

SUELLEN SIRLEIDE PEREIRA YAMANO

**IMUNOPATOGENIA DA INTERAÇÃO ENTRE MACRÓFAGOS e/ou CÉLULAS DE
LANGERHANS E *Lacazia loboi***

Belém - PA

2014

SUELLEN SIRLEIDE PEREIRA YAMANO

**IMUNOPATOGENIA DA INTERAÇÃO ENTRE MACRÓFAGOS e/ou CÉLULAS DE
LANGERHANS E *Lacazia loboi***

Tese apresentada ao Programa 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 doutora em Neurociências e Biologia Celular.

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

Belém - Pa

2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Yamano, Suellen Sirleide Pereira, 1984-
Imunopatogenia da interação entre macrófagos
e/ou células de langerhans e *Lacazia loboi* /
Suellen Sirleide Pereira Yamano. - 2014.

Orientador: Claudio Guedes Salgado.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do
Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa
de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia
Celular, Belém, 2014.

1. Lobomicose. 2. Células de Langerhans. 3.
Macrófagos. 4. Citocinas. 5. Relação
hospedeiro-parasito. I. Título.

CDD 22. ed. 616.969

SUELLEN SIRLEIDE PEREIRA YAMANO

**IMUNOPATOGENIA DA INTERAÇÃO ENTRE MACRÓFAGOS e/ou CÉLULAS DE
LANGERHANS E *Lacazia loboi***

Tese apresentada ao Programa 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 doutora em Neurociências e Biologia Celular.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado (orientador)
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

Prof. Dr. Jorge Pereira da Silva
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito Junior
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma
Núcleo de Medicina Tropical – UFPA

Belém - PA

2014

*“A ciência nunca resolve um problema
sem criar pelo menos dez outros”.*

George Bernard Shaw

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

À minha família, principalmente à minha mãe Maria Auxiliadora, meu esposo Ernesto Yamano, minha avó Maria dos Reis por todo apoio, dedicação e amor em todos os momentos, sempre ajudando a realizar os meus sonhos; meus irmãos Edson e Valdiellen, por todas as madrugadas que ficaram esperando no laboratório até que eu terminasse os experimentos para que eu não ficasse sozinha.

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

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 Prof. Dr. Moisés Silva e Simone Campelo, por todo o conhecimento compartilhado e dias de trabalho e alegria vividos.

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 Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular (PPGNBC), ao Instituto Evandro Chagas; à Fundação Amazônia Paraense de Amparo à Pesquisa (FAPESPA), à Secretaria Executiva de Saúde Pública do Estado do Pará, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para esta tese tornar-se realidade, o meu MUITO OBRIGADO.

RESUMO

A lobomicose é uma infecção subcutânea crônica, granulomatosa, causada pela implantação traumática do fungo *Lacazia loboi* nos tecidos cutâneo e subcutâneo. Ocorre predominantemente na região Amazônica e atinge qualquer grupo populacional. Histologicamente, observa-se reação inflamatória crônica caracterizada por intensa histiocitose e fibroplasia, abundante número de macrófagos, células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho e presença de considerável número de células leveduriformes. Os macrófagos são células fagocíticas que participam do reconhecimento e da resposta a patógenos através da fagocitose, da apresentação de antígenos aos linfócitos T e da produção de citocinas. As células de Langerhans (LC) são um grupo de Células dendríticas (CD) derivadas da medula óssea situadas principalmente em uma camada suprabasal da epiderme. Estudos envolvendo a interação fungo-hospedeiro na doença de Jorge Lobo são escassos. Assim, Este estudo é um passo importante para o melhor entendimento da biologia e patogenia do *L. loboi*, e para o estudo da imunopatologia da interação patógeno *versus* hospedeiro desta doença emergente e pouco conhecida. O objetivo do presente trabalho foi analisar a interação *in vitro* entre macrófagos peritoneais não ativados e/ou LC, isolados de camundongos BALB/c, com *L. loboi* recém-isolado de pacientes com doença de Jorge Lobo, bem como determinar os índices de infecção, fagocitose e fusão, e medir a produção das citocinas TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12. Os resultados demonstraram que *L. loboi* é fagocitado por macrófagos, mas não por LC. O índice de infecção na interação entre macrófagos e *L. loboi* foi semelhante à interação entre macrófagos, LC e *L. loboi* em todos os tempos analisados. A média do número de fungos por macrófago também foi praticamente igual entre as interações e ao longo do tempo, variando de 1,2 a 1,6 fungos/macrófagos. Não houve a formação de células gigantes em macrófagos cultivados ou LC cultivadas isoladamente e em nenhum dos co-cultivos. Não houve diferença significativa na produção de IL-4, IL-2 e IL-10 nas interações estudadas. Os níveis de TNF- α diminuem ao longo do tempo na interação entre macrófagos e *L. loboi*, enquanto a adição de LC induz aumento da produção de TNF- α , principalmente após 48 horas. LC modulam negativamente a produção de IL-6 por macrófagos e *L. loboi* também inibem essa produção por macrófagos isoladamente ou em co-cultivo com LC. *L. loboi* estimulam significativamente a produção de IL-12 por macrófagos co-cultivados com LC, mas não em LC ou macrófagos isoladamente. Palavras-chave: *Lacazia loboi*. Células de Langerhans. Macrófagos. Citocinas.

ABSTRACT

Lobomycosis is a chronic, granulomatous, fungal infection of the skin and subcutaneous caused by the fungus *Lacazia loboi*. This mycosis occurs predominantly in Amazon region and affect all populations groups. Histologically, there is a chronic inflammatory reaction characterized by the intense fibroplasia and histiocytosis, abundant number of macrophages, multinucleated giant cells and presence of large numbers of yeast. Macrophages are phagocytic cells that participate in the recognition and response to pathogens through phagocytosis, antigen presentation to T lymphocytes and cytokine production. Langerhans cells (LC) are a group of dendritic cells (DC) derived from bone marrow, which are located mainly in the suprabasal layer of the epidermis. Studies on host-fungal interaction in Jorge Lobo's disease are scarce. Therefore, this study constitutes an important step towards a better understanding of *L. loboi* biology and pathogenesis, enabling *in vitro* culture of this organism endemic in Amazon region and study of their antigenic properties, as well as new therapeutic approaches. The objective of this study was to analyze the *in vitro* interaction between non-activated peritoneal macrophages and/or Langerhans cells isolated from BALB/c mice and *L. loboi*, calculating infection, phagocytosis and cellular fusion rates; also measuring the production of TNF, IL-4, IL-6, IL-10 and IL-12. Results showed that *L. loboi* is phagocytosed by macrophages but not by LC. Phagocytosis and infection rates in the interaction between macrophages and *L. loboi* was similar to interaction between macrophages, Langerhans cells and *L. loboi* at all times analyzed. The mean number of yeast cell per macrophage was almost equal among interactions and over time, with mean variation from 1.2 to 1.6 yeast/macrophages. No giant cells formation in coculture studied. No significant difference occurred in IL-4, IL-2 and IL-10 production between interactions studied. TNF levels decrease in interaction between macrophages and *L. loboi* while adding LC induces increased production of TNF- α , especially after 48 hours. LC negatively modulate IL-6 production by macrophage and *L. loboi* also inhibits this production by macrophages alone or cocultured with LC. *L. loboi* stimulated significantly IL-12 production by macrophages co-cultured with LC, but not for LC alone or macrophages.

