de TNF- α por macrófagos peritoneais de camundongos C57/BL6 isoladamente ou em co-cultivo com conídios <i>F. pedrosoi</i>	56
Gráfico 15: Produção de TNF- α por macrófagos peritoneais de camundongos C57/BL6 isoladamente ou em co-cultivo com conídios ou células escleróticas de <i>F. pedrosoi</i>	57
Gráfico 16: Produção de IL-10 por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c isoladamente ou em co-cultivo com conídios ou células escleróticas de <i>F. pedrosoi</i>	57
Gráfico 17: Produção de IL-10 por macrófagos peritoneais de camundongos C57/BL6 isoladamente ou em co-cultivo com conídios ou células escleróticas de <i>F. pedrosoi</i>	58

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 CROMOBLASTOMICOSE.....	11
1.1.1 Características clínicas	11
1.1.2 Epidemiologia	12
1.1.3 Diagnóstico laboratorial	14
1.1.4 Tratamento	14
1.2 ETIOLOGIA.....	15
1.3 O MACRÓFAGO.....	17
1.4 FORMAÇÃO DE CÉLULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS....	20
1.5 INTERAÇÃO FUNGO-HOSPEDEIRO.....	26
2. OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL.....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 AMOSTRAS FÚNGICAS.....	32
3.2 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO.....	33
3.3 ISOLAMENTO E CONTAGEM DE CONÍDIOS.....	33
3.4 INDUÇÃO DE CÉLULAS ESCLERÓTICAS.....	34
3.5 OBTENÇÃO E CULTIVO DE MACRÓFAGOS.....	35
3.6 INTERAÇÃO MACRÓFAGO × <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	35
3.7 COLORAÇÃO COM GIEMSA.....	36
3.8 DETERMINAÇÃO DOS ÍNDICES DE INFECÇÃO, FAGOCITOSE E FUSÃO CELULAR.....	36
3.9 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS ATRAVÉS DO TESTE DE ELISA.....	37
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
4. RESULTADOS	39
4.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA INTERAÇÃO.....	39

4.2 PORCENTAGEM DE MACRÓFAGOS INFECTADOS.....	46
4.3 NÚMERO DE FUNGOS POR MACRÓFAGO INFECTADO (ÍNDICE DE FAGOCITOSE).....	49
4.4 ÍNDICE DE FUSÃO CELULAR.....	52
4.5 ANÁLISE DE CITOCINAS ATRAVÉS DE ELISA.....	55
5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÕES	65
7. REFERÊNCIAS	66

1. INTRODUÇÃO

1.1. CROMOBLASTOMICOSE

1.1.1. Características clínicas

O termo cromoblastomicose foi utilizado inicialmente em 1922, para designar um grupo de doenças fúngicas polimórficas, conhecidas como dermatite verrucosa. A cromoblastomicose é uma infecção subcutânea crônica, causada por implantação traumática de diversas espécies de fungos demáceos, sendo o principal agente o *Fonsecaea pedrosoi*. No tecido do hospedeiro, os conídios ou fragmentos de hifas se diferenciam em formas miceliais e posteriormente, originam estruturas globosas e de paredes espessas denominadas células escleróticas ou corpos muriformes (MC GINNIS *et al.*, 1987; RIPPON, 1988; LACAZ, *et al.*, 2002).

A cromoblastomicose apresenta aspectos clínicos variados (Figura 01), sendo encontradas lesões nodulares, verrucosas, tumorais, em placas, cicatriciais e tricofitóides. Essas lesões podem ser localizadas, disseminadas ou cutânea disseminadas (SALGADO *et al.*, 2005).



Figura 01. Diferentes aspectos clínicos das lesões de cromoblastomicose. A) Lesões verrucosas, vegetantes com fibrose acentuada e atrofia cicatricial, B) Lesões verrucosas e nodulares, C) Lesão em placa, psoriasiforme, D) Lesões verrucosas, E) Lesões verrucosas e nodulares, disseminadas pelo tegumento (SALGADO *et al.*, 2005). Fonte: Laboratório de Dermato-Imunologia.

Nos estágios iniciais, a doença caracteriza-se clinicamente pela presença de pápulas eritematosas, que se desenvolvem e originam lesões de aspecto verrucoso, com presença de nódulos que posteriormente podem ulcerar terminando, na maioria das vezes, com hiperkeratose e hiperacantose dos tecidos afetados. As úlceras podem se tornar vegetantes, adquirindo aspecto papilomatoso semelhante à couve-flor (LACAZ *et al.*, 2002). Apresenta evolução lenta e progride com fibrose tecidual prejudicando a circulação linfática, podendo levar a elefantíase com perda total ou parcial da funcionalidade do membro atingido. Além disso, podem ocorrer infecções bacterianas secundárias (FADER & MC GINNIS, 1988).

1.1.2. Epidemiologia

A cromoblastomicose tem distribuição mundial e é prevalente em países de clima tropical e subtropical, como Brasil, Madagascar, Costa Rica, República Dominicana e Austrália (Figura 02). No Brasil (Figura 03), a região amazônica é onde se encontra o maior número de casos, sendo o estado do Pará o principal foco da doença, com a segunda maior prevalência mundial.

Entre os anos de 1942 e 1997 foram registrados 325 casos de cromoblastomicose em nosso estado (SILVA *et al.*, 1999). Somente entre os anos de 2001 e 2008 foram cadastrados na Unidade de Referência e Treinamento em Dermatologia Sanitária Dr. Marcello Candia (URE-Marcello Candia) mais de 110 casos novos de cromoblastomicose. Estudos epidemiológicos demonstraram que a cromoblastomicose atinge mais frequentemente trabalhadores rurais, do sexo masculino e com idade entre 41 e 70 anos (SILVA *et al.*, 1999; MINOTTO *et al.*, 2001). No entanto, raramente são observados casos de cromoblastomicose em crianças, mesmo quando elas vivem nas mesmas condições ambientais de adultos com a doença. Por isso, acredita-se que o fungo inoculado no organismo fique latente por longos períodos, ou que sejam necessários repetidos traumatismos para iniciar a doença.

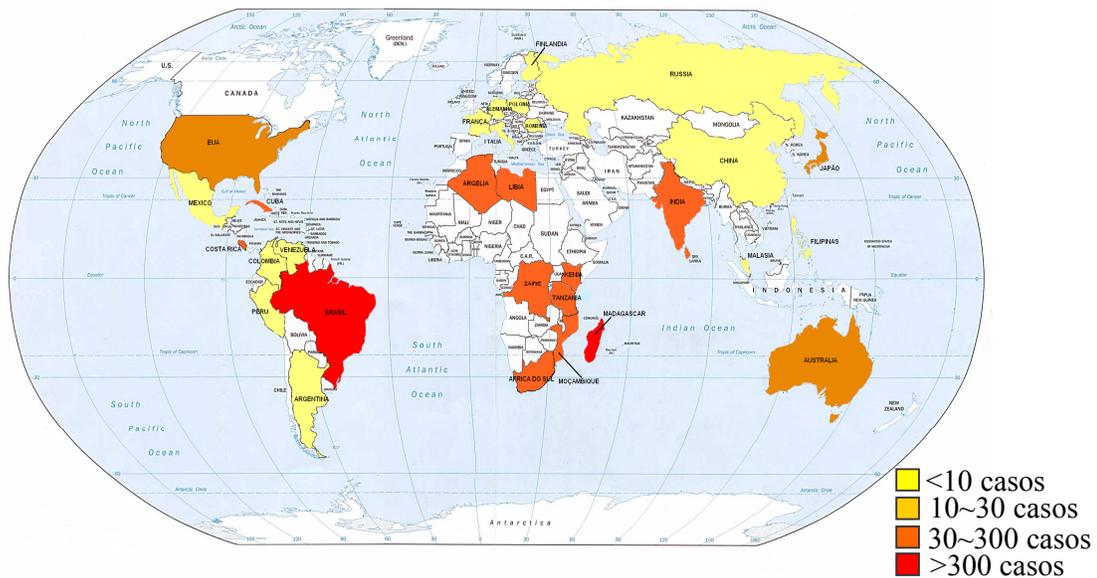


Figura 02: Distribuição mundial dos casos de cromoblastomicose nos últimos 50 anos (Fonte: Laboratório de Dermato-Imunologia).

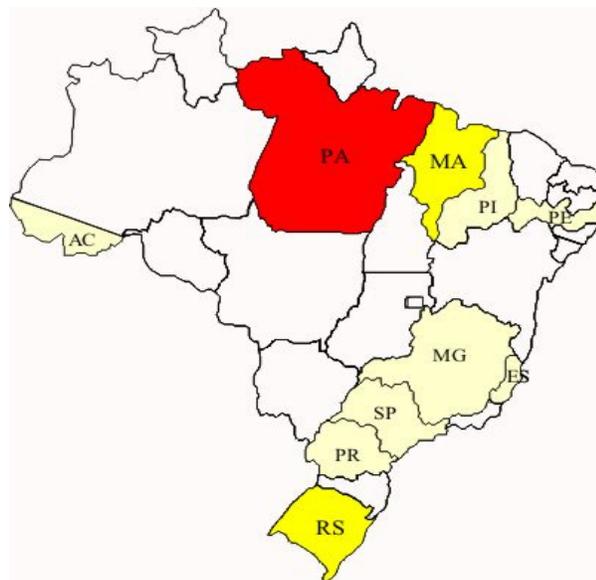


Figura 03: Distribuição nacional dos casos descritos de cromoblastomicose nos últimos 50 anos. Branco (sem registro de caso), amarelo claro (até 10 casos registrados), amarelo vivo (entre 10 e 100 casos registrados) e vermelho (mais de 100 casos) (Fonte: Laboratório de Dermato-Imunologia).

1.1.3. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial é realizado através do exame micológico direto, da identificação do fungo em cultura ou por exames anatomopatológicos. O método mais simples é o exame micológico direto do material retirado por escarificação (raspado), onde se observam as células escleróticas (Figura 04). Estas células apresentam morfologia arredondada, coloração marron-acastanhada e podem ser visualizadas isoladamente ou em pequenos grupos (LACAZ *et al.*, 2002). A biópsia do tecido revela hiperkeratose e parakeratose, com abscessos e granulomas. No tecido, as células escleróticas apresentam divisão planária, caracterizada pela formação de septos em diferentes planos (TELLES *et al.*, 2003) e são patognômicas de cromoblastomicose.

Microscopicamente, o estudo histopatológico demonstra hiperkeratose e hiperplasia pseudoepiteliomatosa revelando a ocorrência de uma resposta tecidual granulomatosa. O infiltrado celular é composto de leucócitos polimorfonucleares, leucócitos mononucleares, linfócitos, eosinófilos, células plasmáticas, estando presentes também células gigantes de corpo estranho e ocasionalmente células de Langerhans. Além disso, se observa abscesso com variável grau de necrose e supuração. O fungo pode ser encontrado no interior dos macrófagos, das células gigantes ou extracelularmente (CARRIÓN, 1950; MC GINNIS, 1983).

1.1.4. Tratamento

A cromoblastomicose pode ser tratada por diferentes métodos: Itraconazol ou terbinafina têm sido usados como terapia simples (RESTREPO, 1994; BONIFAZ *et al.*, 1997), e grandes lesões podem ser reduzidas com aplicações locais de calor ou com crioterapia antes da administração do medicamento para obtenção de uma resposta mais eficiente (PANG *et al.*, 2004).

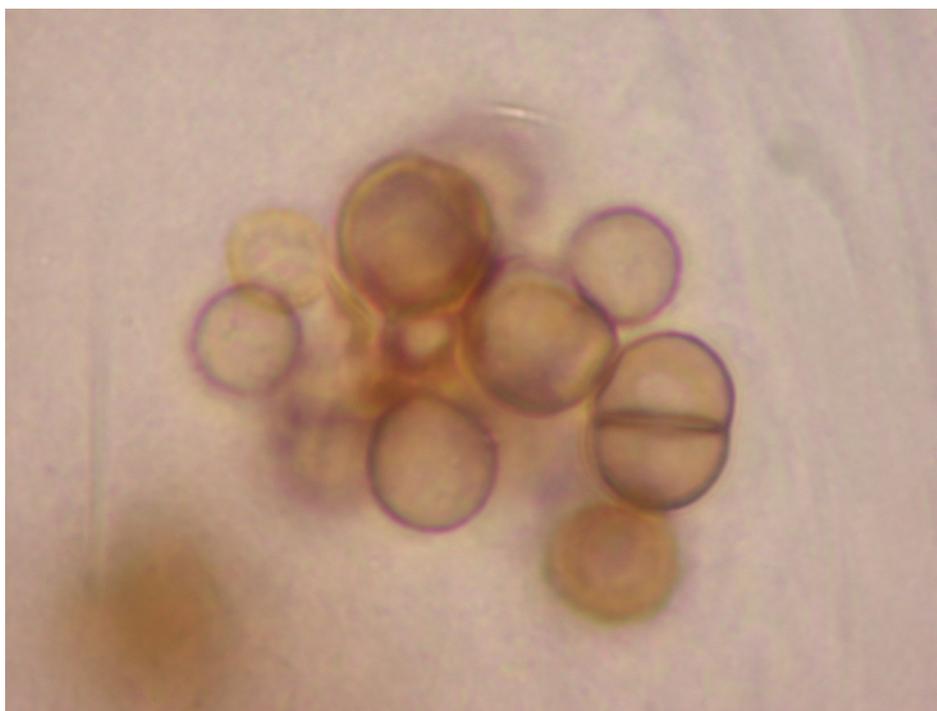


Figura 04. Exame micológico direto. Células escleróticas observadas ao exame micológico direto da lesão, evidenciando a coloração acastanhada e septações multiplanárias. (Fonte: Laboratório de Dermato-Imunologia).

1.2. ETIOLOGIA

Os agentes etiológicos da cromoblastomicose são agrupados em quatro principais gêneros, que são *Cladosporium*, *Cladophialophora*, *Exophiala* (PADHYE *et al.*, 1996; BARBA-GÓMEZ *et al.*, 1992) e *Fonsecaea*, sendo este considerado o principal agente (MCGINNIS *et al.*, 1983; SILVA *et al.*, 1999). Em alguns casos, podemos encontrar ainda o gênero *Rhinocladiella* (ARANGO *et al.*, 1998).

Estes agentes caracterizam-se por apresentar uma forma tecidual única, denominada de célula esclerótica ou corpo muriforme, que é bastante pigmentada e pode exibir septações em vários planos (LACAZ *et al.*, 2002). Estas formas podem ser obtidas *in vitro* em meio quimicamente definido adicionado de propanolol (ALVIANO *et al.*, 1992) e em meio com pH baixo contendo quelantes ou suplementado de cálcio, indicando que este pode ser um fator envolvido na indução

de células muriformes *in vitro* (MENDOZA *et al.*, 1993). Células escleróticas obtidas *in vitro* induzidas com propanolol possuem similaridade ultra-estrutural e antigênica com as células encontradas em lesões de pacientes (SILVA *et al.*, 2002). Estudos revelam que a diferenciação celular de *F. pedrosoi* em células escleróticas *in vivo*, pode ser obtida com a interação deste fungo com fator de agregação plaquetária (PAF) liberado por células do sistema imune (ALVIANO *et al.*, 2003).

O *Fonsecaea pedrosoi* é um fungo negro, taxonomicamente pertencente à classe Hyphomycetes, ordem Chaetothyriales, família Herpotrichiellaceae e gênero *Fonsecaea*. Apresenta hifas e conídios melanizados (DE HOOG *et al.*, 2000), sendo comumente encontrado no solo, na matéria orgânica, vegetais em decomposição e em tecidos vegetais vivos (ZEPPENFELDT, 1994; SALGADO *et al.*, 2004).

A análise morfológica do cultivo de *F. pedrosoi* mostra, macroscopicamente, uma colônia de aspecto aveludado, anverso escuro de coloração verde oliva a negro, e reverso negro. Microscopicamente, observam-se hifas septadas, ramificadas e de coloração marron-claro, que apresentam conidiação do tipo cladosporium, rhinocladiella e phialophora (LACAZ *et al.*, 2002).

Os fungos causadores da cromoblastomicose apresentam essencialmente pigmentação escura, devido à presença da melanina em suas paredes celulares. A melanina é constituída de polímeros multifuncionais, de alto peso molecular, formados a partir da polimerização oxidativa de compostos fenólicos (HAMILTON & GOMEZ, 2002). O *F. pedrosoi* produz melanina em grânulos citoplasmáticos, chamados de melanossoma e os envia à parede celular, onde são depositados em camadas concêntricas. A produção de melanina ocorre em ambiente ácido dentro dos melanossomos, os quais possuem uma matrix fibrilar que funciona como um sítio de suporte para a deposição de melanina (FRANZEN *et al.*, 1999; FRANZEN *et al.*, 2008). Esse pigmento possui um efeito inibidor da fagocitose, propriedade que pode ser considerada como um fator de virulência adicional. Além disso, bloqueia a oxidação por neutrófilos e inibe a morte intracelular de *Wangiella dermatidis* (FARBIARZ *et al.*, 1992; SCHNITZLER *et al.*, 1999). Em virtude disso, a melanina pode desempenhar uma importante função na patogênese das infecções causadas por fungos demáceos.

1.3. O MACRÓFAGO

Os macrófagos são células pertencentes ao sistema mononuclear fagocitário, originam-se de precursores da medula óssea e desempenham importantes funções no reconhecimento e resposta a microorganismos invasores, como a fagocitose, a apresentação de antígenos a linfócitos T e a secreção de citocinas para iniciar a resposta imune e inflamatória (MURREY, 1998).

Os macrófagos são conhecidos por influenciar na atividade celular e homeostase em vários tecidos, providenciar uma linha frontal de defesa contra antígenos invasores e células tumorais recém-formadas, e por servirem de células apresentadoras de antígenos para o reconhecimento inicial e remoção de células senescentes. Em resposta a estímulos provenientes de algum microorganismo ou de linfócitos ativados, os macrófagos modificam algumas de suas propriedades tais como: habilidade para aderir e espalhar-se em substratos, a taxa de endocitose e fusão de lisossomos com vacúolos endocíticos (RABINOVITCH, 1995; SILVERSTEIN, 1995). Entre as moléculas e receptores expressos pelos macrófagos estão moléculas MHC I e II, envolvidas no processo de apresentação de antígenos para os linfócitos T; receptores Fc para imunoglobulinas e receptores para o sistema complemento, envolvidos na fagocitose de partículas opsonizadas; receptores para anafilaxina e receptores manose/fucose, envolvidos na fagocitose de partículas não opsonizadas e receptores integrínicos, envolvidos na adesão e migração sobre moléculas da matriz extracelular (MURREY, 1998; STARFFORD, 2002).

A ativação dos macrófagos envolve a interação de citocinas com receptores presentes na membrana destas células, desencadeando uma série de eventos moleculares, que incluem: hidrólise de fosfatidilinositol, formação de diacilglicerol, alterações na concentração de cálcio citosólico, ativação de proteína quinase C, fosforilação de proteínas e alterações na transcrição gênica. Os macrófagos ativados, por sua vez, são capazes também de produzir grandes quantidades de metabólitos reativos do oxigênio e nitrogênio (H_2O_2 , O_2^- , OH^- , NO , $ONOO^-$), o que lhes confere alta capacidade microbicida e tumoricida (GREENBERG, 1995).

Macrófagos ativados são maiores que os não ativados, muitas vezes apresentando o dobro ou até mesmo o triplo de seu tamanho, principalmente devido ao aumento de volume citoplasmático, e são muito mais eficientes em destruir bactérias e outros patógenos. A variabilidade de estímulos que podem ativar macrófagos é muito grande: contato direto com microorganismos ou partículas inertes, com LPS bacteriano, produtos do próprio tecido danificado, com componentes protéicos do sistema complemento ou da coagulação sangüínea. A ativação pode também ser induzida por certas citocinas (principalmente o interferon gama/IFN- γ), que podem ser secretadas por linfócitos que estejam ao redor. Macrófagos ativados são ávidos fagócitos e englobam quaisquer partículas estranhas, fragmentos celulares, células senescentes ou danificadas encontradas por eles. Além disso, essas células reconhecem algumas partículas alvo através de seus receptores de superfície. Os macrófagos ativados também podem secretar uma variedade numerosa de substâncias biologicamente ativas que influenciam o crescimento e as atividades de outras células (KLINGEMANN, 1989; PIEMONTE & BUCHI, 2002).

O processo de fagocitose está intimamente relacionado aos fenômenos de adesão e espraiamento celular. Durante esses processos ocorre uma série de alterações estruturais nas células, que envolvem 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. Essas alterações conduzem a uma mudança na morfologia celular, possibilitando o aumento da área de contato da membrana plasmática da célula fagocitária com a superfície das partículas ou microorganismos a serem fagocitados. Além disso, o aumento da polimerização de filamentos de actina próximo à membrana plasmática acarreta a formação de projeções celulares e pseudópodos, que se estendem ao redor das partículas-alvo e promovem sua internalização (WRIGHT & MEYER, 1985; KLINGEMANN, 1989; PIEMONTE & BUCHI, 2002).

A fagocitose é um processo complexo contendo várias etapas através das quais uma partícula é ingerida, morta e digerida. Uma vez englobados a maioria dos microrganismos são mortos rapidamente. Talvez a principal função dos macrófagos ativados seja a grande capacidade de matar microrganismos e algumas células tumorais. Isso pode ocorrer através de mecanismos tanto oxidativos (oxigênio ou nitrogênio dependentes) nos quais reativos intermediários de oxigênio e de nitrogênio são produzidos, quanto não oxidativos (hidrolases ácidas, lisozimas e proteínas catiônicas). Os produtos de oxigênio produzidos pelos macrófagos incluem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila (OH.). O processo pelo qual esses são produzidos é conhecido como “burst” respiratório, variando em quantidade conforme o estágio de ativação dessas células. A resposta do “burst” respiratório, originalmente associada somente com a fagocitose, é hoje conhecida também por ser estimulada pelo sistema complemento e por imunoglobulinas, durante o simples contato com partículas ou com superfícies opsonizadas, independente da fagocitose (MAC MICKING *et al.*, 1997).

Um dos reativos intermediários de nitrogênio produzido por macrófagos ativados é o óxido nítrico (NO), que pode também ser produzido por outros tipos celulares e é importante em outros sistemas do corpo. O NO é derivado de átomos de nitrogênio guanidino da L-arginina e de oxigênio molecular, em uma reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Quando em solução aquosa, o óxido nítrico é uma molécula relativamente instável, apresentando uma meia-vida entre 3 e 15 s. Por isso, a produção de NO é normalmente medida indiretamente, através da determinação da concentração de seus produtos oxidativos, nitrito e nitrato, no soro ou sobrenadante de culturas celulares. A produção de óxido nítrico pode ser considerada uma característica típica de macrófagos ativados (MAC MICKING *et al.*, 1997).

O NO usado em respostas citotóxicas de macrófagos ativados é uma das principais moléculas efetoras da atividade microbicida e citotóxica contra fungos intra e extracelulares. É capaz de atuar diretamente sobre os patógenos, provocando efeitos inibitórios sobre diversos processos celulares, como crescimento e multiplicação (ADHUNA *et al.*, 2000).

1.4. FORMAÇÃO DE CÉLULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS

Os fagócitos mononucleares são células que, em casos específicos, têm a capacidade de se aderir e se fundir com outras células, formando células gigantes multinucleadas (CGMs). As células gigantes multinucleadas foram descritas pela primeira vez em 1868 por Langhans, o qual sugeriu que as células gigantes eram formadas por meio da fusão celular (HELMING & GORDON, 2008).

Sugere-se que os mecanismos envolvidos na fusão celular de macrófagos são os mesmos envolvidos na fusão vírus-célula e espermatozóide-ovócito (HERNANDEZ *et al.*, 1996). Entretanto, o significado funcional das CGMs durante a inflamação granulomatosa permanece indeterminado.

Acredita-se que CGMs são originadas a partir da fusão de macrófagos recrutados para o sítio de inflamação granulomatosa (CHAMBERS & SPECTOR, 1982). A fusão de macrófagos pode levar não somente a formação de CGMs, mas também é característico da formação dos osteoclastos. Embora CGMs e osteoclastos sejam formadas através da fusão de macrófagos, continua a ser elucidado se eles compartilham mecanismo similar de fusão e se eles exibem função análoga. O mecanismo molecular de fusão de macrófagos ainda está mal compreendido, mas dados recentes apóiam a hipótese de que a máquina molecular utilizada para formação de CGMs e osteoclastos possa, pelo menos em parte, ser idêntica (VIGNERY, 2005; YAGI *et al.*, 2005).

A formação dos osteoclastos é estimulada pelo ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL) e pelo fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) (YASUDA *et al.*, 1998), mas os estímulos que induzem a formação de CGMs *in vivo* são bem menos definidos e podem envolver citocinas presente no interior dos granulomas.

Demonstrou-se que a interleucina-4 (IL-4) induz a fusão de macrófagos e a formação de CGMs *in vitro* (MCINNES & RENNICK, 1988; MCNALLY & ANDERSON, 1995), que é necessária para a formação de células gigantes de corpo estranho (CGCEs) *in vivo* (KAO *et al.*, 1995) e também que é importante para a

formação de granulomas e CGMs durante a esquistossomose (CHENSUE *et al.*, 1992). A IL-4 induz não só a fusão de macrófagos, como medeia uma via alternativa de ativação de macrófagos em oposição à ativação clássica por interferon-gama (IFN- γ) (STEIN *et al.*, 1992). A ativação alternativa de macrófagos está associada a processos de reparo, atenuação da inflamação excessiva, alergias e defesa do hospedeiro contra infecções parasitárias (GORDON, 2003; HERBERT *et al.*, 2004). A ativação alternativa por IL-4 ou a estimulação com outras citocinas não parece induzir a formação de CGMs em todas as situações; outros fatores, como ovos de *Schistosoma mansoni*, micobactérias e o grau de ativação ou diferenciação dos macrófagos podem contribuir para a indução da fusão celular e formação de granulomas (HELMING & GORDON, 2008).

Helming & Gordon (2007) estabeleceram um novo sistema quantitativo bifluorescente para estudar a fusão de macrófagos murinos primários *in vitro* induzida por IL-4 e estabeleceram que diferentes populações de macrófagos primários exibem capacidades distintas para formar CGMs; além disso, especularam que além da IL-4, outros fatores contribuem para a fusão dos macrófagos *in vitro* e *in vivo*. Por exemplo, o dipeptídeo muramyl, um peptídeoglicano componente da parede celular de bactérias, influencia as características morfológicas das CGMs *in vitro* (MIZUNO *et al.*, 2001).

Monócitos isolados da medula óssea de camundongos, bem como monócitos/macrófagos humanos podem ser induzidos à fusão em resposta a IL-4 (MCLNNES & RENNICK, 1988; MCNALLY & ANDERSON, 1995) e IL-13 (DEFIFE *et al.*, 1997). Não está claro se IL-4/IL-13, as quais agem através de uma cadeia comum de receptor alfa IL-4R, também contribuem para a fusão de macrófagos dentro do granuloma tuberculóide.

A fusão célula-vírus tem sido extensivamente estudada e os mecanismos que conduzem a fusão viral são similares aos que determinam a fusão célula-célula, pois ambos são determinados por uma maquinaria análoga (SOLLNER, 2004), e esses achados podem ser utilizados para desvendar o processo de fusão de macrófagos. A glicosilação é um fator determinante na fusão célula-vírus. As proteínas de fusão virais são principalmente glicoproteínas e sua correta glicosilação

é indispensável para seu bom funcionamento e apropriada conformação (OHUCHI *et al.*, 1997). Além disso, carboidratos estruturais da célula hospedeira desempenham importantes funções na ligação e entrada do vírus (MARSH & HELENIUS, 2006).

Sugere-se que a formação de macrófagos multinucleados *in vitro* pode ser induzida através da adição de lecitinas como a Concavalina A (ConA) e a fito-hemaglutinina à cultura de macrófagos (CHAMBERS, 1977; TAKASHIMA *et al.*, 1993). Lecitina de *lens culinaris* (LCA) e ConA se ligam a resíduos de manose terminais, mas de maneira intrigante, foi sugerido que receptores de manose de macrófagos estariam diretamente envolvidos na formação de macrófagos multinucleados induzidos por IL-4, uma vez que a adição de manana em cultura teria inibido a fusão de macrófagos (MCNALLY *et al.*, 1996). No entanto, Helming & Gordon (2007), estudaram camundongos knockout para receptor de manose e não detectaram redução na formação do granuloma induzido por IL-4, chegando à conclusão de que o receptor de manose não é essencial para a fusão de macrófagos.

Recentemente, o receptor Tm7 (Família de sete proteínas transmembrana) DC-STAMP (Proteína transmembrana específica de célula dendrítica) foi implicado na fusão de macrófagos (YAGI *et al.*, 2005). O DC-STAMP é regulado positivamente por IL-4 em macrófagos (STAEGE *et al.*, 2001) e demonstrou ser essencial não só na multinucleação de macrófagos induzida por IL-4, mas também na formação de osteoclastos *in vitro* e *in vivo* (YAGI *et al.*, 2005). Muito embora DC-STAMP esteja envolvido na fusão de macrófagos, ela não é a única molécula envolvida no processo de fusão de macrófagos (HELMING & GORDON, 2007).

A quimiotaxia pode ser um fator determinante na fusão de macrófagos, já que eles podem secretar quimiocinas ou moléculas homólogas, levando a atração de outros macrófagos e a agregação celular que antecede o processo de fusão. Por exemplo, a quimiocina CCL2 está envolvida na formação de CGCEs bem como na osteoclastogênese (KIM *et al.*, 2006; KYRIAKIDES *et al.*, 2004). Em adição, mostrou-se que o fator-L quimiotático de eosinófilo (ECF-L) aumenta a formação dos osteoclastos (GARCIA-PALACIOS *et al.*, 2007).

As moléculas de adesão também desempenham um papel crucial durante a formação de macrófagos multinucleados. Em 2002, MacNally & Anderson, reportaram que $\beta 1$ e $\beta 2$ integrinas participam da adesão celular durante o processo de fusão de macrófagos. Também foi verificado que anticorpos anti-ICAM-1 e anti-LFA-1 inibem a formação de CGMs e osteoclastos (FAIS *et al.*, 1994; KAZAZI *et al.*, 1994; OKADA *et al.*, 2002). A proteína de adesão E-caderina é expressa em osteoclastos humanos e murinos, sendo que a inibição da sua função por anticorpos e antagonistas impede a fusão dos precursores de osteoclastos (MBALAVIELE *et al.*, 1995). O CD44, molécula de adesão transmembrana envolvida na ligação e metabolismo do ácido hialurônico, também está envolvida na fusão de macrófagos. (CUI *et al.*, 2006; STERLING *et al.*, 1998). A interação entre dois membros da superfamília das imunoglobulinas, CD47 (proteína associada à integrina, IAP) e o receptor de fusão de macrófagos (MFR, Sirp- α , SHPS-1, BIT, P84) pode desempenhar um papel significativo durante a formação de CGMs. O bloqueio com anticorpos contra CD47 e MFR pode impedir a fusão de macrófagos (HAN *et al.*, 2000; SAGINARIO *et al.*, 1998). CD47 e MFR, também foram implicados na formação de osteoclastos e a deficiência de CD47 resultou em osteoclastogênese reduzida *in vitro* e *in vivo* (LUNDBERG *et al.*, 2007).

É possível que mecanismos comuns ou moléculas selecionadas sejam compartilhados por todos os processos de fusão celular. As tetraspaninas são proteínas integrais de membrana e têm sido associadas a diversos eventos de fusão célula-célula. Mas, os mecanismos pelos quais as tetraspaninas regulam a fusão celular ainda não estão completamente esclarecidos. É possível que elas sirvam como organizador molecular da superfície celular, para que outras proteínas regulem a fusão célula-célula (HELMING & GORDON, 2008). Fêmeas de camundongos knockout para CD9 e CD81 tiveram sua fertilidade reduzida em virtude da deficiência na fusão ovócito-espermatozóide (KAJI *et al.*, 2000; MIYADO *et al.*, 2000; RUBINSTEIN *et al.*, 2006a). Ambas as moléculas também estão envolvidas na fusão de células musculares (TACHIBANA & HEMLER, 1999) e alguns autores demonstraram que CD9 e CD81 podem estar envolvidos na formação de células gigantes e na osteoclastogênese (ISHII *et al.*, 2006; TAKEDA *et al.*, 2003).

A fertilina- β (ADAM-2) e a ciritestina (ADAM-3), membros da família das desintegrinas e metaloproteases (ADAM) estão envolvidas no processo de fusão ovócito-espermatozóide. Embora estudos tenham demonstrado que elas são indispensáveis para a fertilização (RUBINSTEIN *et al.*, 2006b). ADAM-1, ADAM-9 e ADAM-11 compartilham características bioquímicas com proteínas virais de fusão e podem conter potenciais peptídeos de fusão. Além disso, sugere-se que ADAM-9 está envolvido com a fusão de macrófagos (NAMBA *et al.*, 2001). Já o ADAM-12 (Meltrina- α) parece ser importante durante a fusão de mieloblastos (YAGAMI-HIROMASA *et al.*, 1995) e também se apresentou como um mediador na formação de CGMs e osteoclastos (ABE *et al.*, 1999).

A FRP-1 (Proteína regulatória de fusão, CD98 de cadeia pesada) foi identificada por isolamento de anticorpos monoclonais que estavam aumentados na fusão celular induzida por vírus (ITO *et al.*, 1992) o CD98 é uma proteína multifuncional ligada à adesão, fusão e transporte de aminoácidos (DEVES & BOYD, 2000) e pode regular a fusão de macrófagos por ligação com o sistema RANK/RANKL, podendo não ser considerado um regulador direto da fusão (HELMING & GORDON, 2008).

O receptor purinérgico P2X₇ é um canal de íons diretamente aberto por ATP extracelular o qual forma um poro não-seletivo após estimulação repetitiva por ATP (DI VIRGILIO *et al.*, 1999). Por essa habilidade de formar poros foi sugerido que esteja envolvido na fusão de macrófagos. O bloqueio de P2X₇ inibe a formação de macrófagos multinucleados (FALZONI *et al.*, 2000). Apesar da associação com a fusão de macrófagos, o receptor P2X₇ não é exigido para a formação de osteoclastos (KE *et al.*, 2003).

Helming & Gordon (2008) propõem que a formação de CGMs dentro de um granuloma é induzida pelo micro-ambiente local composto por citocinas e sinais derivados de bactérias, fungos ou outros materiais estranhos (Figura 05). Os macrófagos têm que se agregar, processo que poderia ser regulado por fatores quimiotáticos. A membrana plasmática tem que entrar em estreito contato via fatores de adesão. Então, várias proteínas entram em ação para promover contatos entre as

membranas hidrofóbicas de diferentes células e para mediar a subsequente reorganização e reparo da membrana. A fusão da membrana pode ser mediada por interações específicas de ligantes desconhecidos na superfície de uma célula com receptores específicos associados à fusão. Em adição, a fusão pode ser regulada por sinais positivos ou negativos promovidos por proteínas de membrana e componentes de sinalização intracelular.

A fusão de macrófagos pode conseqüentemente, envolver uma maquinaria constituída por diversas moléculas funcionais. Apesar dos diversos candidatos a mediadores da fusão de macrófagos, mais estudos são necessários para avaliar a suas especificidades e os mecanismos envolvidos durante a formação de macrófagos multinucleados.

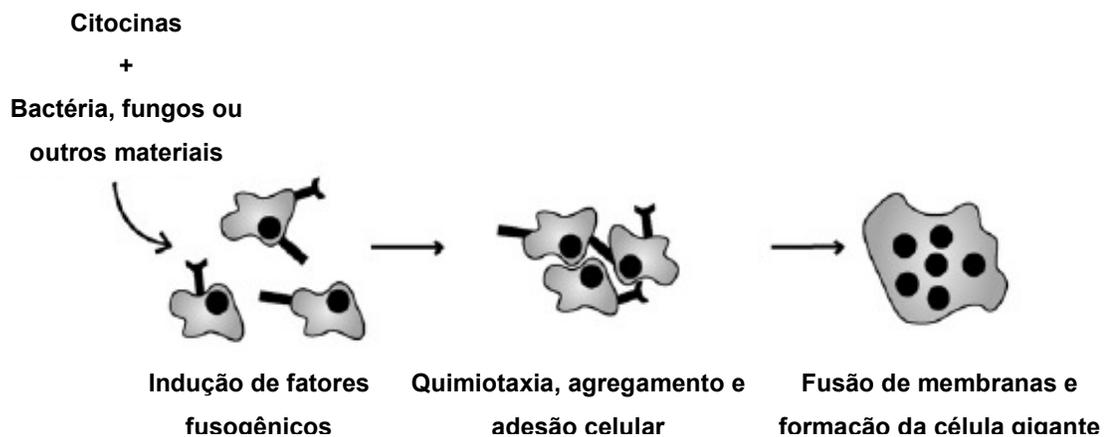


Figura 05: Esquema mostrando os supostos mecanismos da fusão de macrófagos. O microambiente local composto por citocinas e sinais derivados estímulos de bactérias ou fungos induzem a expressão de fatores fusogênicos. Fatores quimiotáticos podem mediar a adesão e agregamento dos macrófagos adjacentes (Fonte: Adaptada de Helming & Gordon, 2008).

1.5. INTERAÇÃO FUNGO-HOSPEDEIRO

As doenças fúngicas têm emergido nos últimos tempos, principalmente devido ao aumento do número de pessoas imunocomprometidas. Existem aproximadamente 100.000 espécies de fungos, sendo que apenas algumas são conhecidas como causa de infecções humanas. Esses organismos são de caráter oportunista, causando infecções quando a defesa do hospedeiro encontra-se prejudicada.

A resposta imune contra os fungos varia de acordo com as espécies encontradas. A importância relativa dos mecanismos de defesa inatos e adaptativos difere, dependendo do tipo de organismo e do sítio da infecção. Além disso, os fungos patogênicos desenvolvem mecanismos para evadir e corromper as defesas do hospedeiro. A morfologia também pode ser um fator determinante da resposta contra o patógeno. Por exemplo, enquanto leveduras e esporos são eficazmente fagocitados, o tamanho da hifa pode impedir a sua ingestão efetiva (SHMUEL *et al.*, 2005).

A maior característica da resposta imunológica é a interdependência entre as diversas armas do sistema imune e a interação entre a defesa do hospedeiro e os mecanismos fúngicos patogênicos. Dentre os diversos mecanismos que atuam na resposta antifúngica, encontram-se os macrófagos, neutrófilos e monócitos, que são importantes células efetoras. Os macrófagos residentes estão situados em vários locais do corpo e formam a primeira linha de defesa, estando aptos a iniciar uma reação inflamatória através da liberação de mediadores químicos. O número dessas células no tecido pode ser modificado em resposta a um dano ou infecção, já que os macrófagos estimulados ou ativados podem ser recrutados rapidamente. Estas células possuem maior eficiência na liberação de mediadores e enzimas, auxiliando na amplificação imunológica contra a maioria das infecções. Vale ressaltar, que a fagocitose é um dos principais mecanismos utilizados na tentativa de destruir ou danificar o fungo. As células efetoras adicionais, incluindo neutrófilos e monócitos, são recrutadas para o sítio de infecção através de sinais inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e componentes do sistema complemento. Os fungos são

mortos ou danificados pela produção e liberação de reativos intermediários do oxigênio e peptídeos antimicrobianos (GORDON *et al.*, 1988; MAMBULA *et al.*, 2000; SHMUEL *et al.*, 2005).

As células dendríticas são apresentadoras profissionais de antígenos do sistema imune e iniciam a imunidade inata e adaptativa contra os microorganismos. Estas células capturam e processam antígenos, expressam as moléculas co-estimulatórias, migram para os órgãos linfóides e secretam citocinas para iniciar a resposta imune (LIU *et al.*, 2001). As células dendríticas são um instrumento essencial na ligação entre a resposta inata e adaptativa contra fungos. Os sinais transmitidos por elas podem variar de acordo com a espécie e morfologia do patógeno encontrado, influenciando assim o tipo de resposta que será realizado (BOZZA *et al.*, 2002; BAUMAN *et al.*, 2000).

A diferenciação de células T CD4⁺ em células efetoras, que se desenvolvem mais comumente em células T helper tipo 1 (Th1) e 2 (Th2), é o caminho para o desenvolvimento da resposta Th específica, sendo fundamental para determinar a suscetibilidade ou resistência à infecção fúngica pelo hospedeiro. O desenvolvimento da resposta Th1 é influenciado por diversos fatores, incluindo a ação conjunta de citocinas, como o interferon-gama (IFN- γ), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-12 (IL-12), na ausência de citocinas com perfil Th2, como IL-4 e IL-10. A predominância das citocinas do tipo Th1 sobre a Th2 está relacionada à proteção contra várias micoses (ROMANI, 2004).

A resposta imune na cromoblastomicose tem sido bastante investigada. Esterre *et al.* (2000) verificaram que os níveis de anticorpos em pacientes com cromomicose diminuem durante a quimioterapia específica. Também tem sido demonstrada a presença de um alto número de macrófagos em tecidos de biópsias de pacientes com cromoblastomicose (SOTTO *et al.*, 2004).

A análise de 19 casos de cromomicose no Brasil (D'ÁVILA *et al.*, 2002), demonstrou que as diferentes formas clínicas manifestadas podem estar relacionadas com distintas reações no hospedeiro. Em pacientes com uma boa

resposta (forma atópica), demonstrou-se o desenvolvimento de uma resposta satisfatória, com a formação de granulomas, expressão do fenótipo celular e de citocinas compatíveis com perfil Th1. Por outro lado, na resposta fraca (Lesões graves) não se verificou a formação de granulomas verdadeiros e o fenótipo encontrado mostrou a presença de células inflamatórias e a expressão de citocinas com o padrão de resposta Th2. Apesar de ter ocorrido fagocitose, o dano e a morte das células fúngicas têm sido raramente observados. Acredita-se que a persistência do fungo *in situ* é o principal fator responsável pela morbidade na doença. Neste estudo, também sugerem que a persistência do fungo e sua capacidade de multiplicação, na presença da resposta inflamatória, estejam relacionadas à ausência de reação granulomatosa verdadeira. Isso, provavelmente é uma consequência de fatores que inibem a resposta Th1, fazendo com que haja predomínio da resposta Th2.