Key-words: *Lacazia loboi*. Macrophage. Langerhans cells. Cytokines.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBA	Cytometric Bead Array
CD	Cluster of Differentiation 68
LC	Células de Langerhans
DC	Células Dendríticas
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
GM-CSF	Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos e Macrófagos
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
LPS	Lipopolissacarídeo
MIP-2	Proteína inflamatória macrofágica-2
MHC	Molécula do Complexo Principal de Histocompatibilidade
mL	Mililitro
mm	Milímetro
μ L	Microlitro
rpm	Rotações por minuto
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
Th2	Linfócito T auxiliar do tipo 2

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Aspectos clínicos das lesões de lobomicose.	12
Figura 02 - Distribuição mundial dos casos de lobomicose até 2013.	13
Figura 03 – Exame microscópico direto e histologia para o diagnóstico de <i>L. loboi</i> .	16
Figura 04 – Características morfológicas de <i>L. loboi</i> antes e depois de isolamento.	24
Figura 05: Índice de infecção em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c co-cultivados células de Langerhans e/ou <i>L. loboi</i> .	31
Figura 06: Interação entre macrófagos peritoneais e <i>L. loboi</i> .	32
Figura 07: Interação entre Células de Langerhans e <i>L. loboi</i> .	32
Figura 08: Índice de fagocitose em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c co-cultivados com células de Langerhans e/ou <i>L. loboi</i> .	33
Figura 09. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c co-cultivados com <i>L. loboi</i> .	33
Figura 10: Produção de TNF- α por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, células de Langerhans isoladamente ou ambos em co-cultivo com <i>L. loboi</i> após 3, 24 e 48 horas de interação.	35
Figura 11: Produção de IL-6 por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, células de Langerhans isoladamente ou ambos em co-cultivo com <i>L. loboi</i> após 3, 24 e 48 horas de interação.	36
Figura 12: Produção de IL-12 por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, células de Langerhans isoladamente ou ambos em co-cultivo com <i>L. loboi</i> após 3, 24 e 48 horas de interação.	37

SUMÁRIO

CONTRACAPA	i
FOLHA DE ROSTO	ii
EPÍGRAFE	iii
AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
SUMÁRIO	ix
1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Doença de Jorge Lobo	11
1.1.1 Características Clínicas.....	11
1.1.2 Epidemiologia.....	12
1.1.3 Patogenia e Imunologia.....	14
1.1.4 Diagnóstico.....	15
1.1.5 Tratamento.....	17
1.1.6 O agente etiológico.....	17
1.2. Macrófagos	18
1.3. Células de Langerhans	19
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo geral	22
2.2. Objetivos Específicos	22
3. METODOLOGIA	23
3.1. Animais de Experimentação	23
3.2. Amostra Fúngica	23
3.3. Isolamento da Forma Leveduriforme de <i>L. Lobo</i>	23
3.4. Isolamento e Cultivo de Macrófagos	24
3.5. Isolamento e Cultivo de Células de Langerhans	25
3.6. Interação de Macrófagos com <i>L. Lobo</i>	25

3.7. Interação de Células de Langerhans com <i>L. Lobo</i>	26
3.8. Interação de Macrófagos e Células de Langerhans com <i>L. Lobo</i>	26
3.9 Determinação dos Índices de Infecção, Fagocitose e Fusão Celular.....	26
3.10 Quantificação de Citocinas.....	27
3.11. Citometria de Fluxo.....	29
3.12 Análise Estatística.....	29
3.13 Aspectos Éticos.....	29
4. RESULTADOS.....	30
4.1 Viabilidade Celular.....	30
4.2 Porcentagem de macrófagos infectados (Índice de Infecção).....	30
4.3 Número de fungos por macrófago infectado (Índice de fagocitose).....	31
4.4 Índice de fusão celular.....	33
4.5 Quantificação de citocinas.....	34
5. DISCUSSÃO.....	38
6. CONCLUSÕES.....	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Jorge Lobo

1.1.1 Características Clínicas

A Doença de Jorge Lobo ou Lobomicose foi primeiramente descrita em 1931, pelo médico Jorge Oliveira Lobo em Recife, Brasil (Lobo, 1931). É uma micose crônica, granulomatosa, causada pelo fungo leveduriforme *Lacazia loboi* – ainda não cultivável – e que atinge o tecido cutâneo e subcutâneo. Clinicamente, caracteriza-se pelo polimorfismo das lesões (pápulas, nódulos, placas nodulares ou verruciformes, lesões cicatriciais e ulceradas), mas com predomínio de lesões nodulares de aspecto queiloideano (Figura 01). Quanto à distribuição, pode-se observar formas isoladas ou localizadas e formas disseminadas, sendo que as lesões se distribuem mais frequentemente nos membros inferiores ou superiores, nádegas e no tecido cartilaginoso do pavilhão auricular e nariz. Ardor e prurido no nível das lesões são os sintomas mais presentes (Brito e Quaresma, 2007; Talhari *et al.*, 2008; Baruzzi e Marcopito, 2009).

É relativamente frequente o encontro de dois ou mais tipos de lesões em um mesmo paciente. Com o evoluir do tempo, as placas tendem a se estender, surgindo nódulos em seu interior, de crescimento lento, que podem vir a se ulcerar, dando saída a material seropurulento. Algumas vezes, as lesões podem apresentar aparente regressão para tecido cicatricial que, quando biopsiado, continua a mostrar a presença do fungo (Baruzzi e Marcopito, 2009).

O envolvimento extensivo da pele por disseminação linfática raramente é observado. Mucosas e órgãos internos são poupados, mesmo em casos generalizados, em que se suspeita de disseminação hematogênica (Miranda *et al.*, 2010).



Figura 01 – Aspectos clínicos das lesões de lobomicose. Em todas as fotos pode se observar a presença das lesões mais frequentemente encontradas, com aspecto nodular, queloidiforme, agrupadas em placas. Fonte: Laboratório de Dermato-Imunologia UFPA/UEPA/MC.

1.1.2 Epidemiologia

A micose ocorre mais frequentemente nas regiões tropicais e subtropicais, especialmente na região amazônica. Atinge qualquer grupo populacional, sendo mais frequente em pacientes do sexo masculino com faixa etária de 20 a 40 anos e que desenvolvem atividade rural (Lacaz, Baruzzi e Rosa, 1986; Vilani-Moreno, Silva e Opromolla, 2004).

O Brasil é o país que apresenta o maior número de casos da doença, que também já foi registrada na Venezuela, Colômbia, Panamá, Costa Rica, Guiana Francesa, Guiana Inglesa, Suriname, Peru, Honduras, México, Bolívia, França, EUA, Canadá, África do Sul e Grécia (Figura 02). A maioria dos casos se concentra nos países da América do Sul, sendo que nos casos da França, EUA e Canadá, os indivíduos eram procedentes ou tinham história de

viagem para os países latino-americanos (Lacaz, Baruzzi e Rosa, 1986; Brito e Quaresma, 2007; Al-Daraji, Husain e Robson, 2008; Papadavid *et al.*, 2012).

Há elevada prevalência dessa micose entre os índios Caiabi, no Brasil, com 61 casos descritos até o presente, a maioria deles nas décadas de 60 e 70 (Baruzzi *et al.*, 1967; Baruzzi *et al.*, 1973; Baruzzi, Lacaz e De Souza, 1979; Lacaz, Baruzzi e Rosa, 1986). É importante ressaltar que os índios Caiabi foram transferidos da área que habitavam, na confluência dos rios Arinos e Teles Pires, que formam o rio Tapajós, para o Parque do Xingu, e que após esta mudança não surgiram novos casos nesta etnia indígena (Marcos *et al.*, 2005).