A análise da resposta proliferativa a antígenos de cromomicose (GIMENES *et al.*, 2005) demonstrou que células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes portadores da forma branda da doença apresentam altos níveis de proliferação, com altos níveis de IFN- γ e baixos níveis de IL-10. Esse perfil de resposta Th1 pode ser responsável por uma resposta imune eficiente, capaz de prevenir o desenvolvimento da doença. Por outro lado, as células provenientes de pacientes com a forma grave não são capazes de proliferar na presença do antígeno, indicando que nesse caso, a resposta específica de células T é inibida. Esse fato, aliado aos altos níveis de IL-10 e baixos níveis de IFN- γ , pode resultar na depressão da resposta imune celular e na manifestação grave da doença. O nível de TNF- α foi o mesmo nas diversas formas da doença e a produção de IL-4 não foi detectada.

Alguns estudos têm enfatizado a interação fungo-hospedeiro, demonstrando predominantemente a resposta imune celular com a ativação de macrófagos envolvidos na fagocitose do fungo. De modo geral, o processo de interação entre um fungo e a célula-alvo envolve três etapas: adesão, internalização do fungo e destino intracelular (MILDER, 1980; OSUMA *et al.*, 1986).

Estudos prévios (FARBIARZ *et al.*, 1990), evidenciaram que macrófagos residentes têm atividade fungistática, mas não fungicida, contra *F. pedrosoi* e que após 24 horas de interação os macrófagos são completamente destruídos pelo fungo. Rozental *et al.* (1994), demonstraram que macrófagos ativados têm efeito fungistático contra *F. pedrosoi* e provocam mudança na morfologia do fungo, retardando a formação do tubo germinativo e da hifa.

Na interação do *F. pedrosoi* com neutrófilos (ROZENTAL *et al.*, 1996), sugeriu-se que os neutrófilos são capazes de matar o fungo externamente à célula fagocítica por um processo independente da presença de anticorpos, envolvendo a produção e liberação de produtos intermediários do oxigênio e processos fagocíticos seguidos por fusão de fagossomos com grânulos contendo peroxidase.

Na etapa inicial de reconhecimento celular, a constituição química da parede dos fungos desempenha um papel essencial, já que esta é a estrutura mais superficial, sendo a primeira a entrar em contato com a célula hospedeira. A parede celular dos fungos é constituída basicamente de quitina, glucana e manana (SAN-BLAS, 1982; MURPHY, 1991). Um importante constituinte da superfície celular do *F. pedrosoi* e de outros fungos demáceos é a melanina. Este pigmento é sintetizado no citoplasma e se acumula nas camadas mais externas da parede celular. Acredita-se que a melanina pode estar relacionada a mecanismos de escape, protegendo o fungo contra os efeitos microbicidas de macrófagos ativados (ALVIANO, 1991; ELLIS, 1974).

Tem sido evidenciado que polissacarídeos de fungo, localizados na parte exterior da parede celular, são reconhecidos por anticorpos, receptores de plantas, lectinas e fímbrias bacterianas (LLOYD, STROBEL & ALVIANO *appud* SOARES, 1995). Em *F. pedrosoi*, foram detectados glicose, manose, galactose, ramnose e glicosamina, como componentes da parede celular de micélios e conídios. A composição de açúcares está associada com a morfogênese celular do fungo, já que a galactose foi altamente encontrada em micélios, enquanto que a ramnose foi preferencialmente aumentada em conídios. Ácidos palmítico, esteárico, oléico, linoleico e aracdônico foram detectados como componentes da fração total de lipídios do *F. pedrosoi*. Diferença na composição de esterol também foi associada

com a morfogênese do fungo, indicando que os lipídios podem estar ligados com o polimorfismo do fungo e são capazes de influenciar a sua interação com a célula alvo (SOARES *et al.*, 1995).

Os resíduos de carboidratos expostos na superfície da célula hospedeira estão envolvidos com a ligação e interiorização de *F. pedrosoi* por células de vertebrados. Sugerem que o fungo possua adesinas ou complexos de glicoconjugados capazes de reconhecer resíduos de manose e N-acetilglicosamina. No entanto, são necessários mais estudos para identificar e caracterizar as macromoléculas envolvidas no processo de interação (LIMONGI *et al.*, 1997).

O estudo *in vitro* da relação fungo-hospedeiro tem sido de grande importância para o melhor entendimento dos mecanismos de patogenicidade envolvidos nas infecções fúngicas, contribuindo para o estudo das suas propriedades antigênicas, bem como para novas abordagens terapêuticas. A análise da formação de células gigantes correlacionada com a secreção de citocinas pró- e anti-inflamatórias utilizando células de duas linhagens distintas de camundongos, possibilitará o melhor entendimento do processo fisiopatológico da formação de células gigantes e, no futuro, de granulomas *in vitro*, além do melhor entendimento dos processos de defesa imunológica dos camundongos C57/BL6 e BALB/c na interação com o fungo negro *F. pedrosoi*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os diferentes aspectos da interação de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57/BL6 com conídios ou células escleróticas de *Fonsecaea pedrosoi*, induzidas *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar as características morfológicas dos macrófagos na interação com o fungo.
- Contabilizar o índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongos cultivados com conídios ou células escleróticas em diferentes tempos.
- Calcular o índice de fagocitose na interação de macrófagos com conídios ou células escleróticas em diferentes tempos.
- Determinar o índice de fusão celular de macrófagos peritoneais infectados com conídios ou células escleróticas em diferentes tempos.
- Identificar citocinas secretadas no sobrenadante das culturas através da técnica de ELISA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. AMOSTRAS FÚNGICAS

A cepa de *F. pedrosoi* utilizada neste estudo foi cedida pelo Laboratório de Dermato-Imunologia/UEPA/UFPA/MC, onde está catalogada sob a inscrição de LDI-16, tendo sido isolada de material biológico proveniente do raspado de lesão verrucosa de um dos pacientes atendidos na URE Marcello Candia. A sua identificação foi feita com base em dados laboratoriais, tais como macroscopia da colônia (Figura 06) e microscopia ótica através do microcultivo (Figura 07) das colônias (RIDDEL, 1950). O fungo foi cultivado em Ágar-batata (Merck, Alemanha) e mantido a temperatura ambiente durante 15 dias, sendo realizado o repique periodicamente.

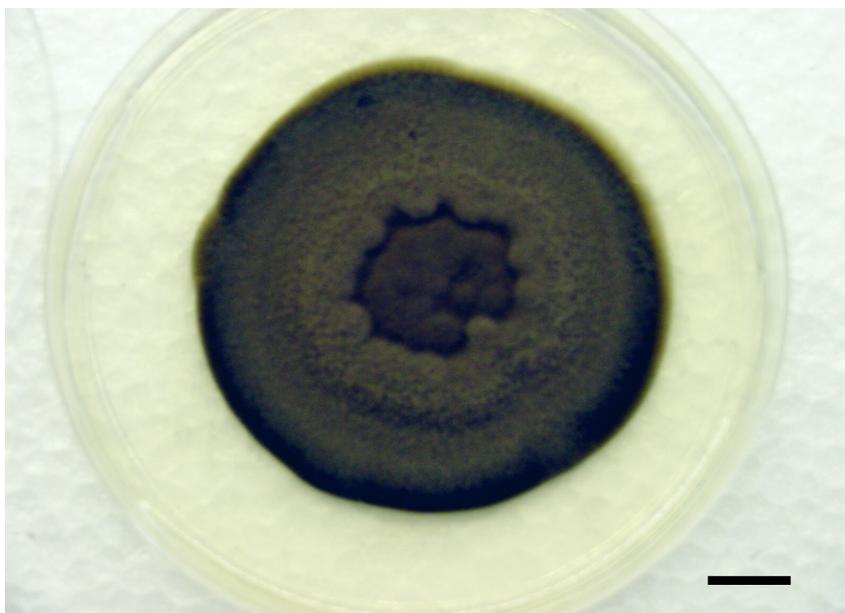


Figura 06: Macroscopia da colônia de *Fonsecaea pedrosoi*. O cultivo do material obtido da lesão do paciente, cultivado em micosele, apresenta-se após 15 dias em cultivo com a superfície aveludada e anverso escuro, com coloração próxima ao verde-oliva. Barra: 1cm (Fonte: Laboratório de Dermato-Imunologia).



Figura 07: Microcultivo de *Fonsecaea pedrosoi*. A colônia obtida foi cultivada em um bloco de ágar-batata entre lâmina e lamínula. Após 15 dias verificou-se a presença de conidiação holoblástica e simpodial característica do tipo Clasdosporium. Barra: 10µm (Fonte: Laboratório de Dermatologia).

3.2. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados camundongos isogênicos BALB/c e C57/BL6 com 4 a 8 semanas de vida, fornecidos e mantidos pelo biotério do Instituto Evandro Chagas (IEC), alimentados com ração e água *ad libitum*.

3.3. ISOLAMENTO E CONTAGEM DE CONÍDIOS

Após 15 dias de cultivo em Ágar-Batata, a massa fúngica da superfície da colônia foi transferida para 10 mL de água destilada estéril em tubo de ensaio com fundo cônico de 15 ml (TPP, Suíça) e agitada em vortex por 1 minuto para a separação das hifas e conídios. Em seguida, foram filtrados para outro tubo através

de uma membrana de nylon, e centrifugados a 4000 rpm por 5 minutos, tendo o volume reduzido a 1 mL. Realizou-se então contagem em câmara de Neubauer para definir a concentração de conídios por mL, que seria utilizada para a indução de células escleróticas e interação com macrófagos.

3.4. INDUÇÃO DE CÉLULAS ESCLERÓTICAS

Os conídios isolados foram colocados em placas para cultura de 24 poços (TPP, Suíça), contendo meio quimicamente definido acrescido de 100 µL de solução de Cloranfenicol 50% em um volume total de 2 mL, mantidos a temperatura ambiente por 48 horas, para a transformação dos conídios em células escleróticas (Figura 08). A proporção utilizada é de 3×10^3 conídios/mL de acordo com técnica anteriormente descrita (SILVA, 2003).



Figura 08: Células escleróticas obtidas nos meios quimicamente definidos. Após 5 dias de cultivo. Apresentam as características clássicas de coloração, tamanho (barra 10µm) e divisão planária (setas) (Fonte: Laboratório de Dermato-Imunologia).

3.5. OBTENÇÃO E CULTIVO DE MACRÓFAGOS

Os macrófagos utilizados para a interação foram isolados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c e C57/BL6. Os animais foram sacrificados por torção cervical e os macrófagos obtidos através de lavagem peritoneal, injetando-se com agulha e seringa 5 a 10 mL de soro fisiológico (Equiplax, Brasil) estéril gelado no peritônio e massageando-se lentamente. Posteriormente, fez-se um pequeno corte no peritônio e com a seringa aspirou-se o líquido e colocou-se em um tubo de 15 mL. O material aspirado foi lavado com soro, sendo submetido à centrifugação de 1500 rpm por 3 minutos e ressuspenso em RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, USA) suplementado com soro fetal bovino a 10% (Nutricell, Campinas, Brasil), solução de penicilina/estreptomicina (Sigma, St. Louis, USA) e 2-mercaptoetanol (Merck, Alemanha) (ARORA *et al.*, 1991).

Em seguida, uma alíquota de 70 µL da suspensão de células foi distribuída em lamínulas de vidro quadrada estéril de 5,0×5,0 mm, as quais foram incubadas durante 2 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ para possibilitar a adesão dos macrófagos. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas com soro para remover as células não aderidas e os macrófagos aderidos incubados em placas de 24 poços contendo 500 µL de meio RPMI 1640 por 24 horas. A quantidade obtida foi de aproximadamente 5×10^4 macrófagos/lamínula, sendo o cálculo realizado através da contagem em microscópio óptico após coloração com Giemsa. A contagem foi feita em objetiva de 20x, calculando-se primeiramente o número de campos em dois lados da lâmina, depois se multiplicou esses números para achar o total de campos da lamínula. Então, encontrou-se a média da contagem de 5 campos e multiplicou-se pelo número total de campos para encontrar o número total de macrófagos na lâmina (Figura 09).

3.6. INTERAÇÃO MACRÓFAGO × *Fonsecaea pedrosoi*

Os macrófagos isolados foram co-cultivados com conídios ou células escleróticas de *Fonsecaea pedrosoi*, em meio RPMI 1640 nas placas de cultura de 24 poços a 37°C e atmosfera a 5% de CO₂ nos tempos de 1h, 3h, 24h, 48h e 72h. A

proporção de macrófago/fungo utilizada foi de 1:10. Em todos os experimentos foram realizados grupos controles com macrófagos, conídios e células escleróticas cultivados isoladamente.

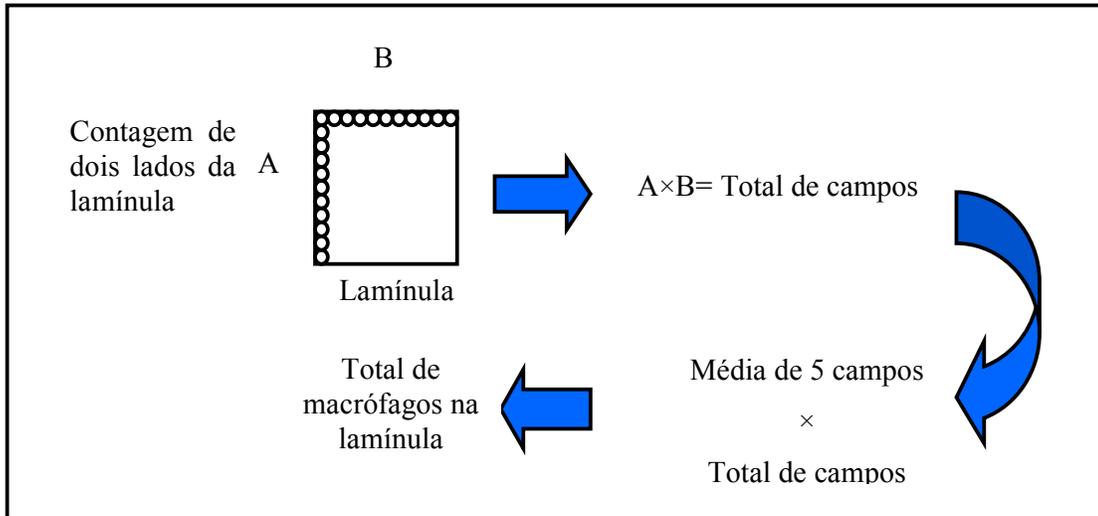


Figura 09: Esquema para a contagem do número total de macrófagos na lamínula (Fonte: Laboratório de Dermato-Imunologia).

3.7. COLORAÇÃO COM GIEMSA

Após os períodos de interação as lamínulas foram retiradas, lavadas com soro fisiológico, fixadas em metanol durante 1 minuto, coradas com solução 5% de Giemsa diluída em água tamponada por 30 minutos e montadas sobre uma lâmina de vidro, utilizando-se como resina o supermount (BioGenex, San Ramon, USA).

3.8. DETERMINAÇÃO DOS ÍNDICES DE INFECÇÃO, FAGOCITOSE E FUSÃO CELULAR

Os índices de infecção, fagocitose e fusão celular dos macrófagos peritoneais foram determinados pela quantificação das células em microscópio óptico comum após coloração pelo Giemsa. As lamínulas foram contadas em

duplicata, quantificando-se 500 macrófagos por lamínula. O índice de infecção foi determinado contando-se o número total de macrófagos e o número de macrófagos infectados. Para a determinação do índice de fagocitose contou-se o número médio de fungos por macrófago. O índice de fusão celular dos macrófagos peritoneais foi determinado pela contagem do número de núcleos dentro das células gigantes multinucleadas (CGM) em uma determinada área (≥ 3 núcleos por célula) e do número total de núcleos na mesma área (MIZUNO, 2004). Os dados são calculados de acordo com as seguintes fórmulas:

$$\text{Índice de Infecção (\%)} = \left(\frac{\text{Número de macrófagos infectados}}{\text{Número Total de macrófagos contados}} \right) \times 100$$

$$\text{Índice de Fagocitose} = \text{Média do Número de Fungos por Macrófago}$$

$$\text{Índice de Fusão Celular (\%)} = \left(\frac{\text{Número de núcleos nas CGM}}{\text{Número total de núcleos contados}} \right) \times 100$$

3.9. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS ATRAVÉS DO TESTE DE ELISA

A presença de citocinas nos sobrenadantes foi medida utilizando os seguintes kits de ELISA: TNF- α e IL-10 (BD Biosciences, San Jose, CA), segundo protocolo dos fabricantes. A leitura das placas foi realizada na absorbância de 450nm em uma leitora de ELISA (MRX Revelation-DINEX MB/USA). Todos os sobrenadantes foram analisados em triplicata e os resultados foram expressos em pg/mL.

3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa Graphpad Prism 4.0. O teste empregado foi o teste *t-student* com nível de significância $p < 0.05$ e também foi calculado o desvio padrão.

4. RESULTADOS

4.1. ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA INTERAÇÃO

A análise morfológica da interação, entre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ou C57/BL6 e o *F. pedrosoi*, revelou que houve fagocitose do fungo após 1 hora em todas as interações, o que pode ser observado na figura 10.

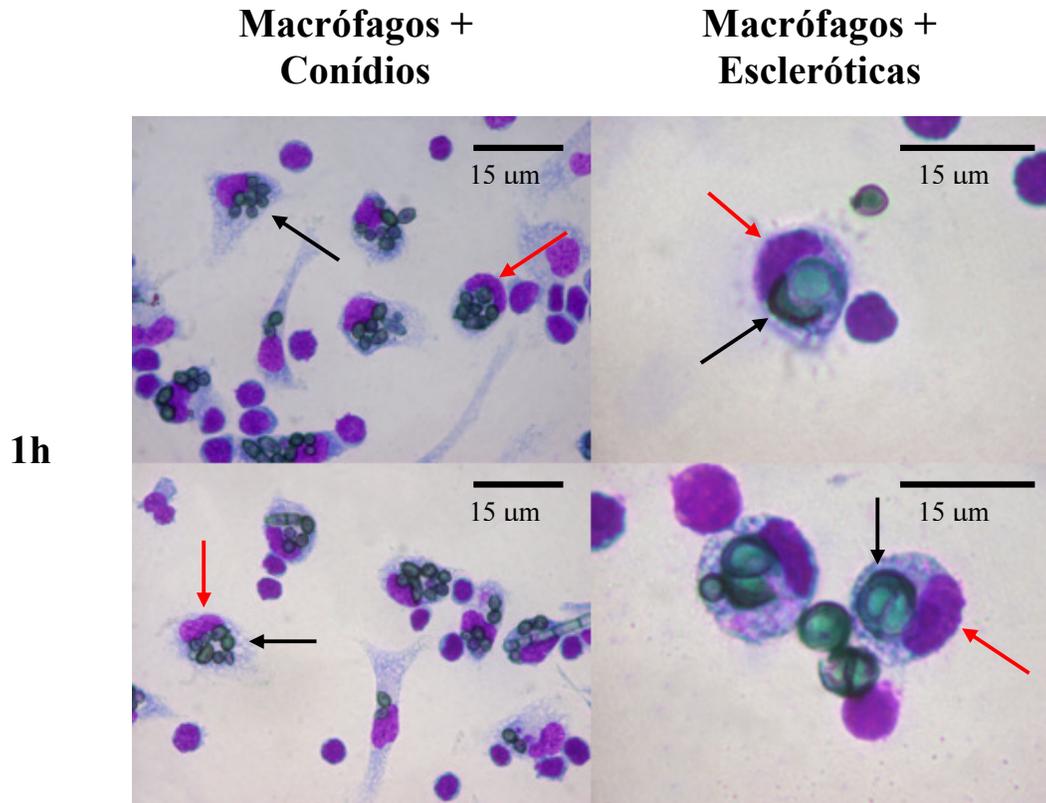


Figura 10: Macrófagos de camundongos BALB/c infectados com conídios ou células escleróticas de *F. pedrosoi*. Pode-se visualizar os fungos no interior dos macrófagos (Setas pretas) e o núcleo dos macrófagos rebatidos para periferia (Setas vermelhas).

O número de células escleróticas ou conídios fagocitados não diferiu entre as duas espécies de camundongos estudadas. No entanto, apesar do número de conídios fagocitados nas duas espécies ser o mesmo, observou-se a presença de vacúolos aumentados nos macrófagos de camundongos C57/BL6, enquanto que nos macrófagos de BALB/c, os vacúolos raramente são visualizados por microscopia

óptica (Figura 11). Isso revela que há diferenças morfológicas na resposta fagocítica em tipos distintos de camundongos.