No início da década de 70, tudo indicava que apenas o homem era suscetível à infecção natural pelo *L. loboi*, quando em 1971, houve o primeiro relato do encontro do fungo em golfinhos, no golfo do México, por (Migaki *et al.*, 1971). A partir daí, outros relatos foram surgindo, a maiorias deles em golfinhos da espécie *Tursiops truncatus* (Bermudez *et al.*, 2009; Durden *et al.*, 2009; Paniz-Mondolfi e Sander-Hoffmann, 2009; Rotstein *et al.*, 2009; Murdoch *et al.*, 2010; Burdett Hart *et al.*, 2011). Simões-Lopes e colaboradores registraram o primeiro caso nessa espécie no Brasil, em Santa Catarina (Simões-Lopes *et al.*, 1993).

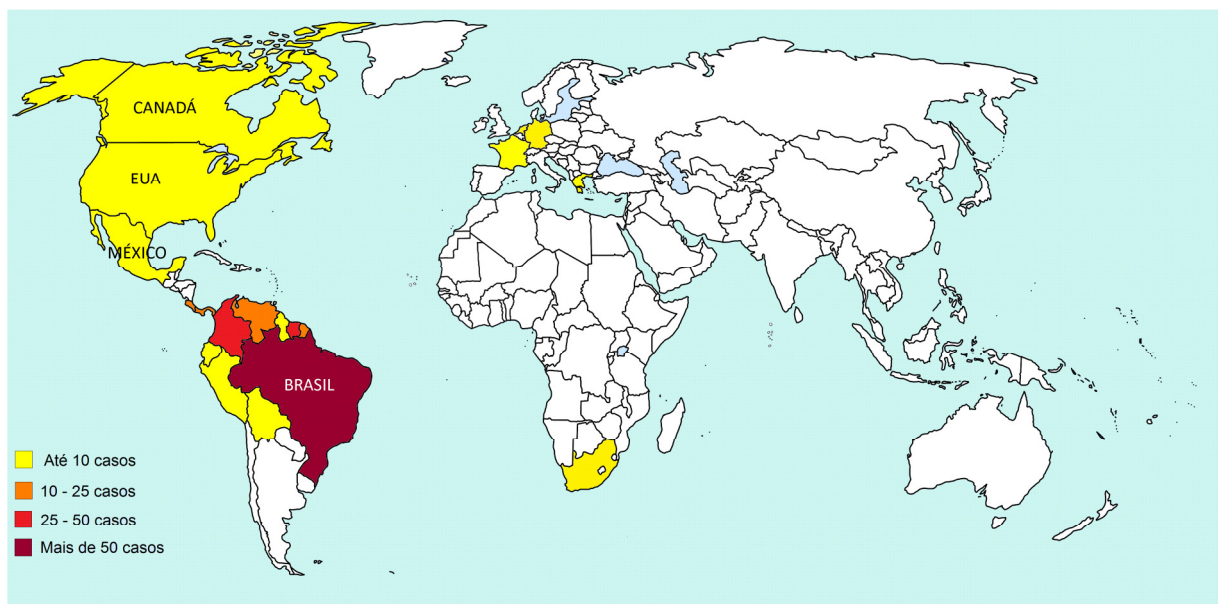


Figura 02 - Distribuição mundial dos casos de lobomicose até 2013. Amarelo (países com menos de 10 casos registrados), laranja (10-25 casos), vermelho (entre 25 e 50 casos) e vermelho escuro (acima de 50 casos). Fonte: Baseado em Papadavid *et al.*, 2012.

A ocorrência da doença em golfinhos e a localização das lesões no homem em áreas do corpo mais expostas a traumas sugerem que *L. loboi* tem, entre seus reservatórios, água doce ou salgada, solo e vegetações em áreas de mata (Lacaz *et al.*, 2002; Baruzzi e Marcopito, 2009).

1.1.3 Patogenia e Imunologia

O reservatório natural de *L. loboi* é desconhecido, mas crê-se que seja aquático, ou associado com o solo e vegetação (Ramos *et al.*, 2009; Talhari *et al.*, 2010; Paniz-Mondolfi *et al.*, 2012; Talhari e Talhari, 2012).

O mecanismo de transmissão da lobomicose ainda não está estabelecido, mas a porta de entrada do agente parece ser a pele através de inoculação traumática. É o que se tem visto em casos em que o paciente relata história de trauma pregresso ao surgimento da lesão, como, por exemplo, indivíduos com lesão na orelha (gravetos) ou nos ombros (transportar carga nos ombros) (Brito e Quaresma, 2007; Baruzzi e Marcopito, 2009; Bermudez *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2009).

Até o momento, não há comprovação de transmissão inter-humana e o período de incubação da doença também é desconhecido, mas baseado nos casos de inoculação acidental ou experimental, parece ser longo e variável (Brito e Quaresma, 2007; Baruzzi e Marcopito, 2009; Ramos *et al.*, 2009).

A julgar pelo polimorfismo das lesões cutâneas, pode-se dizer que a resposta individual do hospedeiro ao *L. loboi* é muito variável. Alguns pacientes manifestam a forma disseminada da doença precocemente, enquanto outros apresentam lesão isolada ou localizada por tempo prolongado. Os mecanismos que favorecem a disseminação da doença e o modo como ocorre são desconhecidos. Para alguns autores, a disseminação ocorre por via hematogênica, com o fungo mantendo o tropismo pela pele, sem atingir órgãos internos e mucosas, enquanto que outros explicam a disseminação das lesões por autoinoculação (Baruzzi e Marcopito, 2009; Miranda *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, pesquisadores do Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL, Bauru, SP) desenvolveram alguns estudos abordando diferentes aspectos imunopatológicos da Doença de

Jorge Lobo. Em relação à população de células do infiltrado inflamatório, observadas em cortes histológicos de biópsias obtidas de pacientes com lobomicose, verificou-se o predomínio de histiócitos e células gigantes multinucleadas. Observou-se a seguinte frequência de células no infiltrado granulomatoso: Histiócitos CD68⁺ > linfócitos CD3⁺ (linfócitos T CD4⁺ > linfócitos T CD8⁺) > células natural killer > plasmócitos CD 79⁺ > linfócitos B CD20⁺ (Vilani-Moreno *et al.*, 2005).

O mesmo grupo avaliou o perfil de citocinas em sobrenadante de cultura de monócitos do sangue periférico de pacientes com lobomicose co-cultivados com *L. loboi*, obtidos por fragmentação, filtração em gaze e posterior autoclavagem de biópsias de pele. Verificaram níveis maiores de IL-4 e níveis menores de IL-6 e IL-2 quando comparado ao grupo controle. Não houve diferença significativa na produção TNF- α , IL-10 e INF- γ . Baseados nos resultados encontrados, os autores sugeriram uma alteração no perfil de citocinas representadas por um predomínio do perfil Th2, onde as células Th2 auxiliariam as células B para produção de anticorpos, com uma predominância de resposta imunológica humoral (Vilani-Moreno, Lauris e Opromolla, 2004).

1.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico clínico é baseado nas manifestações cutâneas, com lesões de longa evolução, sem comprometimento ganglionar, de mucosa ou do estado geral, entre outros achados da anamnese e exame físico (Baruzzi e Marcopito, 2009).