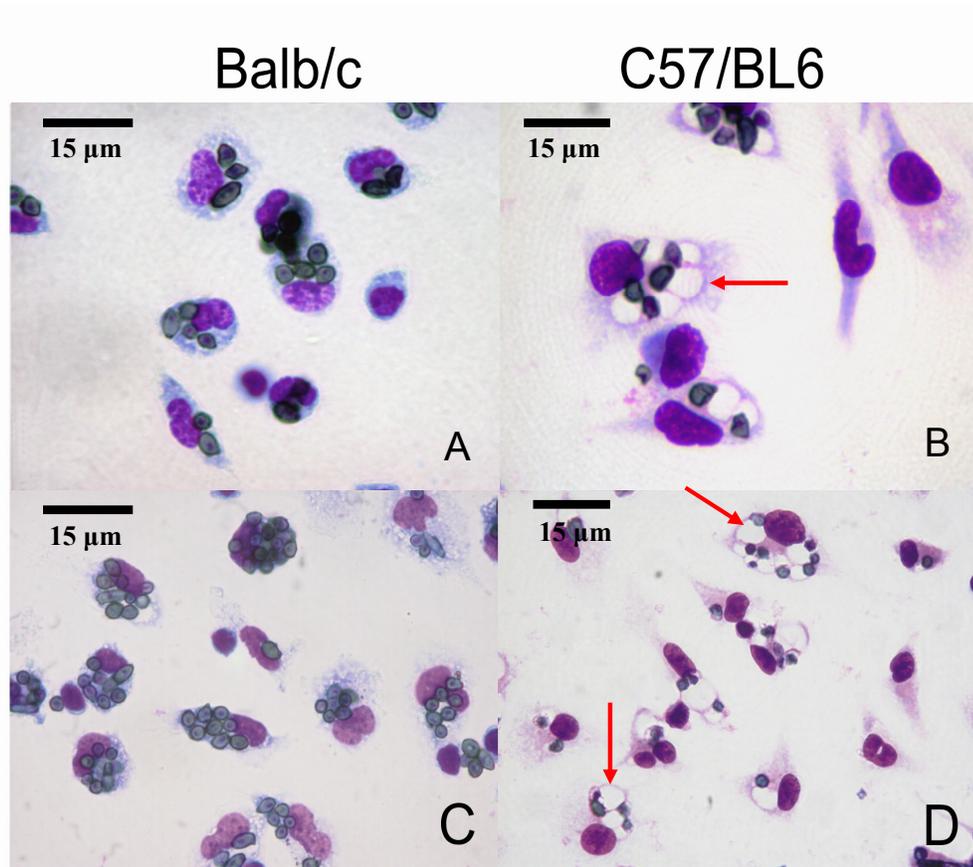


Figura 11: Macrófagos de camundongos BALB/c ou C57/BL6 infectados com conídios de *F. pedrosoi* apresentam diferente morfologia após 24 horas de interação. Após a interação de conídios com macrófagos de camundongos C57, observou-se a presença de vários vacúolos (B e D), usualmente apresentando 1 vacúolo para cada conídio (setas). Na interação com macrófagos de camundongos BALB/c, não foi possível visualizar os vacúolos (A e C).

Não há a formação de células gigantes em macrófagos cultivados isoladamente. Na interação de macrófagos de BALB/c (Figura 12) ou C57/BL6 (Figura 13) com conídios ou células escleróticas, verificou-se a formação de células gigantes. Enquanto que a interação com conídios estimulou a formação de células gigantes do tipo corpo estranho, a interação com células escleróticas originou a formação de células gigantes do tipo Langhans, de modo semelhante às células encontradas *in vivo* (Figura 14).

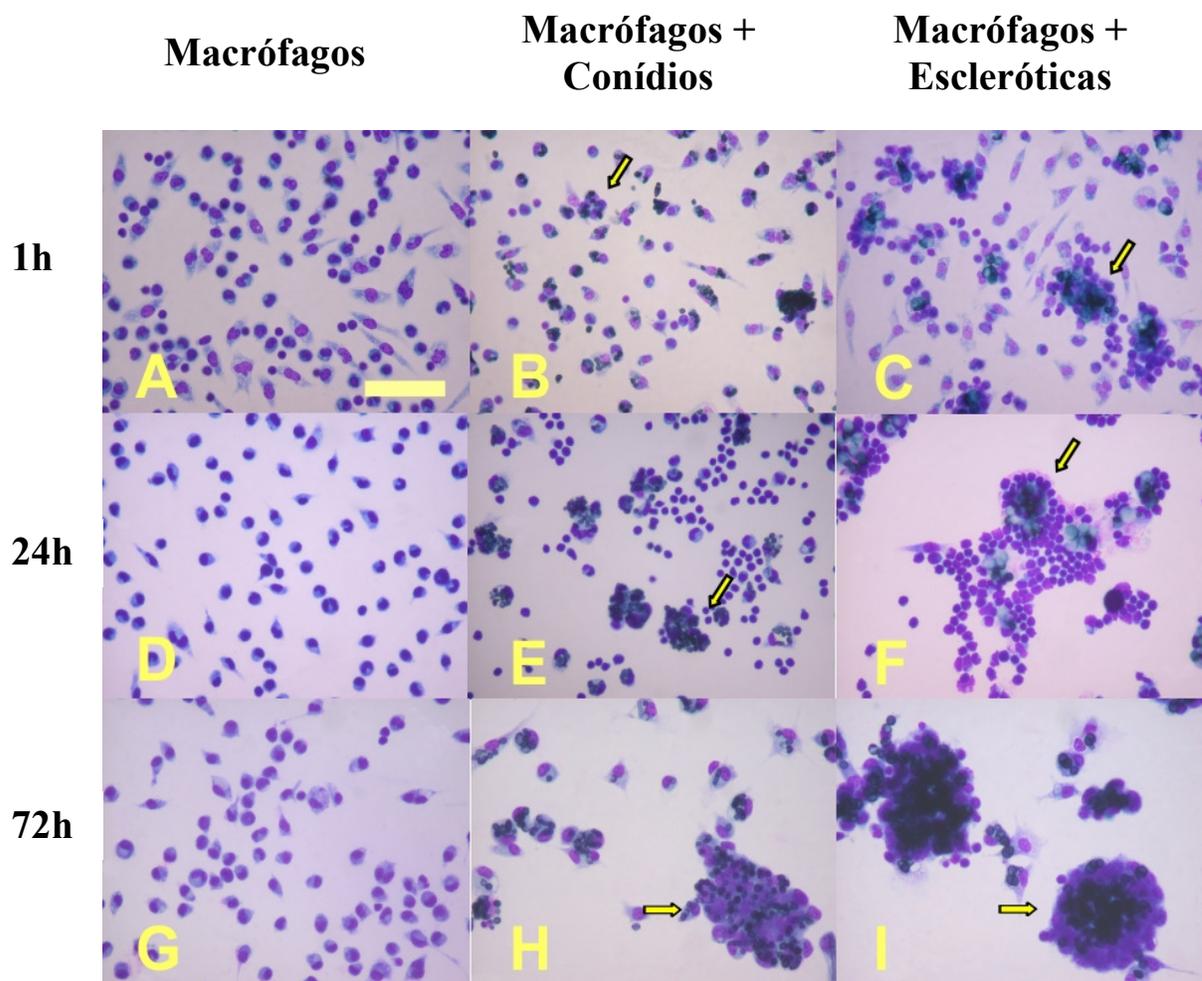


Figura 12: Co-cultivo de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c com conídios ou células escleróticas de *F. pedrosoi*. Barra: 40 μ m. Setas: célula gigante. Macrófagos isolados não formam células gigantes (A, D e G). Na interação com conídios o índice de fusão é baixo na 1^a hora (B), aumentando significativamente nas horas seguintes (E e H). Na interação com células escleróticas, a fusão celular é maior em todos os tempos e as células gigantes são melhor organizadas (C, F e I).

Na interação de macrófagos de C57/BL6 com células escleróticas também notou-se a formação de células gigantes (Figura 13). No entanto, após 48 horas de interação, observou-se que quase todos os macrófagos que estavam aderidos na lamínula se desprenderam (Figura 15D). Além disso, os macrófagos que permaneceram na lamínula estavam com uma morfologia alterada, como citoplasma acidófilo e vacuolizado (Figura 16).

Em virtude desse desprendimento de macrófagos, não foram contabilizados os índices de infecção, fagocitose e fusão celular na co-cultura de células escleróticas com macrófagos de C57/BL6 nos tempos posteriores a 24 horas, visto que o número de células remanescentes não possibilitaria uma contagem confiável.

Os índices de infecção, fagocitose e fusão celular serão vistos mais detalhadamente nos tópicos posteriores.

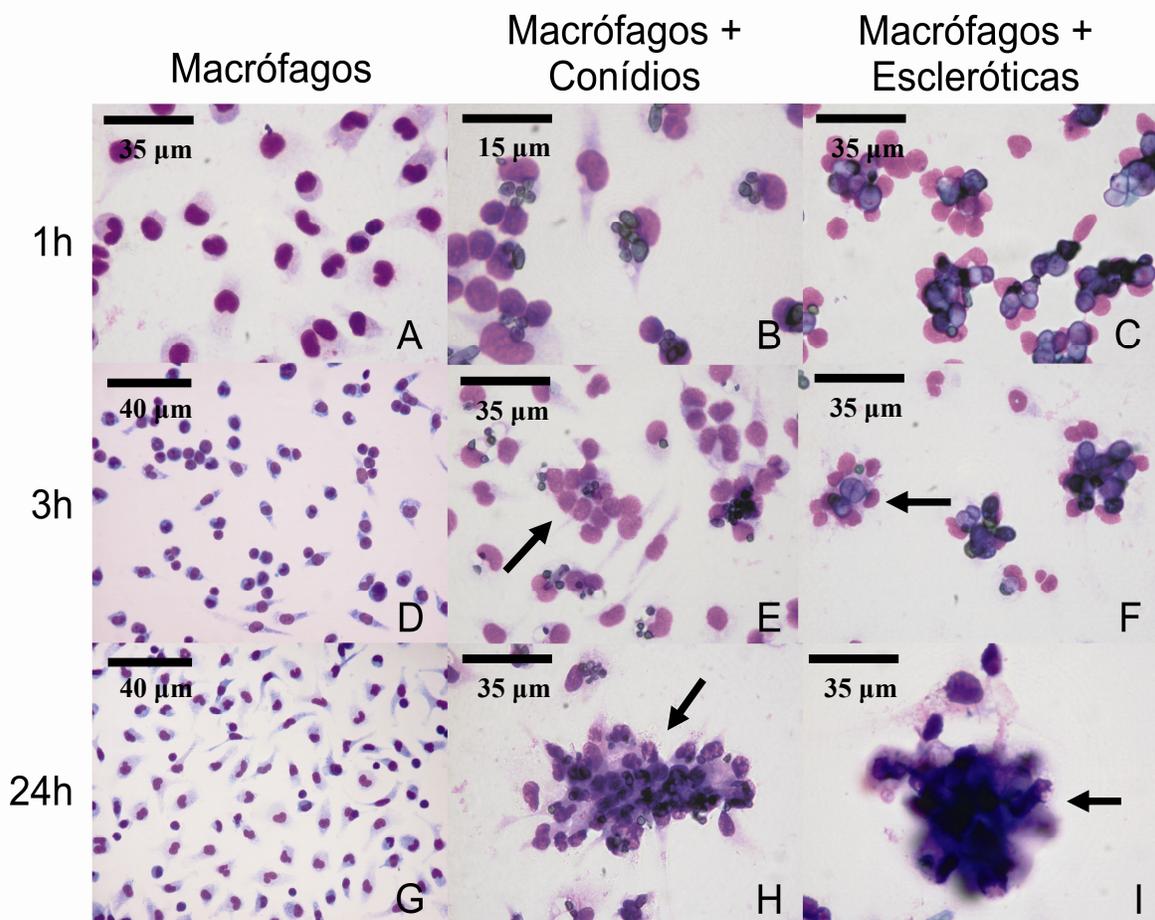


Figura 13: Co-cultivo de macrófagos peritoneais de camundongos C57/BL6 com conídios ou células escleróticas de *F. pedrosoi*. Setas: célula gigante. Macrófagos isolados não formam células gigantes (A, D e G). Na interação com conídios o índice de fusão é baixo na 1ª hora (B), aumentando significativamente nas horas seguintes (E e H). Na interação com células escleróticas a fusão celular é maior em todos os tempos e as células gigantes são mais bem formadas (C, F e I).

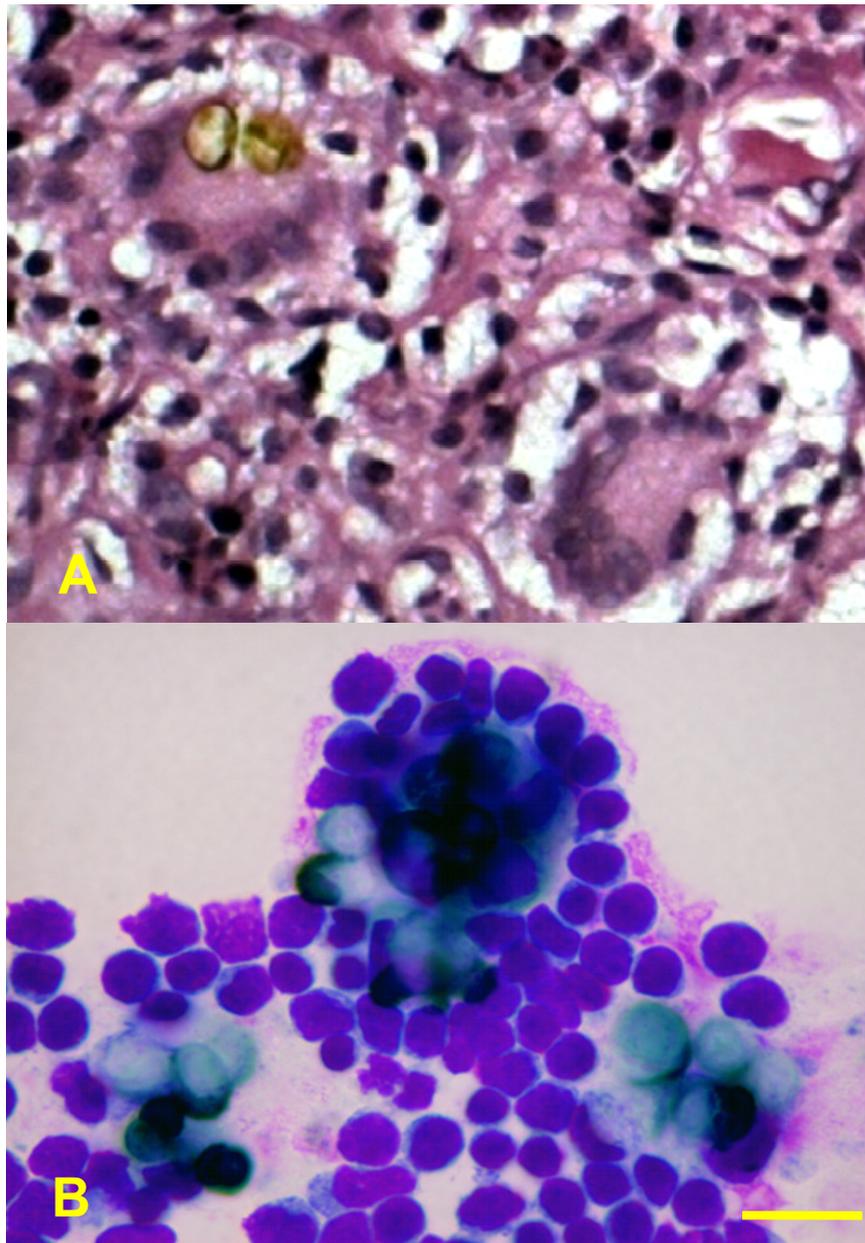


Figura 14: Comparação entre células gigantes obtidas de biópsia de lesão e células gigantes formadas na cultura *in vitro* após 24 horas. Barra: 15 μ m. Tecido obtido de lesão e corado com hematoxilina-eosina, evidenciando a presença de células gigantes do tipo Langhans (A) que são semelhantes às células gigantes formadas *in vitro*, após 24 horas de interação (B: coloração com Giemsa).

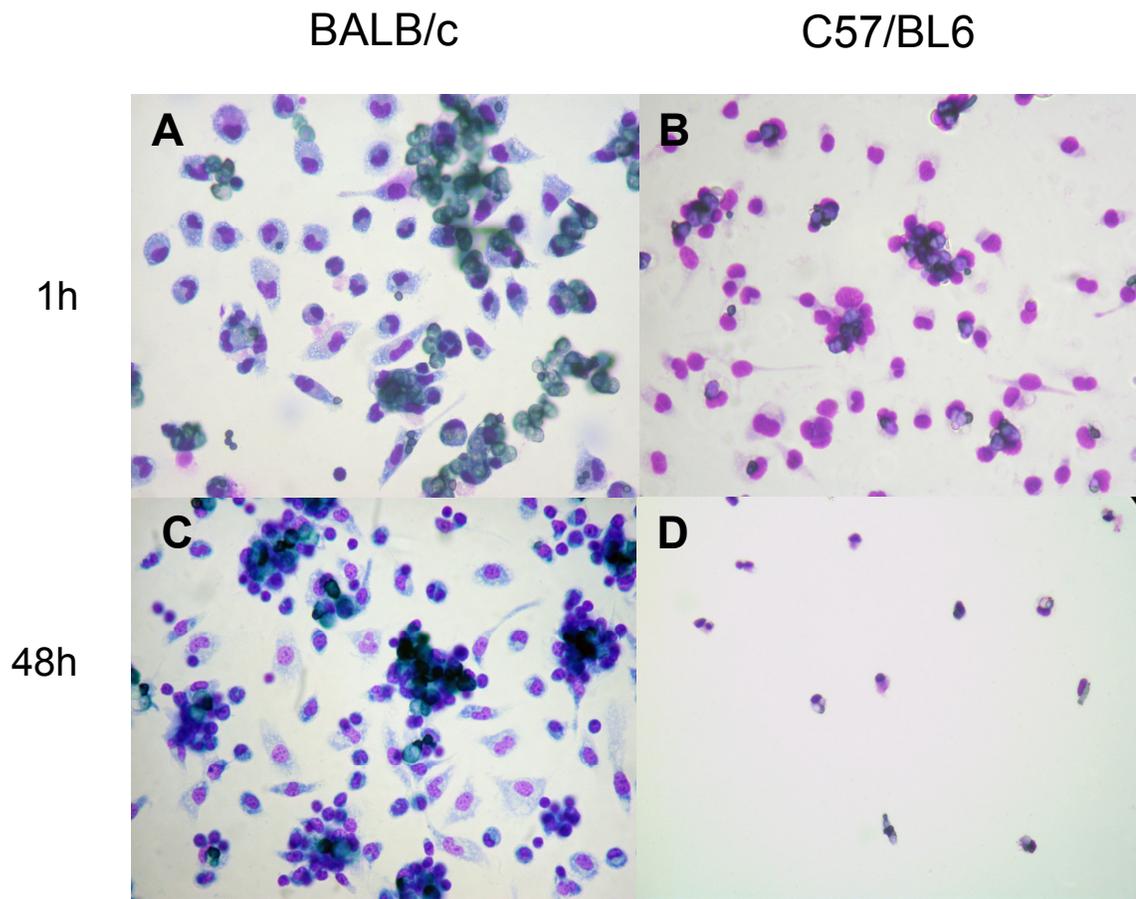


Figura 15: Macrófagos de camundongos BALB/c ou C57/BL6 infectados com células escleróticas de *F. pedrosoi*. Barra: 35 μ m. Depois de 1 hora de cultivo, a distribuição de macrófagos na lamínula é uniforme (A e B). Após 48 horas, os macrófagos começam a se desprender da lamínula na interação com C57/BL6 (D), enquanto na interação com BALB/c (C) permanecem aderidos.