O diagnóstico laboratorial (Figura 03) é baseado na visualização de estruturas leveduriformes no exame micológico direto das lesões, utilizando preparações com KOH 10% ou calcoflúor, e nos cortes histológicos corados por hematoxilina-eosina, método do ácido periódico de Schiff (PAS) e prata-metenamina (De Brito, 2001; Talhari e Talhari, 2012).

Em exame a fresco (Figura 03-A), *L. loboi* apresenta células leveduriformes globosas medindo aproximadamente 9 a 12 μ m de diâmetro com paredes espessas e refringentes, arranjadas isoladamente ou em grupos (Lacaz *et al.*, 2002). Sua reprodução ocorre por brotamento e as células permanecem ligadas entre si - em um ou mais pontos - por uma estreita conexão tubular formando cadeias (catenuação), aspecto característico do fungo *L. loboi in vivo* (Burns *et al.*, 2000).

No exame histopatológico a epiderme apresenta aspecto normal, atrófico, hiperplásico ou ulcerado; e a derme, reação inflamatória crônica granulomatosa, caracterizada por intensa histiocitose e fibroplasia, abundante número de macrófagos, células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho e presença de um grande número de células leveduriformes (Leite, 1954; Lacaz, Baruzzi e Rosa, 1986; De Brito, 2001).

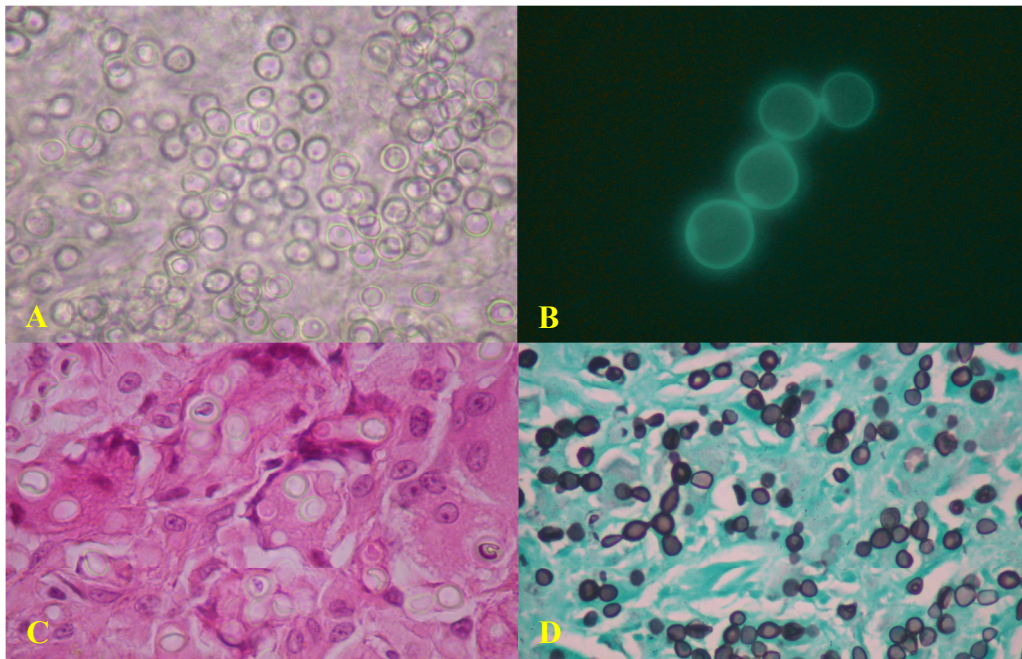


Figura 03 – Exame microscópico direto e histopatologia para o diagnóstico de *L. loboi*. Material biológico retirado das lesões de pacientes com lobomicose e analisado através de exame micológico direto, utilizando preparação de KOH a 10% (A), em preparação com calcoflúor (B), cortes corados por hematoxilina-eosina (C) e prata-metenamina (D). Nestas imagens, pode-se observar o grande número de fungos isolados ou agrupados em arranjo catenulado (ou em rosário). Fonte: Laboratório de Dermato-Imunologia UFPA/UEPA/MC adaptado de Salgado *et al.*, 2009.

O diagnóstico diferencial, com base no aspecto morfológico das lesões, deve ser feito com queloides; hanseníase, nas formas tuberculóide reacional, virchowiana nodular e históide (Wade); leishmaniose tegumentar na fase papular inicial e nas formas nodular e verrucosa; cromoblastomicose; esporotricose; dermatofibrossarcoma (Baruzzi e Marcopito, 2009).

1.1.5 Tratamento

Até o momento, a cirurgia representa a melhor conduta terapêutica, principalmente em lesões isoladas, circunscritas, na fase inicial. Entretanto, recidivas são frequentes, mesmo com tratamento cirúrgico, o que ocorre possivelmente por ressecção insuficiente (Golcman, 1973; Baruzzi *et al.*, 1981; Brito e Quaresma, 2007).

Com relação ao tratamento medicamentoso, muitas drogas utilizadas com sucesso em micoses profundas, como sulfadimetoxina, anfotericina B, sulfametoxazol-trimetoprima e cetoconazol, mostraram resultados insatisfatórios na lobomicose (Brito e Quaresma, 2007; Baruzzi e Marcopito, 2009; Ramos *et al.*, 2009). O uso da associação Clofazimina e Itraconazol apresentou bom resultado, promovendo remissão clínica e histopatológica (Fischer *et al.*, 2002). Também há relato de melhora clínica e laboratorial de pacientes com lobomicose em uso de poliquimioterapia (rifampicina, clofazimina e dapsona) para tratamento de Hanseníase multibacilar (Woods *et al.*, 2010).

Há relato, no Peru, de um paciente com lobomicose no lóbulo da orelha esquerda que foi tratado com sucesso com posaconazol durante 27 meses, sem evidência de recidiva após cinco anos de seguimento (Bustamante *et al.*, 2013).

A dificuldade no tratamento reside nas formas disseminadas, ainda sem fármaco eficaz que apresente mínimos efeitos colaterais e baixo custo, ressaltando-se este último aspecto, já que esta é uma enfermidade ocupacional de trabalhadores rurais (Brito e Quaresma, 2007).

1.1.6 O agente etiológico

O agente etiológico da lobomicose é o *Lacazia loboi*, um fungo patogênico ainda não cultivável que apresenta morfologia arredondada, leveduriforme, com paredes espessas, refringentes e melanizadas (Taborda, Taborda e McGinnis, 1999). Recentemente, foi classificado como sendo próximo de *Paracoccidioides brasilienses* do ponto de vista taxonômico, e ambas as espécies devem ser colocadas na ordem Onygenales, juntamente com *Ajellomices dermatitidis*, *Ajellomyces capsulatum* e *Emmonsia parva* (Herr *et al.*, 2001; Madeira *et al.*, 2003).

L. lobo, já fora agrupado nos gêneros *Paracoccidioides* e *Loboa*. Esta dificuldade taxonômica se deve ao fato do organismo ainda não ter sido cultivado em meios artificiais, o que impede a caracterização microscópica do tipo de reprodução assexuada. Este fungo já recebeu diversas denominações: *Glenosporella lobo* por Fonseca Filho & Área Leão, 1940; *Blastomyces brasiliensis* por Conant & Howell, 1941; *Glenosporopsis amazônica* por Fonseca Filho, 1943; *Paracoccidioides lobo* por Almeida & Lacaz, 1948-1949; *Blastomyces lobo* por Langeron & Vanbreuseghem, 1952; *Lobomyces lobo* por Borelli, 1958. E atualmente é denominado de *Lacazia lobo* por Taborda & McGinnis, 1999, pertencendo ao reino *fungi*, filo *zygomycota*, gênero *Lacazia* e espécie *loboa* – a única espécie de *Lacazia* (De Hoog, Guarro e Figueras, 2000).

1.2 Macrófagos

Os macrófagos são células fagocíticas que desempenham importantes funções no reconhecimento e resposta a microorganismos invasores, como fagocitose, apresentação de antígenos a linfócitos T e secreção de citocinas para iniciar a resposta imune e inflamatória (Murrey *et al.*, 1998). Podem ser estimulados ou inibidos pelo contato com diversos agentes ou por citocinas secretadas por outras células (Ma *et al.*, 2003), efetuando a destruição e a eliminação de patógenos e células estranhas, além de atuar nos processos de reparo tecidual (Hume *et al.*, 2002; Zhang e Mosser, 2008).

Em resposta a estímulos provenientes de microorganismos ou de linfócitos ativados, os macrófagos modificam algumas de suas propriedades, tais como a 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 sistema complemento, envolvidos na fagocitose de partículas opsonizadas e receptores integrínicos, envolvidos na adesão e migração sobre moléculas da matriz extracelular (Murrey *et al.*, 1998; Stafford, Neumann e Belosevic, 2002). A ativação dos macrófagos envolve a interação de citocinas com receptores presentes na membrana destas células, desencadeando uma série de eventos moleculares, que resultam na produção de 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).

1.3 Células de Langerhans

As células de Langerhans (LC), descritas primeiramente por Paul Langerhans em 1868, são um grupo de células dendríticas (DC) derivadas da medula óssea. Localizam-se principalmente na camada suprabasal da epiderme, onde constituem 1 a 3% de todas as células epidérmicas e formam uma rede regular intraepitelial com função sentinela. Ultraestruturalmente, as LC são caracterizadas por uma única organela citoplasmática, o grânulo de Birbeck, uma estrutura membranar, trilaminar e em forma de bastão, inicialmente descrita em 1961 por Birbeck (Birbeck *et al.*, 1961).

As LC são células apresentadoras de antígenos profissionais para a iniciação de resposta aos linfócitos $TCD4^+$ e a sua capacidade funcional é estritamente dependente dos níveis de expressão dos antígenos MHC classe II e das moléculas de adesão (ICAM-1) e coestimulatórias (B7-1 e B7-2) (Salgado *et al.*, 1999). As LC também expressam vários receptores de superfície celular, incluindo receptores CD205/DEC205, $Fc\gamma$ e $Fc\epsilon$, dectin-1 e langerina/CD207. Langerina é uma lecitina do tipo C, potente indutora da formação de grânulos de Birbeck (Kissenpfennig *et al.*, 2005).

As LC epidérmicas compõem uma população de DC com fenótipo distinto. Comumente não apresentam marcadores de linhagem específicos e, por isso, são definidas como populações leucocitárias que expressam a molécula CD45 e os marcadores mielóides CD13 e CD33. Na tabela 1 mostram-se alguns antígenos da superfície e outras moléculas citoplasmáticas, que caracterizam o fenótipo das LC. Essas moléculas também podem ser expressas em LC imaturas, sendo utilizadas na identificação destas células (Teunissen *et al.*, 1990; Zambruno *et al.*, 1995; Banchereau e Steinman, 1998; Ardavin *et al.*, 1999).

Após um estímulo imunológico, as LC da epiderme captam e processam antígenos microbianos e migram a partir da pele para os linfonodos de drenagem, sendo que o $TNF-\alpha$ e a $IL-1\beta$ constituem importante sinal para essa migração. As LC iniciam, então, um percurso no qual se diferenciam em DC maduras, destinadas à apresentação dos peptídeos antigênicos

e à ativação dos linfócitos T virgens e de memória. Neste processo de maturação, as LC sintetizam novas moléculas MHC e aumentam a expressão de moléculas coestimulatórias e moléculas de adesão que irão permitir e facilitar a interação com os linfócitos T (Cumberbatch, Dearman e Kimber, 1997; Banchereau e Steinman, 1998).

Durante este processo de maturação funcional e aquisição de potencial imunoestimulatório, o GM-CSF é essencial para as LC. Os queratinócitos, células vizinhas das LC epidérmicas, são uma fonte rica em citocinas, especialmente de GM-CSF, produzido constitutivamente ou em resposta a estímulos internos ou externos ao organismo (Kimber *et al.*, 1995). Deste modo, por exemplo, em situações de contato com estímulos externos, os queratinócitos rapidamente produzem GM-CSF, que induz a completa maturação e ativação das LC, permitindo-lhes a interação com os linfócitos T, de modo a desencadear a resposta imunológica (Kimber e Dearman, 1996).

Tabela 01 - Marcadores de superfície e outras moléculas das LC (Fonte: Adaptado de (Carvalho, 2003).

Marcadores de superfície e outras moléculas das LC	Expressão nas LC imaturas
CD13, CD33 – marcadores mielóides	+++
CD1a, CD1c, CD11c	+++ #
MHC classe II (HLA-DR, -DP e -DQ)	+++ #
MHC classe I (HLA-A, B e C)	+ / ++
DEC-205	+++ #
Langerina (CD207)	+++ #
Ag intracitoplasmático Lag	+++ #
Grânulos de Birbeck (BG)	++ #
Receptores Fcγ e Fcε - relacionados com a captação de antígenos	+++
CD40, CD80, CD86, e CD83	- / +
LFA-1 - antígeno associado à função leucocitária	-
LFA-3 - molécula de adesão intercelular	+ / ++
ICAM-1 – molécula de adesão intercelular	+ / ++
ICAM-3 – molécula de adesão intercelular	+++

Moléculas usadas na identificação das LC

- / + expressão inexistente ou fraca

+ / ++ expressão fraca a moderada

+++ expressão elevada

A interação entre as células do sistema imune e o fungo *L. loboi* é de fundamental 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. No entanto, estudos envolvendo a interação fungo-hospedeiro na doença de Jorge Lobo são escassos, principalmente por que o patógeno não é cultivável até o momento. Neste trabalho, realizamos o isolamento do fungo obtido de tecido humano infectado e interagimos com duas populações de células do sistema imune (macrófagos e/ou LC). Este estudo, com resultados morfológicos e funcionais da interação fungo x hospedeiro, é uma etapa importante para compreender a biologia e patogenicidade do *L. loboi*, e para o melhor entendimento da imunopatologia da doença de Jorge Lobo, ao mesmo tempo emergente e endêmica da região amazônica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os aspectos imunopatogênicos da interação de macrófagos e/ou células de Langerhans com o agente da lobomicose, *Lacazia loboi*.

2.2 Objetivos Específicos

- 1 Analisar a interação *in vitro* de macrófagos peritoneais e/ou células Langerhans epidérmicas, obtidos de camundongos Balb/c, com *L. loboi*, obtido a partir de biópsias de pacientes portadores de lobomicose.
- 2 Determinar os índices de infecção, fagocitose e fusão celular de macrófagos peritoneais de camundongos cultivados com o fungo *L. loboi*.
- 3 Quantificar as citocinas TNF- α , IL-6, IL-10, IL-2, IL-4, e IL-12 secretadas no sobrenadante das culturas por ELISA após interação nos tempos de 3, 24 e 48 horas.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais de Experimentação

Foram utilizados camundongos isogênicos BALB/c fêmeas com 4 a 8 semanas de vida, adquiridos do Biotério Central da UNICAMP (Centro Multidisciplinar para investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório – CEMIB) e mantidos pelo Laboratório de Dermato-Imunologia, alimentados com ração e água *ad libitum*.