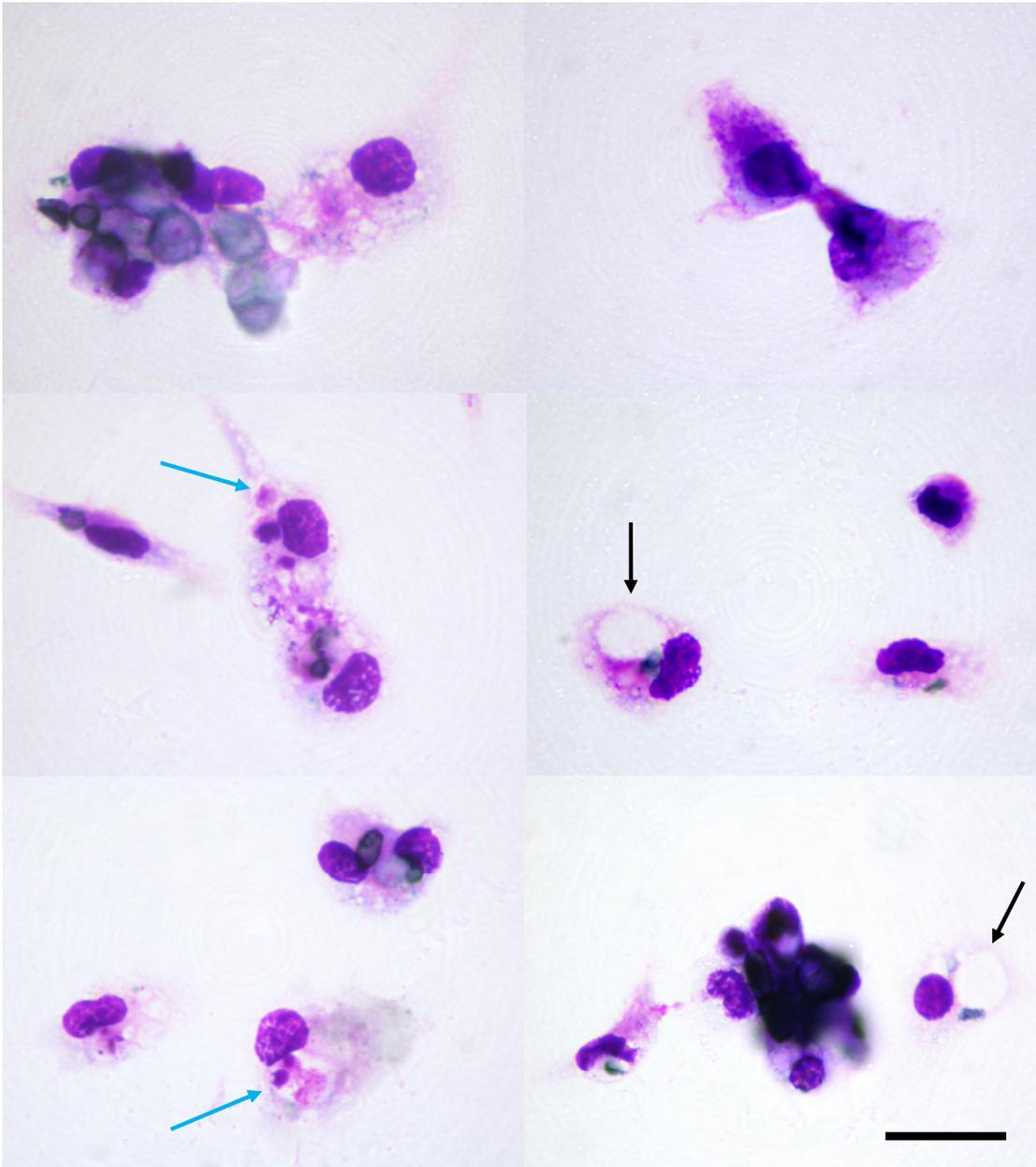


Figura 16: Macrófagos de camundongos C57/BL6 infectados com células escleróticas de *F. pedrosoi* após 48 horas. Barra: 15 μ m. Os macrófagos mostram morfologia alterada, apresentando vacúolos (Seta preta) e inclusões citoplasmáticas (Seta azul).

4.2. PORCENTAGEM DE MACRÓFAGOS INFECTADOS

Observou-se que o índice de infecção, na interação entre macrófagos de BALB/c, foi maior para os conídios em relação às células escleróticas em todos os tempos ($p < 0.05$). Esse índice sofreu um aumento significativo no período até 3 h em ambas as interações (Gráfico 01), chegando até 71,6% com conídios e 24% com células escleróticas. Após esse período, os índices tenderam a estabilização atingindo 60,7% com conídios e 31,1% com células escleróticas, em 72h. A porcentagem de infecção na interação com os conídios foi duas vezes maior que na interação com células escleróticas, mas o perfil de aumento e estabilização foi semelhante ao longo do tempo. É importante relatar que houve um aumento significativo no período de 1 a 3 horas na interação entre macrófagos e conídios ($p < 0,05$).

Determinação do índice de infecção

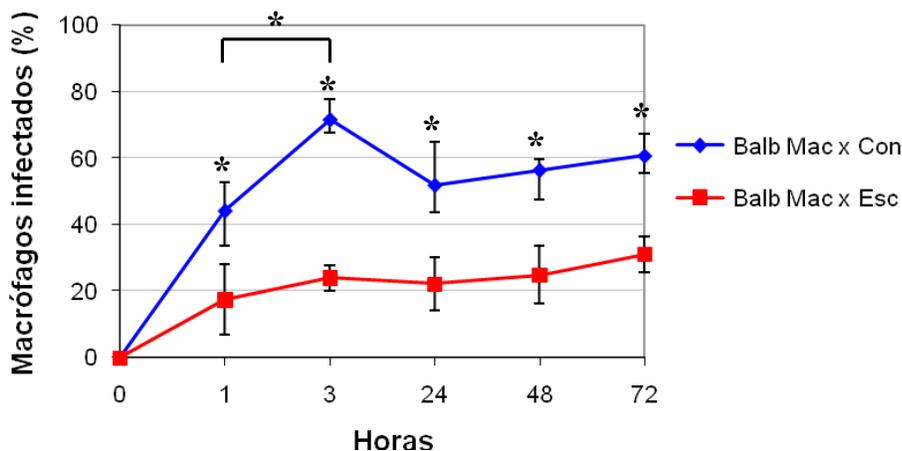


Gráfico 01: Índice de Infecção em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c co-cultivados com conídios ou células escleróticas de *F. pedrosoi*. O índice de infecção foi superior para os conídios em relação às células escleróticas em todos os tempos, tendo um aumento significativo de 1 até 3 horas em ambas as interações. (* $p < 0.05$)

Quanto ao índice de infecção, na interação entre macrófagos peritoneais de camundongos C57/BL6 com conídios ou células escleróticas de *F. pedrosoi* (Gráfico 02), observou-se que houve diferença significativa ($p < 0.05$) somente no tempo de 24 horas, onde a porcentagem de macrófagos infectados na interação com

conídios (79,4%) foi superior a de infectados na interação com células escleróticas (56%).

Determinação do índice de infecção

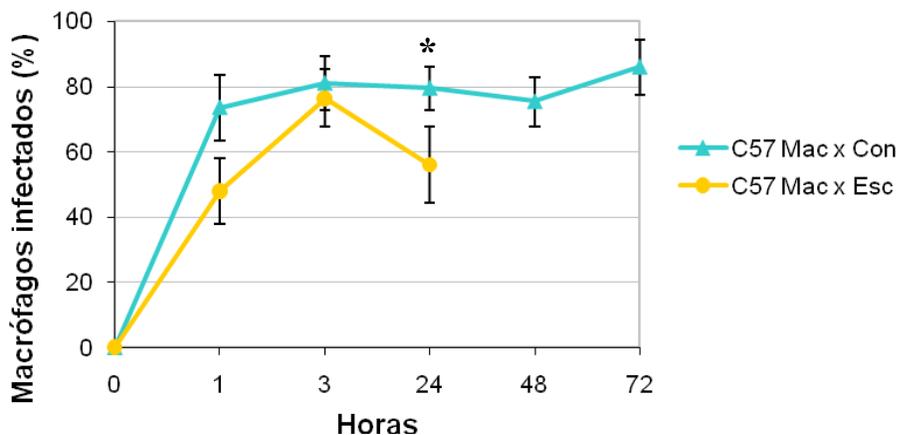


Gráfico 02: Índice de Infecção em macrófagos peritoneais de camundongos C57/BL6 co-cultivados com conídios ou células escleróticas de *F. pedrosoi*. A porcentagem de macrófagos infectados com conídios foi significativamente maior que a de infectados com células escleróticas somente no tempo de 24 horas. (* $p < 0.05$)

Comparando-se o índice de infecção na interação entre macrófagos peritoneais de BALB/c e células escleróticas com a de macrófagos de C57/BL6 e células escleróticas (Gráfico 03), observou-se diferença significativa ($p < 0.05$) entre as duas interações no tempo de 3 horas, sendo a porcentagem de macrófagos infectados na interação entre macrófagos de C57/BL6 e células escleróticas (76,4%) cerca de três vezes maior que na interação com BALB/c (24%). Além disso, na interação de macrófagos de C57/BL6 com células escleróticas, também houve um aumento expressivo ($p < 0.05$) na porcentagem de células infectadas no período de 1 a 3 horas (de 47,9% para 76,4%), o que não foi visto na interação entre macrófagos de BALB/c com células escleróticas.

Quando se compara a interação de macrófagos peritoneais, de BALB/c ou C57/BL6, com conídios (Gráfico 04), observa-se diferença significativa ($p < 0.05$)

entre as duas interações nos tempos de 48 e 72 horas, sendo o índice de infecção maior na interação de macrófagos de C57/BL6 com conídios em ambos os tempos.

Determinação do índice de infecção

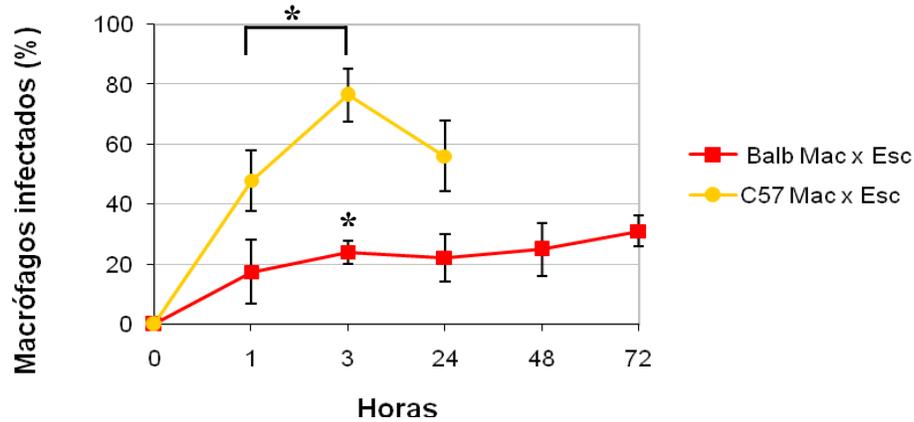


Gráfico 03: Índice de Infecção em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ou C57/BL6 co-cultivados com células escleróticas de *F. pedrosoi*. Na interação entre macrófagos de C57/BL6 e células escleróticas, o índice de infecção foi cerca de três vezes maior que na interação com BALB/c, e apresentou um crescimento significativo no período de 1 a 3 horas. (* $p < 0.05$)

Determinação do índice de infecção

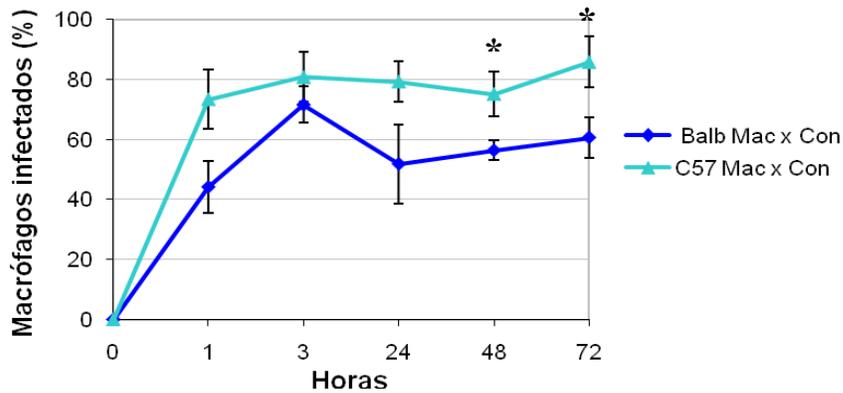


Gráfico 04: Índice de infecção em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ou C57/BL6 co-cultivados com conídios de *F. pedrosoi*. Nos tempos de 48 e 72 horas, o índice de infecção foi maior na interação de macrófagos de camundongos C57/BL6 com conídios (* $p < 0.05$).

4.3. NÚMERO DE FUNGOS POR MACRÓFAGO INFECTADO (ÍNDICE DE FAGOCITOSE)

Neste parâmetro quantificou-se o número médio de fungos dentro dos macrófagos, contabilizando-se um mínimo de 100 células infectadas por lamínula. Verificou-se, na interação com BALB/c, que a média do número de fungos por macrófago foi superior ($p < 0.05$) para os conídios quando comparado às células escleróticas em todos os tempos estudados (Gráfico 05). O índice de fagocitose também apresentou um crescimento significativo no período até 3 horas, alcançando 3,7 unidades formadoras de colônias (UFC) por célula para conídios contra 2,3 UFC/célula para células escleróticas. Nas horas seguintes, esse índice se estabilizou chegando até 3,5 e 2,2 UFC/célula no período de 72h em interação com conídios e células escleróticas, respectivamente. O perfil do aumento e estabilização do índice de fagocitose também foi similar em ambas as interações.

No co-cultivo de macrófagos peritoneais de camundongos C57/BL6 com conídios ou células escleróticas de *F. pedrosoi*, constatou-se que não houve diferenças estatisticamente significativas quanto ao número médio de fungos fagocitados por macrófagos nos diferentes tempos avaliados (Gráfico 06).

A comparação entre a interação de conídios com macrófagos de BALB/c e C57/BL6, revelou que não houve diferença significativa, quanto ao índice de fagocitose, entre as duas interações nos tempos analisados (Gráfico 07). O mesmo foi visto na comparação entre a interação de células escleróticas e macrófagos de BALB/c e C57/BL6 (Gráfico 08).

Determinação do índice de fagocitose

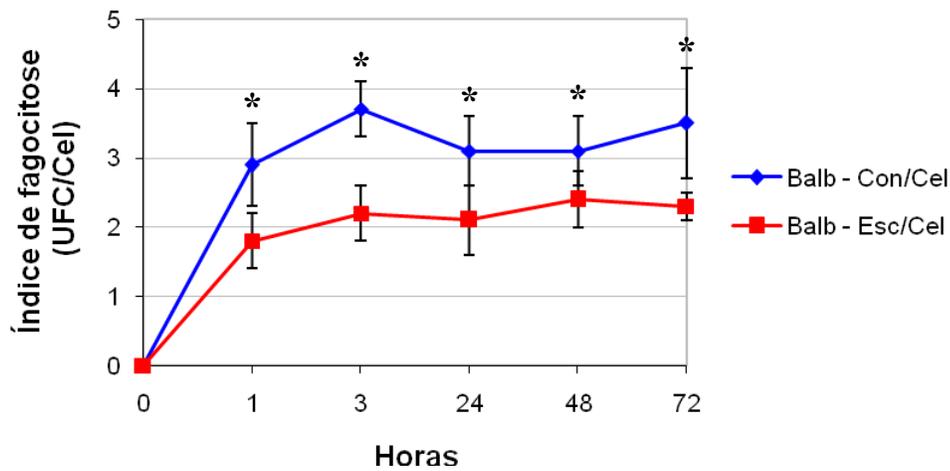


Gráfico 05: Índice de fagocitose em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c co-cultivados com conídios ou células escleróticas de *F. pedrosoi*. Observou-se que o índice de fagocitose foi superior na interação com conídios em relação à interação com células escleróticas em todos os tempos estudados. (* $p < 0.05$)

Determinação do índice de fagocitose

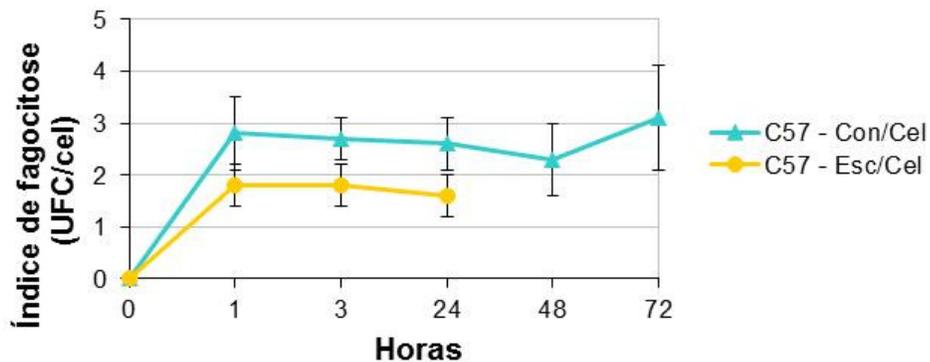


Gráfico 06: Índice de fagocitose em macrófagos peritoneais de camundongos C57/BL6 co-cultivados com conídios ou células escleróticas de *F. pedrosoi*. Verificou-se que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os índices de fagocitose das duas interações nos diferentes tempos avaliados.

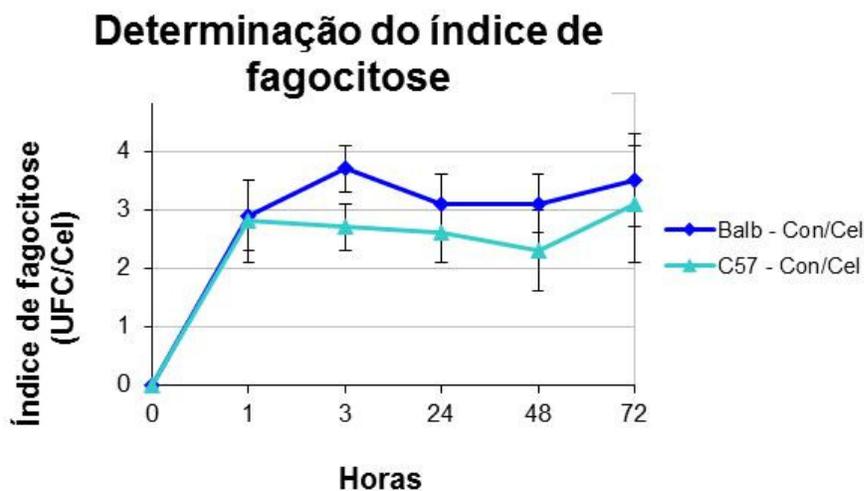


Gráfico 07: Índice de fagocitose em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ou C57/BL6 co-cultivados com conídios de *F. pedrosoi*. Não houve diferença significativa, quanto ao índice de fagocitose, entre as duas interações nos tempos analisados.

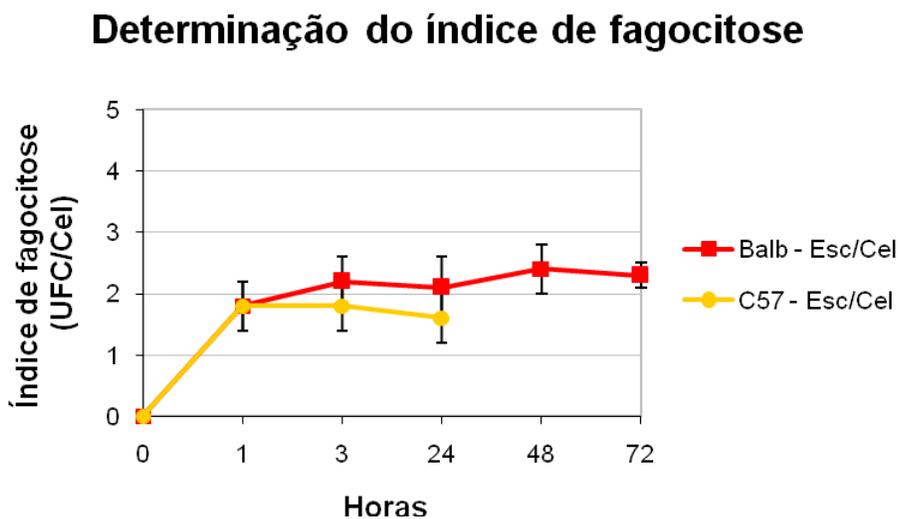


Gráfico 08: Índice de fagocitose em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ou C57/BL6 co-cultivados com células escleróticas de *F. pedrosoi*. Não houve diferença significativa, quanto ao índice de fagocitose, entre as duas interações nos tempos analisados.

4.4. ÍNDICE DE FUSÃO CELULAR

Ao avaliar-se o índice de fusão, em macrófagos isolados de camundongos BALB/c (Gráfico 09), verificou-se que houve maior fusão celular na interação de células escleróticas com macrófagos do que na interação de conídios com macrófagos, sendo estatisticamente significante apenas nos tempos de 1 e 72 horas ($p < 0.05$). Pôde-se observar também, em ambas as interações, que houve um crescimento significativo da fusão celular no período de 1 até 24 horas. Após esse tempo ocorreu uma tendência a estabilização, mas no período de 48 a 72 horas o índice voltou a crescer, atingindo 67,7% com células escleróticas e 33,8% com conídios. Não houve diferença significativa entre a interação de macrófagos de C57/BL6 com conídios comparada à interação com células escleróticas (Gráfico 10).

Analisando-se a interação com conídios nos dois tipos de camundongos, observou-se que não houve diferença entre ambos, quanto à fusão celular (Gráfico 11). No entanto, nas duas interações houve aumento significativo do índice de fusão celular no período de 1 a 24 horas ($p < 0.05$).

Na comparação entre as interações com esclerótica (Gráfico 12), notou-se diferença estatística entre BALB/c e C57/BL6 nos tempos de 1 e 24 horas, onde a fusão foi maior na interação com BALB/c em relação à interação com C57/BL6 ($p < 0.05$). Entretanto, no período de 24 a 72 horas, apenas a interação de células escleróticas com macrófagos de BALB/c apresentou um crescimento expressivo, passando de 49,4% para 67,7% ($p < 0.05$).