3.2 Amostras Fúngicas

As cepas de *L. loboi* utilizadas neste estudo foram isoladas de biópsias de lesões nodulares de pacientes atendidos na URE Marcello Candia e identificadas através da observação de células leveduriforme de *L. loboi*, em microscopia óptica do material obtido da biópsia e clarificado com KOH 10%.

3.3 Isolamento da Forma Leveduriforme de *L. loboi*

Para isolar as células leveduriformes de *L. loboi*, a amostra de tecido infectado foi fragmentada e colocada em tubo falcon de 15 mL contendo 9 mL RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Nutricell, Campinas, Brasil), solução de penicilina/estreptomicina (Sigma, St. Louis, USA) e 1 mL de dispase – 3000UI/mL (Roche, Indianapolis, USA) (Salgado *et al.*, 2009). O material foi incubado, por 5 a 10 dias em estufa a 5% CO₂ a 37°C, até notar-se a digestão do material fibrótico, restando somente células leveduriformes e restos celulares do tecido. Então, esse material foi centrifugado a 1500 rpm por 3 minutos, lavado com solução salina durante 3 minutos, três vezes a 3000 rpm. Os fungos isolados (Figura 04 – B e C) foram então contados em câmara de Neubauer e uma alíquota de células leveduriformes de *L. loboi* isoladas foi incubada com iodeto de propídio – 10 µg/mL – (Sigma, St. Louis, EUA) durante 5 minutos à temperatura ambiente para avaliar, sob microscopia de fluorescência, a sua viabilidade, que apresentou índices sempre superiores a 60% (Figura 04 – D). O restante do fungo isolado foi mantido em RPMI 1640 em estufa a 5% CO₂ a 37°C.

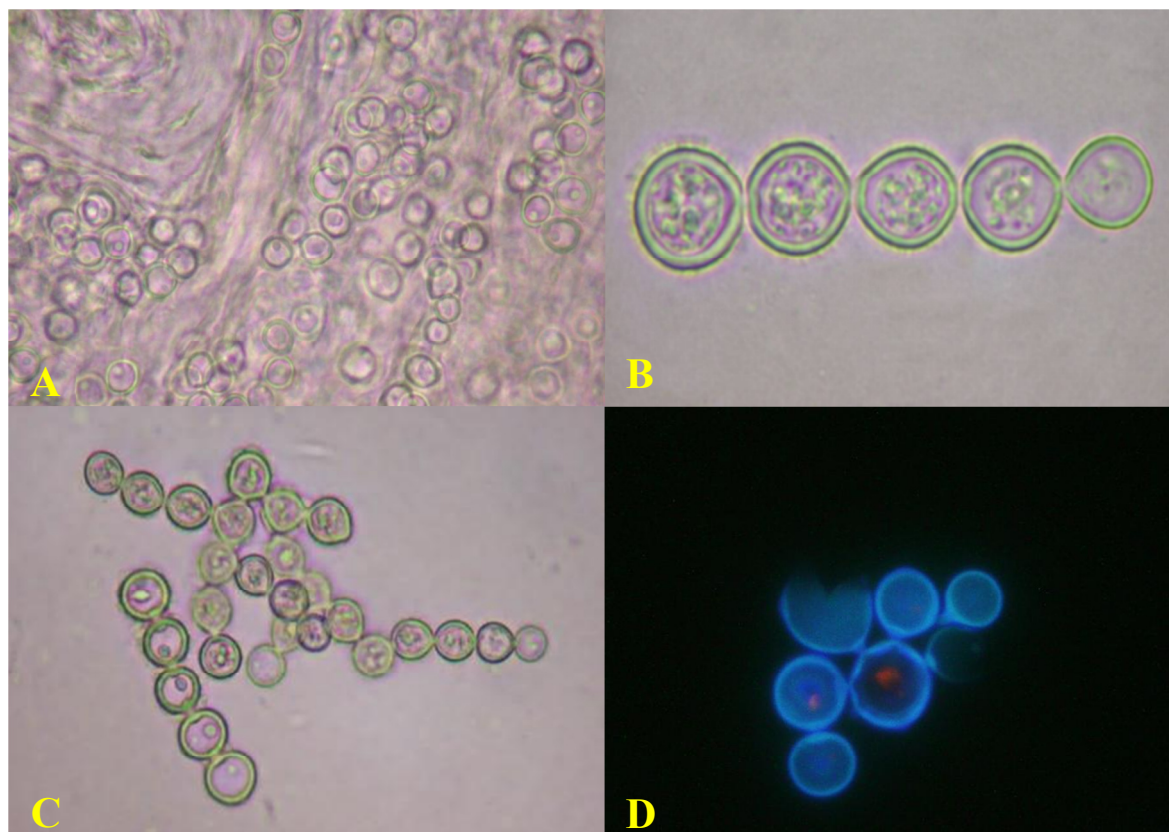


Figura 04 – Características morfológicas de *L. loboi* antes e depois de isolamento. (A) Exame micológico direto, antes do tratamento com dispase, em preparação de KOH 10% e sob microscopia ótica, mostrando infiltrado de células de *L. loboi* com paredes celulares espessas e refringentes circundadas por tecido fibrótico. (B) e (C) morfologia típica de *L. loboi* após o tratamento com dispase, mostrando estruturas fúngicas catenuladas e sem evidência de outras células ou tecidos. (D) *L. loboi* isolado após incubação com iodeto de propídio e calcoflúor para avaliação da sua viabilidade, sob microscopia de fluorescência. Fonte: Laboratório de Dermato-Imunologia UFPA/UEPA/MC adaptado de Salgado *et al.*, 2009.

3.4 Isolamento e Cultivo de Macrófagos

Os macrófagos utilizados para a interação foram isolados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c. 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 o auxílio de uma seringa, aspirou-se o líquido e colocou-se em um tubo de 15 mL. O material aspirado foi lavado com

soro, submetido à centrifugação de 1500 rpm por 3 minutos e ressuspendido em RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Nutricell, Campinas, Brasil) e solução de penicilina/estreptomicina (Sigma, St. Louis, USA) (Arora, Sinha e Sehgal, 1991). Em seguida, uma alíquota de 70 μ L da suspensão de células foi distribuída diretamente nos poços das placas de 24 poços ou em lamínulas de vidro quadrada estéril de 10 \times 10 mm, as quais foram incubadas por 2 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ para possibilitar a adesão dos macrófagos. Posteriormente, os poços ou as lamínulas foram lavadas com soro para remover as células não aderidas e os macrófagos aderidos (estimado em 1 \times 10⁵/poço e 5 \times 10⁴/lamínula), incubados em placas de 24 poços contendo 500 μ L de meio RPMI 1640 por 24 horas. A estimativa do número de macrófagos por lamínula e por poço foi realizada através da contagem em microscópio óptico após coloração com Giemsa.