Determinação do índice de fusão celular

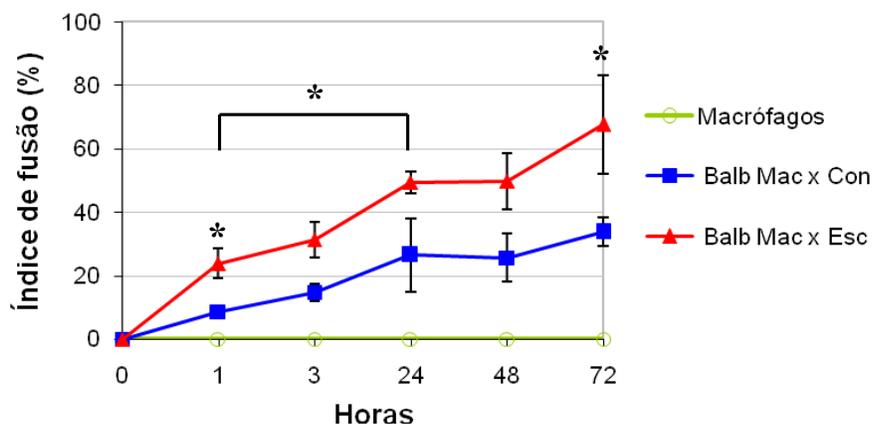


Gráfico 09: Índice de fusão celular em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c co-cultivados com conídios ou células escleróticas de *F. pedrosoi*. Observou-se, nos tempos de 1 e 72 horas, que a fusão celular foi significativamente maior na interação de células escleróticas com macrófagos do que na interação de conídios com macrófagos. Em ambas as interações, houve um aumento significativo do índice de fusão no período de 1 a 24 horas. (*p < 0.05)

Determinação do índice de fusão celular

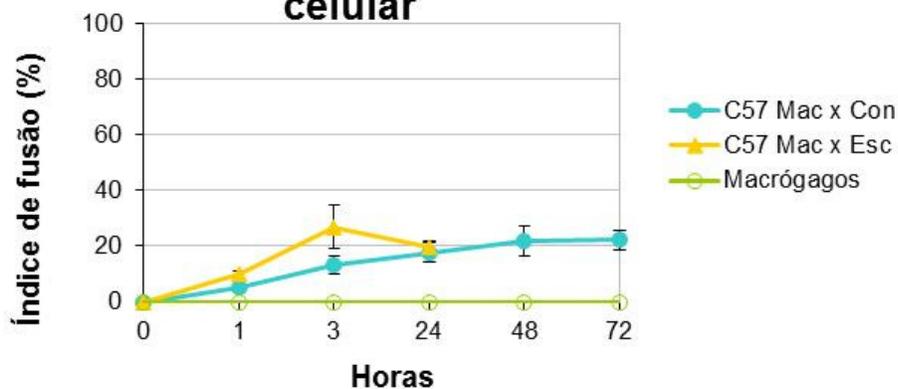


Gráfico 10: Índice de fusão celular em macrófagos peritoneais de camundongos C57/BL6 co-cultivados com conídios ou células escleróticas de *F. pedrosoi*. Não houve diferença significativa entre o índice de fusão na interação de macrófagos de C57/BL6 com conídios, comparada à interação com células escleróticas.

Determinação do índice de fusão celular

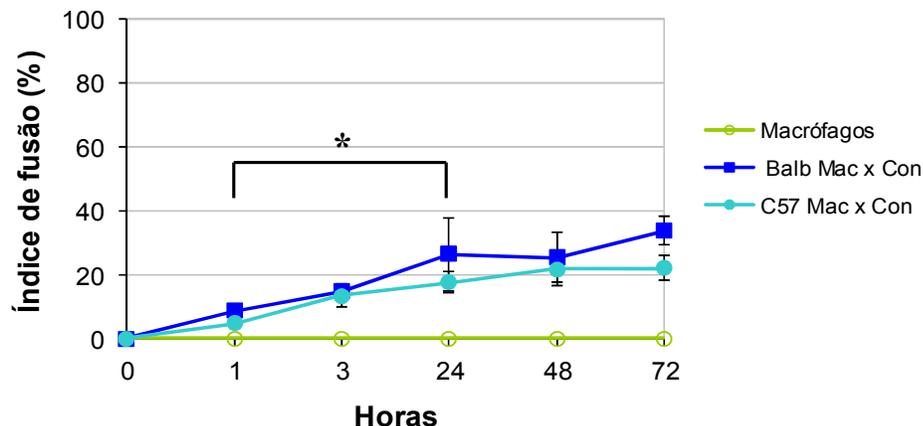


Gráfico 11: Índice de fusão celular em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ou C57/BL6 co-cultivados com conídios de *F. pedrosoi*. Não houve diferença entre as duas interações, quanto à fusão celular. No entanto, houve aumento significativo do índice de fusão celular no período de 1 a 24 horas em ambas as interações. (* $p < 0.05$)

Determinação do índice de fusão celular

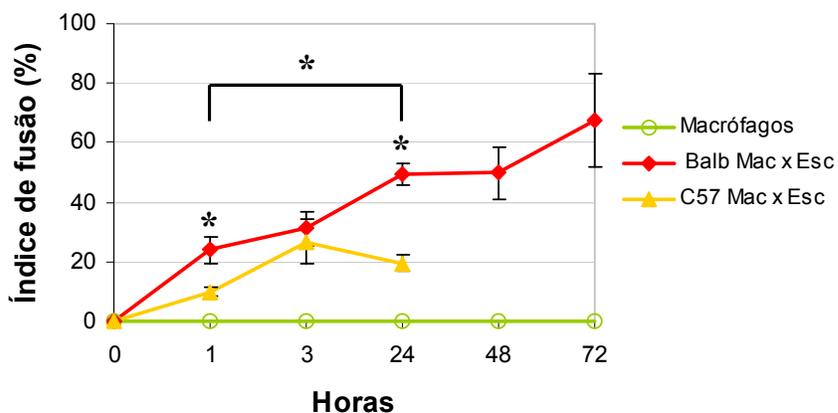


Gráfico 12: Índice de fusão celular em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ou C57/BL6 co-cultivados com células escleróticas de *F. pedrosoi*. Observou-se que a fusão foi significativamente maior na interação com BALB/c em relação à interação com C57/BL6, nos tempos de 1 e 24 horas. Entretanto, neste mesmo período, apenas a interação de células escleróticas com macrófagos de BALB/c apresentou um crescimento significativo (* $p < 0.05$).

4.5. ANÁLISE DE CITOCINAS ATRAVÉS DE ELISA

Após os tempos de interação (1, 3, 24, 48 e 72 horas), mediu-se a produção das citocinas TNF- α e IL-10 no sobrenadante das culturas.

Como mostrado no Gráfico 13, a quantidade de TNF- α detectada na interação de conídios com macrófagos de BALB/c é significativamente maior que a detectada na cultura de macrófagos (Controle), nos período de 3 a 72 horas ($p < 0.05$). Já na interação de células escleróticas com macrófagos de BALB/c, a quantidade de TNF- α mostra-se expressivamente maior que a do controle nos tempos de 1 e 3 horas ($p < 0.05$).

Analisando-se a interação de macrófagos de C57/BL6 com conídios (Gráfico 14), observou-se que a produção de TNF- α é maior que a do controle nos tempos de 1 e 72 horas ($p < 0.05$). Isso é o inverso do que ocorreu na interação de conídios com macrófagos de BALB/c, mostrando que há um padrão de resposta diferente para cada tipo de camundongo em contato com o mesmo agente. A interação de macrófagos de C57/BL6 com células escleróticas revelou significativas diferenças em relação ao controle quanto à produção de TNF- α , tendo sido superior no período de 1 a 48 horas ($p < 0.05$) (Gráfico 15).

A produção de IL-10 mostrou-se maior no controle que na interação de macrófagos de BALB/c com conídios após 1 e 3 horas de interação; e maior que na interação de células escleróticas no tempo de 1 horas. Depois de 72 horas de interação, a produção de IL-10 torna-se superior na interação com esclerótica em relação ao controle (Gráfico 16).

Comparando-se os níveis de IL-10 da interação entre macrófagos de C57/BL6 e conídios ao controle (Gráfico 17), observou-se que a quantidade de IL-10 produzida pelo controle foi maior que a produzida na interação no tempo de 3 horas ($p < 0.05$). Entretanto, após 48 horas, os níveis de IL-10 são maiores para os macrófagos da interação com conídios, comparado ao controle ($p < 0.05$). Quando se compara o controle aos macrófagos infectados com células escleróticas, percebe-se que a única diferença significativa entre eles ocorre na terceira hora de interação, onde os níveis de IL-10 produzidos pelo controle são maiores que os produzidos na cultura de macrófagos com células escleróticas (Figura 33).

Produção de TNF- α por macrófagos de camundongos Balb/c

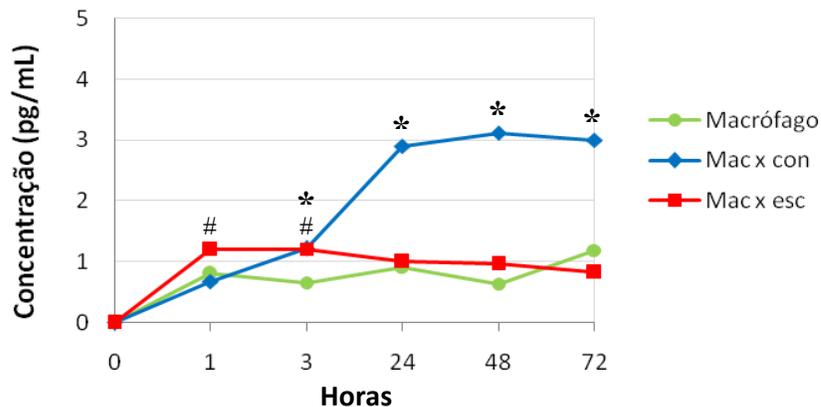


Gráfico 13: Produção de TNF- α por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c isolados ou co-cultivados com conídios ou células escleróticas de *F. pedrosoi*. A quantidade de TNF- α detectada na interação de conídios com macrófagos de BALB/c é significativamente maior que a detectada na cultura de macrófagos (controle), nos período de 3 a 72 horas (* $p < 0.05$). Já na interação de células escleróticas com BALB/c, a quantidade de TNF- α mostra-se expressivamente maior que a do controle nos tempos de 1 e 3 horas (# $p < 0.05$).

Produção de TNF- α por macrófagos de camundongos C57/BL6

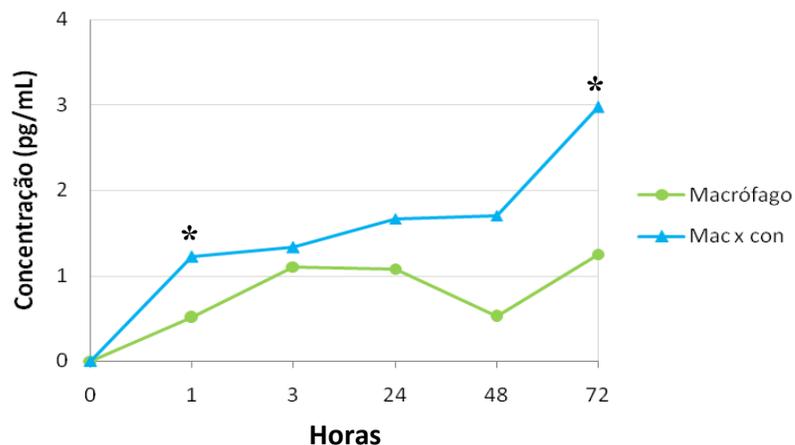


Gráfico 14: Produção de TNF- α por macrófagos peritoneais de camundongos C57/BL6 isoladamente ou em co-cultivo com conídios de *F. pedrosoi*. Observou-se que a produção de TNF- α na interação de macrófagos de C57/BL6 com conídios é maior que a do controle nos tempos de 1 e 72 horas (* $p < 0.05$).

Produção de TNF- α por macrófagos de camundongos C57/BL6

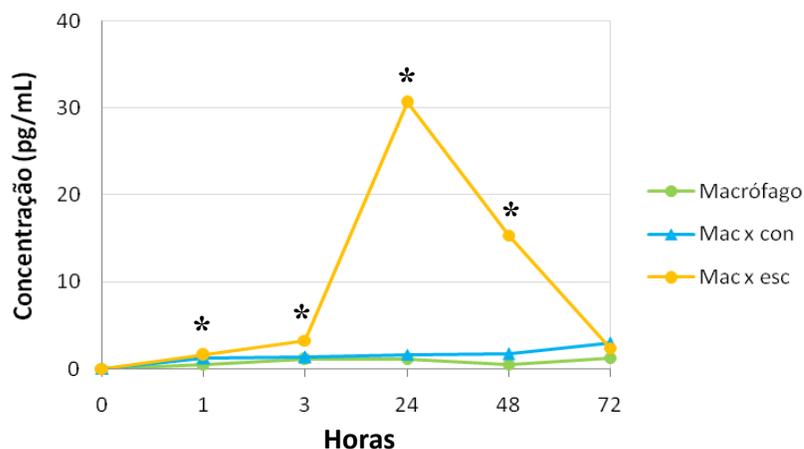


Gráfico 15: Produção de TNF- α por macrófagos peritoneais de camundongos C57/BL6 isoladamente ou em co-cultivo com conídios ou células escleróticas de *F. pedrosoi*. Observou-se que na interação de macrófagos de C57/BL6 com células escleróticas a produção de TNF- α foi superior a do controle no período de 1 a 48 horas. (* $p < 0.05$)

Produção de IL-10 por macrófagos de camundongos Balb/c

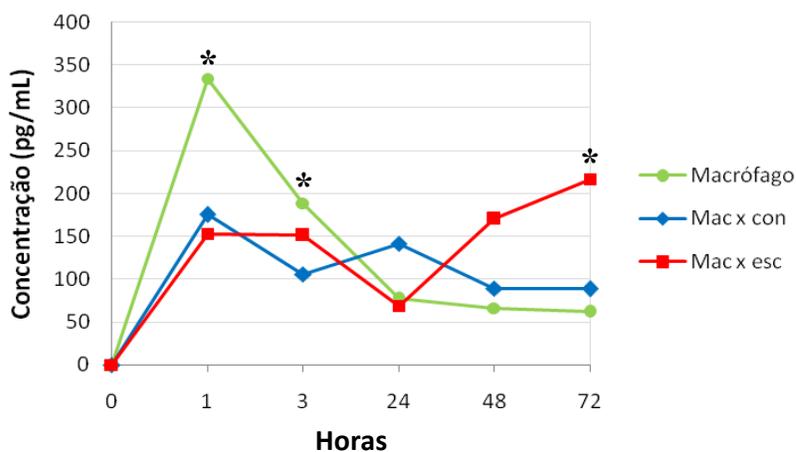


Gráfico 16: Produção de IL-10 por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c isoladamente ou em co-cultivo com conídios ou células escleróticas de *F. pedrosoi*. A produção de IL-10 mostrou-se maior no controle em relação à interação com conídios nos tempos de 1 e 3 horas. Na interação de macrófagos de BALB/c com células escleróticas em relação ao controle, após 72 horas de interação (* $p < 0.05$) Não houve diferença significativa entre a produção de IL-10 no controle e na interação com conídios.

Produção de IL-10 por macrófagos de camundongos C57/BL6

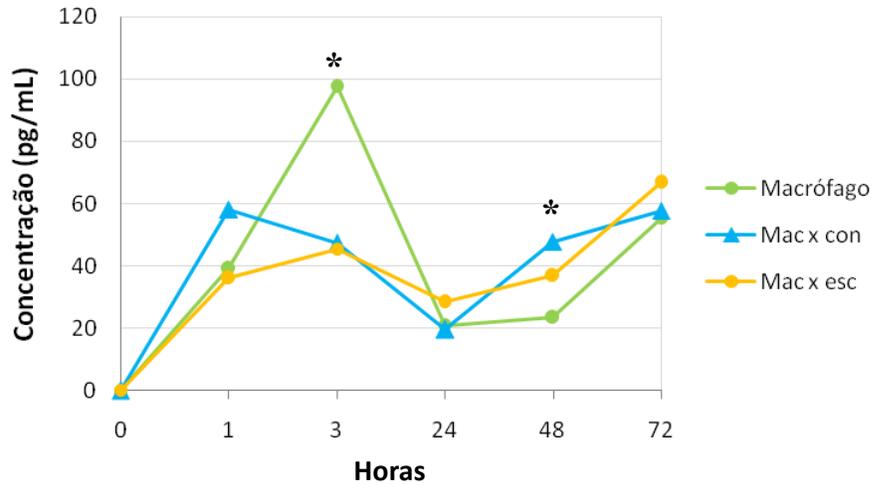


Gráfico 17: Produção de IL-10 por macrófagos peritoneais de camundongos C57/BL6 isoladamente ou em co-cultivo com conídios ou células escleróticas de *F. pedrosoi*. Observou-se que após 48 horas, os níveis de IL-10 são maiores para os macrófagos da interação com conídios comparado ao controle (* $p < 0.05$). Quando se comparou o controle aos macrófagos infectados com células escleróticas, percebeu-se que não houve diferença significativa entre eles.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho analisou a interação entre *F. pedrosoi* e macrófagos de camundongos peritoneais de BALB/c ou C57/BL6. Os resultados demonstram que houve fagocitose de conídios e células escleróticas de *F. pedrosoi* durante a primeira hora de interação. Estudos anteriores observaram que na interação de conídios ou células escleróticas com neutrófilos humanos, houve fagocitose 1h após a interação (ALVIANO *et al.*, 2004).

As células de Langerhans também fagocitam conídios após 3 horas de interação, mas não fagocitam células escleróticas, e ainda inibem a diferenciação dos fungos em hifas (SILVA *et al.*, 2007). No entanto, as células de Langerhans usualmente fagocitam apenas um conídio, ou raramente dois, diferentemente dos macrófagos peritoneais, os quais conseguem internalizar cerca de 3 a 5 conídios, como visto neste trabalho. Outras células dendríticas também fagocitam diferentes espécies de fungos, mas diferentemente dos macrófagos, usam esta habilidade para capturar antígenos e apresentar às células T, iniciando a resposta imune (ROMANI *et al.*, 2002).

Rozental *et al.* (1994) demonstraram que macrófagos ativados fagocitaram conídios de *F. pedrosoi* após 1 hora de interação, mas não eram capazes de destruí-los e que após 24 horas de incubação as estruturas fúngicas estavam preservadas, e alterações morfológicas no fungo, como a transformação de conídios em hifas e sua proliferação, eram inibidas ou retardadas.

Limongi *et al.* (1997) revelaram que os conídios de *F. pedrosoi* aderem e são fagocitados por células do ovário de hamster chinês depois de 2h de interação. Além disso, analisaram a influência de diferentes carboidratos de superfície na interação e observaram que resíduos de carboidratos expressos na superfície da célula hospedeira podem estar relacionados à adesão e internalização do fungo. A presença de resíduos de N-acetilglicosamina e N-acetilgalactosamina expostos na superfície das células influenciou o aumento do índice de endocitose, sugerindo que a exposição desses resíduos de açúcar facilitou a penetração do fungo no interior da célula alvo; enquanto a adição de manose no meio de interação inibiu intensamente

a adesão de *F. pedrosoi* às células (LIMONGI *et al.*, 1997). Todos estes estudos estão de acordo com o rápido tempo de fagocitose de conídios e escleróticas de *F. pedrosoi* aqui encontrado, e talvez estes resíduos também influenciem a interação entre os macrófagos de C57/BL6 ou BALB/c e *F. pedrosoi*, analisada no presente estudo.

Em todos os experimentos realizados não se observou a formação de hifas no interior dos macrófagos ou extracelularmente, mesmo no tempo de 72h, o que contraria o resultado de outros estudos, que demonstram a destruição dos macrófagos pelos fungos (FARBIARZ *et al.*, 1990) e a diferenciação de conídios em hifas 24h após a interação (ROZENTAL *et al.*, 1994). Apesar de não termos observado a multiplicação dos fungos, nem a formação de novas estruturas como hifas, a maioria das formas fúngicas fagocitadas estava com a estrutura preservada. Para analisar se estes fungos estavam viáveis ou não, cultivamos as lamínulas em ágar-Saboraud após o término do tempo das interações, e verificamos o crescimento dos fungos em todos os tempos, indicando que o macrófago isolado não é capaz de destruir o fungo, diferente do que ocorre na interação de *F. pedrosoi* com neutrófilos, quando os fungos são completamente destruídos (ROZENTAL *et al.*, 1996).

Não foram encontrados dados na literatura que avaliassem a interação de macrófagos de camundongos C57/BL6 com *F. pedrosoi* e os trabalhos analisando a resposta de macrófagos de BALB/c às células escleróticas são raros, tornando incompleta a correlação com os resultados aqui obtidos.

A interação entre macrófagos de camundongos BALB/c e diferentes formas de *F. pedrosoi* (conídios ou células escleróticas) mostrou que os índices de fagocitose e infecção foram superiores para os conídios em relação às células escleróticas em todos os tempos, diferentemente do que é visto no índice de fusão, onde ocorre uma inversão, com as células escleróticas sendo superiores aos conídios na indução de células gigantes multinucleadas. A diferença quanto ao número de UFC fagocitadas talvez se explique pela diferença de tamanho entre conídios e células escleróticas, já que os conídios são menores que as células escleróticas e por isso poderiam ser fagocitados em maior quantidade. Já a diferença nos índices de infecção e fusão, pode indicar que as células escleróticas

são mais imunogênicas e conseguem despertar maior resposta por parte do macrófago.

Na interação entre macrófagos de camundongo C57/BL6 e diferentes formas de *F. pedrosoi* (conídios ou células escleróticas), não se obtiveram diferenças quanto ao índice de fusão celular e fagocitose, sendo que o índice de infecção diferiu apenas no período de 24 horas após a interação.

O número médio de células escleróticas fagocitadas por macrófagos, assim como o índice fusão celular, não diferiram entre as duas espécies de camundongos estudadas (C57/BL6 e BALB/c). O índice de infecção também foi praticamente o mesmo, mostrando diferença significativa apenas no tempo de 3 horas de interação. Na interação com conídios, o padrão de resposta também foi semelhante em ambos os tipos de células, diferindo apenas quanto ao índice de infecção celular entre 48 e 72 horas de interação.

Apesar dos índices de fagocitose, infecção e fusão celular indicarem respostas similares entre as duas espécies de camundongos, foram encontradas diferenças morfológicas importantes entre eles, como a presença de vacúolos aumentados na interação de conídios com macrófagos de C57/BL6, após 3 horas de interação, o que não foi observado nas outras interações. Esses dados talvez indiquem um padrão de resposta diferente para cada tipo camundongo em contato com o mesmo agente. Em estudos com leishmaniose, mostrou-se que as variações celulares entre a leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose cutânea localizada (LCL), ocorrem principalmente quanto ao número de vesículas citoplasmáticas, vacúolos parasitóforos e números de amastigotas por vacúolo parasitóforo, sendo que nas lesões da LCD há a presença de macrófagos com citoplasma translúcido, grande número de vacúolos parasitóforos e alto número de amastigotas por vacúolo (SCHURR *et al.*, 1987). Já neste estudo, verificou-se a formação de um vacúolo de macrófagos de camundongos C57/BL6 para cada conídio, sem a formação de brotamentos ou qualquer diferenciação a partir destes conídios, indicando que – diferente das leishmanias, que se multiplicam no interior dos vacúolos – formas fúngicas de *F. pedrosoi* são inibidas dentro destes vacúolos.

Outra diferença encontrada foi o desprendimento dos macrófagos da lamínula, na interação de células escleróticas com macrófagos de C57/BL6, nos tempos superiores a 24 horas. Não se sabe a razão pela qual isso aconteceu. Talvez os macrófagos tenham entrado em apoptose, já que esse desprendimento não ocorreu na cultura de macrófagos controle, nem na interação com conídios e em nenhuma das interações com macrófagos de BALB/c. Outra causa para esse desprendimento, pode ser alta quantidade de TNF- α secretada pelos macrófagos, no tempo de 24 horas; já que estudos demonstram que macrófagos provocam o desprendimento e a lise de “osteoblastos-like” por secreção de TNF- α (EVANS & JONES, 1998). Mais estudos são necessários para explicar melhor este processo.

Franzen *et al.* (1999) observaram que as células escleróticas teciduais são muito mais pigmentadas que as formas em hifas e conídios e que o acúmulo de pigmentos sobre as camadas externas torna estas células muito mais resistentes ao sistema imune humano e à terapia com drogas antifúngicas.

Alguns estudos indicam que a produção de melanina pode proteger os fungos contra destruição celular por macrófagos (REISSE & NICKERSON, 1974). Talvez, esse pigmento possa atuar adsorvendo radicais oxidativos, protegendo o fungo fagocitado contra os efeitos microbicidas dos macrófagos ativados (ROZENTAL *et al.*, 1994). A incubação de macrófagos (ativados com LPS ou INF- γ) com melanina obtida de fungos inibe a produção de óxido nítrico e isso pode consistir em um mecanismo de evasão da resposta imune do hospedeiro por fungos melanizados (BOCCA *et al.*, 2006). No entanto, os nossos resultados demonstraram que, aparentemente, a melanina não protegeu as células escleróticas e na interação estas células estimularam uma melhor resposta por parte dos macrófagos de BALB/c, o que pode indicar uma maior imunogenicidade destas formas em relação aos conídios.

O processo de destruição do fungo por macrófagos nem sempre é eficiente. O fungo pode sobreviver e se multiplicar dentro de macrófagos não estimulados (FARBIARZ *et al.*, 1990). Apesar dos macrófagos fagocitarem os fungos, que permanecem em vacúolos ligados à membrana, os mesmos são capazes de se proliferar no ambiente ácido dos vacúolos e na presença de enzimas

lizossomais. Essa observação indica que os macrófagos residentes têm pouco ou nenhum efeito citotóxico contra *F. pedrosoi* (ROZENTAL *et al.*, 1990).

Os resultados da análise da produção de citocinas nos sobrenadantes da cultura revelam que os macrófagos de um mesmo tipo de camundongo respondem diferentemente a formas distintas do fungo (conídios ou células escleróticas). A quantidade de TNF- α detectada na interação com macrófagos de BALB/c com conídios é superior a do controle nos tempos de 24 a 72 horas, enquanto que na interação com células escleróticas, é maior que a do controle no período de 1 a 3 horas. Já na interação de conídios com C57/BL6 a quantidade de TNF- α detectada é superior a do controle no período de 1 e 72 horas, enquanto que na interação com células escleróticas, é maior que a do controle no período de 1 a 48 horas.

Os níveis de IL-10 na interação de células escleróticas com macrófagos de BALB/c são superiores aos do grupo controle somente no tempo de 72 horas, enquanto que na interação com conídios não se verifica diferença em relação ao controle. Analisando a interação com macrófagos de C57/BL6, observou-se que os níveis IL-10 são maiores que o do grupo controle na interação com conídios somente no tempo de 48 horas; enquanto na interação com células escleróticas, não existiu diferença em relação ao controle.

Confrontando os resultados da análise de citocinas observou-se que, em todas as interações, quando os níveis de IL-10 estavam elevados, os níveis de TNF- α estavam diminuídos. Esses dados concordam com a idéia de que a IL-10 medeia a inibição de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , que participa da indução e manutenção da proteção a granulomas em diversas etapas (CHANTEUX *et al.*, 2007; WALLIS & EHLERS, 2005). Além disso, foi observado aumento da produção de IL-10 e diminuição de TNF- α por células mononucleares do sangue periférico tratadas com imunocomplexos na reação do granuloma *in vitro* (REZENDE *et al.*, 1997).

O efeito inibitório da IL-10 sobre a produção de TNF é crucial para a atividade antiinflamatória, por que essa citocina tem atividade sinérgica sobre processos inflamatórios e amplifica essa resposta por induzir mediadores

secundários tais como quimiocinas, prostaglandinas e fator ativador de plaquetas (MOORE *et al.*, 2001). Altos níveis de IL-10 também estão relacionados à depressão da resposta imune e manifestação da forma grave da cromoblastomicose (GIMENES *et al.*, 2005). Além disso, a inibição da atividade do TNF- α também indica um aumento na atividade apoptótica no interior do granuloma (MOHAN *et al.*, 2001).

A composição celular do granuloma na cromoblastomicose, descrita por Esterre *et al.* (1993), revelou a presença de células gigantes do tipo Langhans e um infiltrado celular composto em sua maioria por neutrófilos polimorfonucleares, macrófagos e histiócitos. Alguns macrófagos foram marcados com anticorpo anti-TNF- α , indicando que esta citocina está presente na reação granulomatosa da cromoblastomicose (ESTERRE *et al.*, 1993). Estes dados corroboram com o presente estudo, onde se verificou a presença de TNF- α em todas as interações e a formação de células gigantes do tipo Langhans na interação com células escleróticas. Estudos demonstram que o TNF- α é necessário para o controle *in vivo* da tuberculose em camundongos, com efeitos na ativação de macrófagos e formação de granulomas (FLYNN *et al.*, 1995; ALGOOD *et al.*, 2004). Experimentos *in vitro* demonstraram que a infecção de macrófagos por *Mycobacterium tuberculosis* resulta na expressão de TNF- α , sendo que o pico desta citocina ocorre até 4 horas após a infecção e a expressão de mRNA é bastante reduzida depois de 24h de interação (ALGOOD *et al.*, 2005).

A formação de células gigantes multinucleadas é um evento complexo que envolve diversos receptores de membrana responsáveis pelo reconhecimento, adesão e ativação do processo de fusão celular (MIZUNO *et al.*, 2004). Com relação à formação de células gigantes na interação entre *F. pedrosoi* e macrófagos, os dados são inexistentes. Os resultados obtidos neste estudo revelaram que há uma grande indução da fusão celular na interação de macrófagos com células escleróticas, o que pode sugerir diversas hipóteses, entre as quais a indicação de uma maior patogenicidade das células escleróticas em relação aos conídios.

6. CONCLUSÕES

- A resposta de macrófagos de camundongos BALB/c é diferente para conídios e células escleróticas:
 - Os índices de infecção e de fagocitose foram maiores para conídios em relação às células escleróticas em todos os tempos, diferentemente do que é visto no índice de fusão, onde ocorre uma inversão, com as células escleróticas sendo superiores aos conídios na indução de células gigantes multinucleadas.
 - Enquanto a interação com conídios estimulou a formação de células gigantes do tipo corpo estranho, a interação com células escleróticas originou a formação de células gigantes do tipo Langhans.
 - A quantidade de TNF- α é maior na interação de conídios comparado ao controle, no período de 3 a 72 horas; e a quantidade de IL-10, no tempo de 3 horas. Já na interação com células escleróticas, a quantidade de TNF- α é maior que a do controle nos tempos de 1 e 3 horas; e a quantidade de IL-10, é maior após 72 horas de interação.
- A resposta de macrófagos de camundongos C57/BL6 é diferente para conídios e células escleróticas:
 - Na interação entre macrófagos de camundongo C57/BL6 e diferentes formas do *F. pedrosoi* (conídios ou células escleróticas), não se obtiveram diferenças quanto ao índice de fusão celular e fagocitose, sendo que o índice de infecção diferiu apenas no período de 24 horas após a interação.
 - Na interação com conídios observou-se a presença de vacúolos aumentados após 24 horas de interação; enquanto na interação com células escleróticas, os macrófagos se desprenderam da lamínula nos tempos posteriores a 24 horas.
 - A quantidade de TNF- α é maior na interação de conídios comparado ao controle, nos tempo de 1 e 72 horas; e a quantidade de IL-10, no tempo de 48 horas. Já na interação com células escleróticas, apenas a quantidade de TNF- α diferiu do controle, sendo maior no período de 1 a 48 horas.

7. REFERÊNCIAS

ABE, E.; MOCHARLA, H.; YAMATE, T.; TAGUCHI, Y. & MANOLAGAS, S. C. **Meltrin-alpha, a fusion protein involved in multinucleated giant cell and osteoclast formation.** *Calcif. Tissue Int.*, v. 64: 508-515, 1999.

ADHUNA; SALOTRA, P.; BHATNAGAR, R. **Nitric oxide induced expression of stress proteins in virulent and avirulent promastigotes of *Leishmania donovani*.** *Immunol. Lett.*, v. 71: 171-176, 2000.

ALGOOD, H. M. S.; LIN, p. I. & FLYNN, J. L. **Tumor Necrosis factor and chemokine interations in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis.** *Clin. Infect. Dis.*, v. 41: 189-193, 2005.

ALGOOD, H. M.; LIN, P. L.; YANKURA, D.; JONES, A.; CHAN, J. & FLYNN, J. L. **TNF influences chemokine expression of macrophages *in vitro* and that of CD11b+ cells *in vivo* during *Mycobacterium tuberculosis* infection.** *J Immunol*, v. 172: 6846–57, 2004.

ALVIANO, C. S.; FARBIARZ, S. R.; DE SOUZA, W.; ANGLUSTER, J. & TRAVASSOS, L. R. **Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melanin.** *J. Gen. Microbiol.*, v. 137: 837-844, 1991.

ALVIANO, C. S.; FARBIARZ, S. R.; TRAVASSOS, L. R.; ANGLUSTER, J. & DE SOUZA, W. **Effect of environmental factors on *Fonsecae pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propanolol.** *Mycophatology*, v. 119:17-23, 1992.

ALVIANO, D. S.; FRANZEN, A. J.; TRAVASSOS, L. R.; HOLANDINO, C.; ROZENTAL, S.; EJZEMBERG, R.; ALVIANO, C. S. & RODRIGUES, M. L. **Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of fagocytes.** *Infection and Immunity*, v. 72: 1-9, 2004.

ALVIANO, D. S.; RODRIGUES, M. L; TRAVASSOS, L. R.; & ALVIANO, C. S. **Differentiation of *Fonsecaea pedrosoi* mycelial forms into sclerotic cells is induced by platelet-activating factor.** *Res. Microbiol.*, v. 154:689-695, 2003.

ARANGO, M.; JARAMILLO, C.; CORTÉS, A. & RESTREPO, A. **Auricular chromoblastomycosis caused by *Rhinocladiella aquaspersa***. Med. Mycol, v. 36: 43-45, 1998.

ARORA, K. S.; SINHA, R.; SEHGAL, S. **Use of *in vitro* method to assess different brands of anti-leishmanial drugs**. Med. Microbiol. Immunol., v. 180: 21-27, 1991.

BARBA-GÓMEZ FJ, JESÚS MAYORGA, MICHAEL MCGINNIS AND GONZÁLES-MEMDOZA. **Chromoblastomycosis caused by *Exophiala spinifera***. J. Am. Acad. Dermatol., V. 26: 367-70, 1992.

BAUMAN, S. K.; NICHOLS, K. L. & MURPHY, J. W. **Dendritic cells in the induction of protective and nonprotective anticryptococcal cell-mediated immune responses**. J. Immunol., v. 165: 158-167, 2000.

BOCCA, A. L.; BRITO, P. P. M. S.; FIGUEIREDO, F. & TOSTA, C. E. **Inhibition of nitric oxide production by macrophages in chromoblastomycosis: a role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin**. Mycopathologia, v. 161: 195-203, 2006.

BONIFAZ A, MARTINEZ-SOTO E, CARRASCO-GERARD E, PENICHE J. **Treatment of chromoblastomycosis with itraconazole, cryosurgery, and a combination of both**. Int. J. Dermatol., v. 36: 542-7, 1997.

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

CARRIÓN, A. L. **Chromoblastomycosis**. Ann. NY Acad. Sci., v. 50, p. 1255-1282, 1950.

CHAMBERS, T. J. & SPECTOR, W.G. **Inflammatory giant cells**. Immunobiol., v. 161, p. 283-289, 1982.

CHAMBERS, T. J. **Fusion of hamster macrophages induced by lectins.** J. Pathol., v. 123, p. 53-61, 1977.

CHANTEUX, H.; GUISET, A. C.; PILETTE, C. & SIBILLE, Y. **LPS induces IL-10 production by human alveolar macrophages via MAPKinases- and Spl-dependent mechanisms.** Respir. Res., v. 8, p. 71, 2007.

CHENSUE, S. W.; TEREBUH, P. D.; WARMINGTON, K. S.; HERSHEY, S. D.; EVANOFF, H. L.; KUNKEL, S. L. & HIGASHI, G. I. **Role of IL-4 and IFN-gamma in Schistosoma mansoni egginduced hypersensitivity granuloma formation. Orchestration, relative contribution, and relationship to macrophage function.** J. Immunol., v. 148, p. 900-906, 1992.

CUI, W.; KE, J. Z.; ZHANG, Q.; KE, H. Z.; CHALOUNI, C. & VIGNERY, A. **The intracellular domain of CD44 promotes the fusion of macrophages.** Blood, v. 107, p. 796-805, 2006.

D'ÁVILA, S. C. G. P.; PAGLIARI, C. & DUARE, M. I. S. **The cell-mediated immune reaction in the cutaneous lesion of chromoblastomycosis and their correlation with different clinical forms of the disease.** Mycopathologia, v. 156, p. 51-60, 2002.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; E FIGUEIRAS, M. J. **Atlas of clinical fungi**, 2ª Edição, Universidade de Rovira i Virgili, Espanha, 2000.

DEFIFE, K. M.; JENNEY, C. R.; MCNALLY, A. K.; COLTON, E. & ANDERSON, J. M. **Interleukin-13 induces human monocyte/macrophage fusion and macrophage mannose receptor expression.** J. Immunol., v. 158, p. 3385-3390, 1997.

DEVES, R. & BOYD, C.A. **Surface antigen CD98 (4F2): not a single membrane protein, but a family of proteins with multiple functions.** J. Membr. Biol., v. 173, p. 165-177, 2000.

DI VIRGILIO, F.; FALZONI, S.; CHIOZZI, P.; SANZ, J. M.; FERRARI, D. & BUELL, G. N. **ATP receptors and giant cell formation.** J. Leukoc. Biol., v. 66, p. 723-726, 1999.

ELLIS, D. H. & GRIFFITHS, D. A. **The location and analysis of melanins in the cell wall of some soil fungi.** Can. J. Microbiol., v. 20, p. 1379-1386.

ESTERRE, P.; JAHEVITRA, M.; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A. **Humoral immune response in chromoblastomycosis during and after therapy.** Clin. Diag. Lab. Immunol., v. 7, p. 497-500, 2000.

ESTERRE, P.; PEYROL, S.; SAINTE-MARIE, D.; PRADINAUD, R. & GRIMAUD, J. A. **Granulomatous reaction and tissue remodeling in the cutaneous lesion of chromomycosis.** Virchows Archiv A Pathol Anat, v. 422, p. 285-291, 1993.

EVANS, C. E. & JONES, S. **Soluble factors secreted by macrophage-like cells in vitro cause osteoprogenitor cell detachment.** Calcif. Tissue Int., v. 63, p. 496-504, 1998.

FADER, R. C. & MC GINNIS, M. R. **Infections caused by dematiaceous fungi: Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis.** Infect. Dis. Clin. North. Am, v. 2, p. 925-938, 1988.

FAIS, S.; BURGIO, V. L.; SILVESTRI, M.; CAPOBIANCHI, M. R.; PACCHIAROTTI, A. & PALLONE, F. **Multinucleated giant cells generation induced by interferon-gamma. Changes in the expression and distribution of the intercellular adhesion molecule-1 during macrophages fusion and multinucleated giant cell formation.** Lab. Invest., v. 71, p. 737-744, 1994.

FALZONI, S.; CHIOZZI, P.; FERRARI, D.; BUELL, G. & DI VIRGILIO, F. **P2X(7) receptor and polykarion formation.** Mol. Biol. Cell., v. 11, p. 3169-3176, 2000.

FARBIARZ, S. R.; CARVALHO, T. U.; ALVIANO, C. & DE SOUZA, W. **Fine structure and cytochemistry of the interation between *Fonsecaea pedrosoi* and mouse resident macrophages.** J. Med. Vet. Mycol., v. 28, p. 375-385, 1990.

FARBIARZ, S. R.; CARVALHO, T. V.; ALVIANO, C. & SOUZA, W. **Inhibitory effect of melanin on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with mammalian cells in vitro.** J. Med. Vet. Mycol., v. 30, p. 265-273, 1992.

FLYNN, J. L.; GOLDSTEIN, M. M.; CHAN, J.; ET AL. **Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *M. tuberculosis* in mice.** *Immunity*, v. 2, p.561-72, 1995.

FRANZEN, A. J.; CUNHA, M. L.; MIRANDA, K; HENTSCHEL, J.; PLATTNER, H.; SILVA, M. B.; SALGADO, C. G.; SOUZA, W. & ROZENTAL, S. **Ultrastructural characterization of melanosomes of the human pathogenic fungus *Fonsecaea pedrosoi*.** *J. Struct. Biol.*, v. 162, p. 75-84, 2008.

FRANZEN, A. J.; DE SOUZA, W.; FARINA, M. F.; ALVIANO, C. S. & ROZENTAL, S. **Morphometric and Densitometric Study of the Biogenesis of Electron Dense Granules in *Fonsecaea pedrosoi*.** *FEMS Microbiological Letters*. 173:395-402, 1999.

GARCIA-PALACIOS, V.; YEON CHUNG, H.; JIN CHOI, S.; SARMASIK, A.; KURIHARA, N.; WON LEE, J.; GALSON, D. L.; COLLINS, R. & ROODMAN, G. D. **Eosinophil chemotactic factor-L (ECF-L) enhances osteoclast formation by increasing in osteoclast precursors expression of LFA-1 and ICAM-1.** *Bone*, v. 40, p. 316-322, 2007.

GIMENES, V. M. F.; SOUZA, M. G.; FERREIRA, K. S.; MARQUES, S. G.; GONÇALVES, A. G.; SANTOS, D. V. C. L; SILVA, C. M. P. & ALMEIDA, S. R. **Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis.** *Microb. Infect.*, v. 7, p. 708-713, 2005.

GORDON, S. **Alternative activation of macrophages.** *Nat. Rev. Immunol.*, v. 3, p. 23-35, 2003.

GORDON, S.; PERRY, V. H.; RABINOWITZ, S.; CHUNG, L. P. & ROSEN, H. **Plasma membrane receptors of the mononuclear phagocyte system.** *J. Cell Sci.*, v. 9, p. 1-26, 1988.

GREENBERG, S. **Signal transduction of phagocytosis.** *Trends Cell Biol.*, v. 5, p. 93-99, 1995.

HAMILTON, A.J. & GOMEZ, B.L. **Melanins in fungal pathogens.** *J. Med. Microbiol.*, v. 51, p. 189-191, 2002.

HAN, X.; STERLING, H.; CHEN, Y.; SAGINARIO, C.; BROWN, E. J.; FRAZIER, W. A.; LINDBERG, F. P. & VIGNERY, A. **CD47, a ligand for the macrophage fusion receptor, participates in macrophage multinucleation.** J. Biol. Chem., v. 275, p. 37984-37992, 2000.

HELMING, L. & GORDON, S. **Macrophage fusion induced by IL-4 alternative activation is a multistage process involving multiple target molecules.** Eur. J. Immunol., v. 37, p. 33-42, 2007.