3.5 Isolamento e Cultivo de Células de Langerhans

As LC foram isoladas, purificadas e cultivadas conforme metodologia padronizada (Koyama *et al.*, 1990; Salgado *et al.*, 1999). Os camundongos BALB/c foram sacrificados e os pêlos removidos. A pele da parte dorsal e ventral foi retirada, cortada e incubada a 37°C e 5% de CO₂ com Dispase - 3000UI/mL (Roche Company-Germany) - por 3 horas. A epiderme foi separada da derme e incubada com DNAase 0,025% (Sigma, St. Louis, USA) por 20 minutos em temperatura ambiente. As células foram separadas através de pipetagens vigorosas e incubadas com anticorpo monoclonal anti-Ia^d - MHC classe II - de camundongo (BD PharMingen, San Diego, CA), diluído 1:600, por 45 minutos à 4°C. A suspensão de células epidérmicas já marcadas (anti-Ia^d) foi incubada em placas de petri plásticas previamente revestidas com anticorpo anti-IgG fração Fc (Cappel, Durham, NC), diluído 1:100, durante 01 hora à 4°C. As placas foram lavadas para retirar o sobrenadante e as LCs aderidas às placas, removidas e cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com soro fetal bovino à 10% (Gibco-USA).

3.6 Interação de Macrófagos com *L. loboi*

Os macrófagos isolados foram co-cultivados com células leveduriformes de *L. loboi*, em meio RPMI-1640 nas placas de cultura de 24 poços a 37°C e atmosfera a 5% de CO₂ nos tempos de 3, 24 e 48 horas. A proporção de macrófago/fungo usada foi de 1:3. Em todos os

experimentos foram realizados grupos controles com macrófagos (1×10^5) e fungos (3×10^5) cultivados isoladamente.

3.7 Interação de Células de Langerhans com *L. loboi*

Realizou-se interação por períodos de 3, 24 e 48 horas, na proporção de 3 células fúngicas para cada LC, em meio RPMI-1640, suplementado com soro fetal bovino a 10% e incubação a 37°C com 5% de CO₂. Em todos os experimentos existiram grupos controles com LC ($3,33 \times 10^4$) e fungos (1×10^5) cultivados isoladamente.

3.8 Interação de Macrófagos e Células de Langerhans com *L. loboi*

Os macrófagos isolados foram co-cultivados com LC e células leveduriformes de *L. loboi*, na proporção 1:1:3 em meio RPMI-1640 nas placas de cultura de 24 poços a 37°C e atmosfera a 5% de CO₂ nos tempos de 3, 24 e 48 horas. Em todos os experimentos existiram grupos controles com macrófagos (1×10^5), LC ($3,33 \times 10^4$) e fungos (3×10^5) cultivados isoladamente. Após o período de interação, o sobrenadante de todos os cultivos e co-cultivos foram recolhidos para dosagem de citocinas e as células, processadas para avaliação da viabilidade celular ou para coloração com giemsa e posterior observação por microscopia óptica para determinação dos índices de fagocitose, infecção e fusão celular.

3.9 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 (Axio Scope. A1, Carl Zeiss, Alemanha) após coloração pelo Giemsa. As lamínulas foram contadas em duplicata de 3 experimentos diferentes e quantificou-se aproximadamente 250 macrófagos por lamínula. As fotos foram obtidas com câmera modelo MRc (5 Mega Pixels) (Carl Zeiss, Alemanha). 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 contabilizou-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, Okamoto e Horio, 2004).

Os dados foram calculados de acordo com as seguintes fórmulas:

$$\text{Índice de Infecção (\%)} = \frac{\text{Número de macrófagos infectados}}{\text{Número total de macrófagos}} \cdot 100$$

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

$$\text{Índice de Fecundação Celular (\%)} = \frac{\text{Número de macrófagos nas CGM}}{\text{Número total de núcleos}} \cdot 100$$

3.10 Quantificação de Citocinas

Os sobrenadantes das culturas e co-culturas de macrófagos e/ou LC e/ou *L. loboi* obtidos após 3, 24 e 48 horas de incubação, foram armazenados a -20 °C até o momento da dosagem de citocinas.

A presença de citocinas nos sobrenadantes foi medida inicialmente utilizando kits de ELISA para TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 (BD Biosciences, San Jose, CA), segundo protocolo dos fabricantes. Resumidamente, placas de 96 poços foram sensibilizadas durante a noite, em incubação com anticorpo monoclonal anti-citocina de camundongo (TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12) na concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$. No dia seguinte, removeu-se a solução de anticorpo de captura e realizou-se bloqueio de ligações inespecíficas com PBS mais soro fetal bovino 10% por 2 horas à temperatura ambiente. Após remoção do bloqueio e lavagem das placas 3 vezes com PBS/tween 0,05%, foram adicionadas as amostras de sobrenadantes, os brancos e a curva-padrão, posteriormente incubados à temperatura ambiente por 2 horas. Lavou-se novamente a placa, três vezes, e adicionou-se o anticorpo de detecção anti-citocina biotilado na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$. Depois de incubadas à temperatura ambiente por 1 hora, as placas foram lavadas três vezes, o conjugado (peroxidase conjugada à estreptavidina) foi adicionado e a placa foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Após lavar a placa 5 vezes, adicionou-se o substrato (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina + H₂O₂ + dimetilsulfóxido) e a placa foi incubada a temperatura ambiente durante a reação. Após o período de incubação, a reação foi interrompida por adição de H₂SO₄ (2N), a densidade óptica foi lida no comprimento de onda de 450nm em uma leitora de ELISA (Dinex MRX

Revelation, Chantilly, VA, USA) e os valores foram convertidos em pg/mL baseando-se na curva padrão. Todos os sobrenadantes foram analisados em duplicata. Entretanto, como a quantificação de citocinas através de ELISA demanda grande quantidade de sobrenadante de cultura celular para sua realização (200µL de amostra) e, também, devido à dificuldade em conseguir amostras fúngicas em grandes quantidades, já que o *L. loboi* não é cultivável e as cepas usadas nos experimentos são isoladas de biópsias de pacientes, optamos ao longo do desenvolvimento do estudo, por utilizar o kit CBA (Cytometric Bead Array) para quantificação de citocinas por citometria de fluxo (Morgan *et al.*, 2004).

O Kit CBA mescla as tecnologias do ELISA com a citometria de fluxo. O CBA consiste num imunoensaio tipo sanduíche, multiplex, que utiliza microesferas de poliestireno conjugadas a anticorpos conjugados a um fluorocromo e a leitura é feita por citometria de fluxo. O uso de *beads* marcadas com diferentes graus de intensidade facilita a análise quantitativa de múltiplos parâmetros em uma única amostra, utiliza mínimos volumes de material (25 a 50µL de amostra) para obter seus resultados, produz dados com reprodutibilidade comparável a outras técnicas, como ELISA, permite comparação direta com ensaios já existentes e avaliação mais rápida de múltiplas proteínas simultaneamente numa única amostra (Carson e Vignali, 1999; Lund-Johansen *et al.*, 2000).