HELMING, L. & GORDON, S. **The molecular basis of macrophage fusion.** Immunobiol., v. 212p. 785-793, 2008.

HERBERT, D. R.; HOLSCHER, C.; MOHRS, M.; ARENDSE, B.; SCHWEGMANN, A.; RADWANSKA, M.; LEETO, M.; KIRSCH, R.; HALL, P.; MOSSMANN, H.; CLAUSSEN, B.; FORSTER, I. & BROMBACHER, F. **Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology.** Immunity, v. 20, p. 623-635, 2004.

HERNANDEZ, L. D.; HOFFMAN, L. R.; WOLFSBERG, T. G. AND WHITE, J. M. **Virus-cell and cell-cell fusion.** Annu. Rev. Cell. Dev. Biol., v. 12, p. 627-661, 1996.

ISHII, M.; IWAI, K.; KOIKE, M.; OHSHIMA, S.; KUDO-TANAKA, E.; ISHII, T.; MIMA, T.; KATADA, Y.; MIYATAKE, K.; UCHIYAMA, Y., & SAEKI, Y. **RANKL-induced expression of tetraspanin CD9 in lipid raft membrane microdomain is essential for cell fusion during osteoclastogenesis.** J. Bone Miner. Res., v. 21, p. 965-976, 2006.

ITO, Y.; KOMADA, H.; KUSAGAWA, S.; TSURUDOME, M.; MATSUMURA, H.; KAWANO, M.; OHTA, H. & NISHIO, M. **Fusion regulation proteins on the cell surface: isolation and characterization of monoclonal antibodies which enhance giant polykaryocyte formation in Newcastle disease virus-infected cell lines of human origin.** J. Virol., v. 66, p. 5999-6007, 1992.

KAJI, K.; ODA, S.; SHIKANO, T.; OHNUKI, T.; UEMATSU, Y.; SAKAGAMI, J.; TADA, N.; MIYAZAKI, S. & KUDO, A. **The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice.** Nat. Genet., v. 24, p. 279-282, 2000.

KAO, W. J.; MCNALLY, A. K.; HILTNER, A. & ANDERSON, J. M. **Role for interleukin-4 in foreign-body giant cell formation on a poly (etherurethane urea) *in vivo*.** J. Biomed. Mater. Res., v. 29, p. 1267-1275, 1995.

KAZAZI, F.; CHANG, J.; LOPEZ, A.; VADAS, M. & CUNNINGHAM, A. L. **Interleukin 4 and human immunodeficiency virus stimulate LFA-1-ICAM-1-mediated aggregation of monocytes and subsequent giant cell formation.** J. Gen. Virol., v. 75 (Pt 10), p. 2795-2802, 1994.

KE, H. Z.; QI, H.; WEIDEMA, A. F.; ZHANG, Q.; PANUPINTHU, N.; CRAWFORD, D. T.; GRASSER, W. A.; PARALKAR, V. M.; LI, M.; AUDOLY, L. P.; GABEL, C. A.; JEE, W.S.; DIXON, S.J.; SIMS, S. M. & THOMPSON, D. D. **Deletion of the P2-nucleotide receptor reveals its regulatory roles in bone formation and resorption.** Mol. Endocrinol., v. 17, p. 1356-1367, 2003.

KIM, M. S.; DAY, C. J.; SELINGER, C.I.; MAGNO, C.L.; STEPHENS, S.R. & MORRISON, N. A. **MCP-1-induced human osteoclast-like cells are tartrate-resistant acid phosphatase, NFATc1, and calcitonin receptor-positive but require receptor activator of NFkappaB ligand for bone resorption.** J. Biol. Chem., v. 28, p. 1274-1285, 2006.

KLINGEMANN, H. G. & DEDHAR, S. **Distribution of integrins on human peripheral blood mononuclear cells.** The American Society of Hematology, v. 74, p. 1348-1354, 1989.

KYRIAKIDES, T. R.; FOSTER, M. J.; KEENEY, G. E.; TSAI, A.; GIACHELLI, C. M.; CLARK-LEWIS, I.; ROLLINS, B. J. & BORNSTEIN, P. **The CC chemokine ligand, CCL2/MCP1, participates in macrophage fusion and foreign body giant cell formation.** Am. J. Pathol., v. 165, p. 2157-2166, 2004.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M & TAKAHASHI, N. M. Cromoblastomicose. **Tratado de Micologia Médica** Lacaz, 9ª Edição, Ed.: Sarvier, São Paulo-SP, 2002.

LIMONGI, C. L.; ROZENTAL, S.; ALVIANO, C. S. & DE SOUZA, W. **The influence of surface carbohydrates on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with Chinese hamster Ovary glycosylation mutant cells.** Mycopathologia, v. 138, p. 127-135, 1997.

LIU, Y. J., H. KANZLER, V. SOUMELIS, AND M. GILLIET. **Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation.** Nat. Immunol., v. 2, p. 585-589, 2001.

LUNDBERG, P.; KOSKINEN, C.; BALDOCK, P. A.; LOTHGREN, H.; STENBERG, A.; LERNER, U. H. & OLDENBORG, P. A. **Osteoclast formation is strongly reduced both in vivo and in vitro in the absence of CD47/SIRPalpha-interaction.** Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 352, p. 444-448, 2007.

Mac MICKING, J.; OIAO-WEN, X. & NATHAN, C. **Nitric oxide and macrophage function.** Annu. Rev. Immunol., v. 15, p. 323-350, 1997.

MAMBULA, S. S.; SIMONS, E. R.; HASTEY, R.; SELSTED, M. E. & LEVITZ, S. M. **Human neutrophil-mediated nonoxidative antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*.** Infec. Immun., v. 68, p. 6257-6264, 2000.

MARSH, M. & HELENIUS, A. **Virus entry: open sesame.** Cell, v. 124, p. 729-740, 2006.

MBALAVIELE, G.; CHEN, H.; BOYCE, B. F.; MUNDY, G. R. & YONEDA, T. **The role of cadherin in the generation of multinucleated osteoclasts from mononuclear precursors in murine marrow.** J. Clin. Invest., v. 95, p. 2757-2765, 1995.

Mc GINNIS, M. R. **Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis, and mycology.** J. Am. Acad. Dermatol., v. 8 (1), p. 1-16, 1983.

McGINNIS, M. R.; HILGER, A. E. & HILL, C. **Infections caused by black fungi.** Arch. Dermatol., v. 123, p. 1300-1302, 1987.

MCINNES, A. & RENNICK, D. M. **Interleukin 4 induces cultured monocytes/macrophages to form giant multinucleated cells.** J. Exp. Med., v. 167, p. 598-611, 1988.

MCNALLY, A. K. & ANDERSON, J. M. **Beta1 and beta2 integrins mediate adhesion during macrophage fusion and multinucleated foreign body giant cell formation.** Am. J. Pathol., v. 160, p. 621-630, 2002.

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.

MCNALLY, A. K.; DEFIFE, K. M. & ANDERSON, J. M. **Interleukin-4-induced macrophage fusion is prevented by inhibitors of mannose receptor activity.** Am. J. Pathol., v. 149, p. 975-985, 1996.

MENDONZA, L.; KARUPPAYIL, S. M. & SZANISZLO, P.J. **Calcium regulates *in vitro* dimorphism in chromoblastomycotic fungi.** Micoses., v. 36, p. 157-164, 1993.

MILDER, R. & KLOETZEL, J. **The development of *Trypanosoma cruzi* in macrophages in vitro. Interactions com lisosomes and host cell fate.** Parasitology, v. 80, p. 139-145, 1980.

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

MIYADO, K.; YAMADA, G.; YAMADA, S.; HASUWA, H.; NAKAMURA, Y.; RYU, F.; SUZUKI, K.; KOSAI, K.; INOUE, K.; OGURA, A.; OKABE, M. & MEKADA, E., **Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization.** Science, v. 287, p. 321-324, 2000.

MIZUNO, K.; OKAMOTO, H. & HORIO, T. **Inhibitory influences of xanthine oxidase inhibitor and angiotensin I-converting enzyme inhibitor on multinucleated giant cell formation from monocytes by downregulation of adhesion molecules and purinergic receptors.** Br. J. Dermatol., v. 150, p. 205-210, 2004.

MIZUNO, K.; OKAMOTO, H. & HORIO, T. **Muramyl dipeptide and mononuclear cell supernatant induce Langhans-type cells from human monocytes.** J. Leukoc. Biol., v. 70, p. 386-394, 2001.

MOHAN V. P.; SCANGA C. A.; YU, K.; SCOTT, H. M.; TANAKA, K.E. & TSANG, E. **Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology.** Infect Immunol, v. 69(3), p. 1847-55, 2001.

MOORE, K. W.; MALEFYT, F. W.; COFFMAM, R. L & O'GARRA, A. **Interleukin-10 and the Interleukin-receptor.** Annual Review of Immunology, 19: 683-765, 2001.

MURPHY, J. W. **Mechanisms of natural resistance to human pathogenic fungi.** Annu. Rev. Microbiol., v. 49, p. 509-538, 1991.

MURREY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. **Elements of host protective response.** Medical Microbial 3rd ed., p. 80, 1998.

NAMBA, K.; NISHIO, M.; MORI, K.; MIYAMOTO, N.; TSURUDOME, M.; ITO, M.; KAWANO, M.; UCHIDA, A. & ITO, Y. **Involvement of ADAM9 in multinucleated giant cell formation of blood monocytes.** Cell. Immunol., v. 213, p. 104-113, 2001.

OHUCHI, M.; OHUCHI, R.; FELDMANN, A. & KLENK, H. D. **Regulation of receptor binding affinity of influenza virus hemagglutinin by its carbohydrate moiety.** J. Virol., v. 71, p. 8377-8384, 1997.

OKADA, Y.; MORIMOTO, I.; URA, K.; WATANABE, K.; ETO, S.; KUMEGAWA, M.; RAISZ, L.; PILBEAM, C. & TANAKA, Y. **Cell-to-cell adhesion via intercellular adhesion molecule-1 and leukocyte function-associated antigen-1 pathway is**

involved in 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$, PTH and IL-1 α induced osteoclast differentiation and bone resorption. *Endocr. J.*, v. 49, p. 483-495, 2002.

OSUMA, A.; GAMARRO, F.; CASTANIS, S. & RUIZ-PEREZ, M. **Inhibition of lysosomal fusion by *trypanosoma cruzi* in peritoneal macrophage.** *Int. J. Parasitol.*, v. 16, p. 629-632, 1986.

PADHYE, A. A.; HAMPTON, A. A.; HAMPTON, M. T.; HUTTON, N. W.; PRESVOST-SMITH, E. & DAVIS, M. S. **Chromoblastomycosis caused by *Exophiala spinifera*.** *Clin. Infect. Dis.*;22:331-5. 1996.

PANG, K. R.; WU, J. J.; HUANG, D. B. & TYRING, S. K. **Subcutaneous fungal infections.** *Dermatol. Ther.*, v. 7, p. 523-531, 2004.

PIEMONTE, M. R. & BUCHI, D. F. **Analysis of IL-2, IFN- γ and TNF- α production, α 5 β 1 integrins and actin filaments distribution in peritoneal mouse macrophages treated with homeopathic medicament.** *Journal Submicrosc. Cytol. Pathol.*, v. 34 (3), p. 255-263, 2002.

RABINOVITCH, M. **Professional and non-professional phagocytes: an introduction.** *Trends Cell Biol.*, v. 5, p. 85-87, 1995.

REISSE, E. & NICHERSON, W. J. **Control of dimorphism in *Phialophora verrucosa*.** *Sabouraudia*, v. 12: 202-213, 1974.

RESTREPO, A. **Treatment of tropical mycosis.** *J. Am. Acad. Dermatol.*, v. 31 (2): s91-s102, 1994.

REZENDE, S. A.; TEIXEIRA-SILVA, D. N.; DRUMMOND, S. C. & GOES, A. M. **IL-10 plays a role in the modulation of human granulomatous hypersensitivity against *Shistosoma mansoni* eggs induced by immune complexes.** *Scand J. Immunol.*, v. 46, p. 96-102, 1997.

RIDDEL, R. W. **Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture.** *Mycologia*, v. 42, p. 265-270, 1950.

- RIPPON, J. W. **Chromoblastomycosis**. Medical Mycology. W. B. Saunders Co., Philadelphia, 276-296, 1988.
- ROMANI, L. **Immunity to fungal infections**. Nat. Rev. Immunol., v. 4, p. 1-23, 2004.
- ROMANI, L.; BISTONI, F. & PUCCETTI, P. **Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence**. Trends Microbiol., 10: 508-514, 2002.
- ROZENTAL, S. ; ALVIANO, C. & DE SOUZA, W. **Fine structure and cytochemical study of the interaction between *Fonsecaea pedrosoi* and rat polymorphonuclear leukocyte**. J. Med. Vet. Mycol., v. 34, p. 323-300, 1996.
- ROZENTAL, S.; ALVIANO, C. & DE SOUZA, W. **The *in vitro* susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* to activated macrophages**. Mycopathologia, v. 126, p. 85-91, 1994.
- RUBINSTEIN, E.; ZIYYAT, A.; PRENANT, M.; WROBEL, E.; WOLF, J.P.; LEVY, S.; LE NAOUR, F. & BOUCHEIX, C. **Reduced fertility of female mice lacking CD81**. Dev. Biol., v. 290, p. 351-358, 2006a.
- RUBINSTEIN, E.; ZIYYAT, A.; WOLF, J. P.; LE NAOUR, F. & BOUCHEIX, C. **The molecular players of sperm-egg fusion in mammals**. Semin. Cell. Dev. Biol., v. 17, p. 254-263, 2006b.
- SAGINARIO, C.; STERLING, H.; BECKERS, C.; KOBAYASHI, R.; SOLIMENA, M.; ULLU, E. & VIGNERY, A. **MFR, a putative receptor mediating the fusion of macrophages**. Mol. Cell Biol., v. 18, p. 6213-6223, 1998.
- SALGADO, C. G., DA SILVA, J. P., DA SILVA, M. B. et al. Cutaneous diffuse chromoblastomycosis. Lancet. Infect. Dis., v. 5, p. 528, 2005.
- SALGADO, C. G.; SILVA, J. P.; DINIZ, J. A. P.; SILVA, M. B. DA; COSTA, P. F., TEIXEIRA, C. & SALGADO, U. I. **Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis**. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, v. 46 (1), p. 33-36, 2004.

SAN-BLAS, G. **The cell wall of fungal human pathogens: Its possible role in host-parasite relationships.** Mycopathologia., v.79, p. 159-184, 1982.

SCHNITZLER, N.; PELTROCHE-LLACSAHUANGA, H.; BESTIER, N.; ZUNDORF, J.; LUTTIKEN, R. & HAASE, G. **Effect of melanin and carotenoids of *Exophiala (Wangiell) dermatitidis* on phagocytosis, oxidative burst and killing by human neutrophils.** Infec. Immunol., v. 67, p. 94-101, 1999.

SCHURR, E.; WUNDERLICH, F. & TADESSE, G. **Electron microscopical studies on cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. II. Parasite and host cell differences between the localized and the diffuse form.** Acta. Trop., v. 44 (4), p. 395-407, 1987.

SHMUEL, S, & LEVITZ, S. M. **The immune response to fungal infections.** Brit. J. Haematol., v. 129, p. 569-582, 2005.

SILVA, J. P.; ALVIANO, D. S.; DE SOUZA, W.; TRAVASSOS, L. R.; DINIZ, J. A. P. & ROZENTAL, S. **Comparison of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells obtained *in vivo* and *in vitro*: ultrastructure and antigenicity.** FEMS Immunol. Med. Microbiol., v. 33, p. 63-69, 2002.

SILVA, J. P.; SILVA, M. B.; SALGADO, U. I.; DINIZ, J. A. P.; ROZENTAL, S.; SALGADO, C. G. **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, 2007.

SILVA, J. P.; SOUZA, W. DE & ROZENTAL, S. **Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic region (Brazil).** Mycopathologia, v. 143, p. 171-175, 1999.

SILVA, M. B. **Elaboração e avaliação de meios de cultura naturais para a indução de células escleróticas de *Fonsecaea pedrosoi*.** Trabalho de Conclusão de Curso. Belém do Pará. Universidade Federal do Pará; p. 11. 2003.

SILVERSTEIN, S. C. **Phagocytosis of microbes: insights and prospects.** Trends Cell Biol., v. 5, p. 141-42, 1995.

SOARES, R. M. A.; ANGLUSTER, J.; DE SOUZA, W. & ALVIANO, C. S. **Carbohydrate and lipid components of hyphae and conidia of human pathogen *Fonsecaea pedrosoi***. *Mycopathologia.*, v.132, p. 71-77, 1995.

SOLLNER, T. H. **Intracellular and viral membrane fusion: a uniting mechanism**. *Curr. Opin. Cell Biol.*, v. 16, p. 429-435, 2004.

SOTTO, M. N.; BRITO, T. de; SILVA, A. M.; VIDAL, M. & CASTRO, L. G. **Antigen distribution and antigen-presenting cells in skin biopsies of human chromoblastomycosis**. *J. Cutan. Pathol.*, v.31, p. 14-18, 2004.

STAEGE, H.; BRAUCHLIN, A.; SCHOEDON, G. & SCHAFFNER, A. **Two novel genes FIND and LIND differentially expressed in deactivated and Listeria-infected human macrophages**. *Immunogenetics*, v. 53, p. 105-113, 2001.

STARFFORD, L. J.; NEUMANN, N. F.; BELOSEVIC, M. **Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites**. *Crit. Rev. Microbiol.*, v. 28, p. 187-248, 2002.

STEIN, M.; KESHAV, S.; HARRIS, N. & GORDON, S. **Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation**. *J. Exp. Med.*, v. 176, p. 287-292; 1992.

STERLING, H.; SAGINARIO, C. & VIGNERY, A. **CD44 occupancy prevents macrophage multinucleation**. *J. Cell Biol.*, v. 14, p. 837-847, 1998.

TACHIBANA, I. & HEMLER, M. E. **Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube maintenance**. *J. Cell Biol.*, v. 146, p. 893-904, 1999.

TAKASHIMA, T.; OHNISHI, K.; TSUYUGUCHI, I. & KISHIMOTO, S. **Differential regulation of formation of multinucleated giant cells from concanavalin A-stimulated human blood monocytes by IFN-gamma and IL-4**. *J. Immunol.*, v. 150, p. 3002-3010; 1993.

TAKEDA, Y.; TACHIBANA, I.; MIYADO, K.; KOBAYASHI, M.; MIYAZAKI, T.; FUNAKOSHI, T.; KIMURA, H.; YAMANE, H.; SAITO, Y.; GOTO, H.; YONEDA, T.; YOSHIDA, M.; KUMAGAI, T.; OSAKI, T.; HAYASHI, S.; KAWASE, I. & MEKADA, E. **Tetraspanins CD9 and CD81 function to prevent the fusion of mononuclear phagocytes.** J. Cell Biol., v. 161, p. 945-956, 2003.

TELLES, F. Q.; Mc GINNIS, M. R.; SALKIN, I. & GRAYBILL, J. R. **Subcutaneous mycoses.** Infect. Dis. Clin. North Am., v. 17, p. 59-85, 2003.

VIGNERY, A. **Macrophage fusion: the making of osteoclasts and giant cells.** J. Exp. Med., v. 202, p. 337-340, 2005.

WALLIS, R. S. & EHLERS, S. **Tumor Necrosis Factor and granuloma biology: explaining the differential infection risk of etanercept and infliximab.** Semin. arthritis rheum., v. 34, p. 34-38, 2005.

WRIGHT, S. D. & MEYER, B. C. **Fibronectin receptors of human macrophages recognizes the sequence arg-gly-asp-ser.** J. Exp. Med., v. 162, p. 762-767, 1985.

YAGAMI-HIROMASA, T.; SATO, T.; KURISAKI, T.; KAMIJO, K.; NABESHIMA, Y. & FUJISAWA-SEHARA, A. **A metalloprotease- disintegrin participating in myoblast fusion.** Nature, v. 377, p. 652-656, 1995.

YAGI, M.; MIYAMOTO, T.; SAWATANI, Y.; IWAMOTO, K.; HOSOGANE, N.; FUJITA, N.; MORITA, K.; NINOMIYA, K.; SUZUKI, T.; MIYAMOTO, K.; OIKE, Y.; TAKEYA, M.; TOYAMA, Y. & SUDA, T. **DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells.** J. Exp. Med., v. 202, p. 345-351, 2005.

YASUDA, H.; SHIMA, N.; NAKAGAWA, N.; YAMAGUCHI, K.; KINOSAKI, M.; MOCHIZUKI, S.; TOMOYASU, A.; YANO, K.; GOTO, M.; MURAKAMI, A.; TSUDA, E.; MORINAGA, T.; HIGASHIO, K.; UDAGAWA, N.; TAKAHASHI, N. & SUDA, T. **Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 95, p. 3597-3602, 1998.

ZEPPENFELDT, G.; RICHARD-YEGRES, N.; HERNÁNDEZ, R. *Cladosporium carrioni*: hongo dimórfico en cactáceas de la zona endémica para la cromomicosis en Venezuela. Ver. Iber. Micol., p. 61-63, 1994.