Resumidamente, a dosagem de citocinas utilizando o kit CBA segue as seguintes etapas: 1) Reconstituiu-se o padrão, contendo as citocinas liofilizadas, com *assay diluent* por 15 minutos a temperatura ambiente. 2) Realizou-se diluição seriada (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 e 1:256), a partir da solução padrão. 3) Fez-se um pool de *beads* conjugadas com anticorpo de captura específico para cada citocina. Foram necessários cerca de 3 µL de cada suspensão de *beads* para cada amostra. 4) Misturou-se as *beads* de captura das citocinas com o anticorpo de detecção conjugado com o fluorocromo PE, e depois incubou-se com as amostras. Os tubos para aquisição foram preparados com: 50 µL de amostra, 50 µL da mistura de *beads* e 50 µL do reagente de detecção. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção da curva-padrão. Os tubos foram homogenizados e incubados por 02 horas, em temperatura ambiente, protegidos da luz. 5) Após a incubação, as *beads* de captura foram lavadas e centrifugadas a 1500 rpm, por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. 6) Realizou-se a aquisição das amostras e padrões em citômetro de fluxo (BD Accuri C6 flow cytometer, USA). 7) Por último, realizou-se a análise dos dados obtidos com auxílio do software FCAP Array v3.0.1. (BD Biosciences, Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA), por meio de curvas de calibração obtidas dos padrões de citocinas do kit. Após a

construção das curvas, a concentração dos analitos na amostra foi determinada em pg/mL, a partir dos valores de Intensidade Média de Fluorescência (MFI).

3.11 Citometria de Fluxo (Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS)

As células cultivadas após 3, 24 e 48 horas de interação foram coletadas e lavadas com PBS duas vezes. Após essa lavagem, as células foram marcadas com solução iodeto de propídeo (PI), 10 µg/mL, e imediatamente analisadas por citometria de fluxo (BD Accuri C6 flow cytometer, USA) para determinação da viabilidade celular. Após aquisição, os resultados foram analisados utilizando o programa BD Accuri C6 Software (Becton & Dickinson, San Jose, CA).

3.12 Análise Estatística

A análise estatística e confecção dos gráficos foi realizada utilizando-se o programa GraphPad-Prism 5® (GraphPad-Prism Software, CA, USA). Os resultados experimentais foram comparados através do Test t de Student e ANOVA. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para valores de $p < 0,05$.

3.13 Aspectos éticos

O presente projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, sob o protocolo nº 081/07 CEP-ICS/ UFPA.

4 RESULTADOS

4.1 Viabilidade Celular

Apesar da viabilidade das LC, isoladamente ou em co-cultivo com o fungo mostrar redução após 48 horas, não houve diferença significativa nos diferentes tempos estudados, demonstrando a ausência de influência do fungo *L. loboi* sobre a viabilidade de LC ou macrófagos, cultivadas isoladamente ou em associação.

Tabela 02. Viabilidade de macrófagos e células de Langerhans após interação com *L. loboi* por 3, 24 e 48 horas. Após esses períodos, as células foram marcadas com PI (10µg/mL) e, por fim, analisadas por citometria de fluxo. Os resultados são representativos de três experimentos independentes (média ± desvio padrão).

	3h (%)	24h (%)	48h (%)
Mac	98.8 ± 0.2	96.8 ± 2.7	96.4 ± 1.2
Mac + LC	97.6 ± 0.3	97.2 ± 1.5	97.7 ± 0.1
Mac + <i>L. loboi</i>	98.8 ± 0.5	98.2 ± 1.2	97.5 ± 1.1
Mac + LC + <i>L. loboi</i>	97.1 ± 0.2	96.2 ± 1.7	96.0 ± 1.5
LC	95.1 ± 1.6	93.1 ± 2.6	80.1 ± 3.9
LC + <i>L. loboi</i>	93.4 ± 4.5	92.7 ± 2.1	79.6 ± 5.6

4.2 Porcentagem de macrófagos infectados (Índice de Infecção)

Observou-se que o índice de infecção (Figura 05) na interação entre macrófagos e *L. loboi* foi semelhante à interação entre macrófagos, LC e *L. loboi* em todos os tempos, com 35,9% e 43,7% respectivamente, em 3 horas de co-cultivo. Após 48 horas, os índices alcançaram 64,3% e 67,1%, respectivamente. Entretanto, quando se analisa cada interação em relação aos tempos de incubação, há diferença estatisticamente significativa na terceira hora, onde o índice de infecção é menor, em relação a 24 e 48 horas ($p < 0,01$).

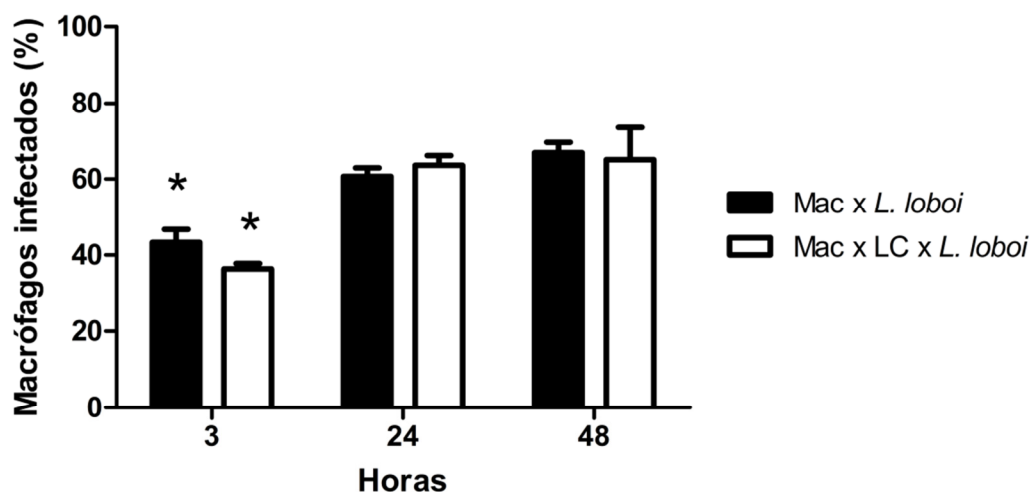


Figura 05: Índice de infecção em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c co-cultivados células de Langerhans e/ou *L. loboi*. * $p < 0,001$.

4.3 Número de fungos por macrófago infectado (Índice de fagocitose)

A análise por microscopia óptica revelou que após 3 horas de interação já havia fagocitose (Figura 06), sendo observados numerosos fungos dentro dos macrófagos e extracelularmente, porém, não se observou a presença de estruturas fúngicas no interior das LC, apenas migração e agrupamento destas células ao redor do fungo (Figura 07). Depois de 48 horas, verificou-se que a maioria das células fúngicas fagocitadas estavam íntegras e apenas um pequeno número de células leveduriformes estavam aparentemente destruídas no interior dos macrófagos. Não houve evidência de crescimento de hifas no interior dos macrófagos ou extracelularmente e nem multiplicação do fungo em nenhuma das interações e nem nos controles.

Para o índice de fagocitose (Figura 08), quantificou-se o número médio de fungos dentro dos macrófagos, contabilizando-se um mínimo de 250 células infectadas por lamínula. Verificou-se que o índice de fagocitose também foi semelhante entre as interações e ao longo do tempo. Em 3 horas, a interação entre macrófagos e *L. loboi* teve média de 1,3 fungo/macrófago e a interação entre macrófagos, LC e *L. loboi*, 1,2 fungo/macrófago. Após 48 horas, o índice não se alterou de forma significativa, alcançando 1,6 e 1,4 fungo/macrófago, respectivamente. Porém, com relação ao tempo de incubação na interação entre macrófagos e *L. loboi*, observou-se que o índice de fagocitose após 3 horas de interação

é significativamente menor ($p < 0,01$) que nos outros tempos, o que não ocorreu na interação entre macrófagos, LC e *L. loboi*.

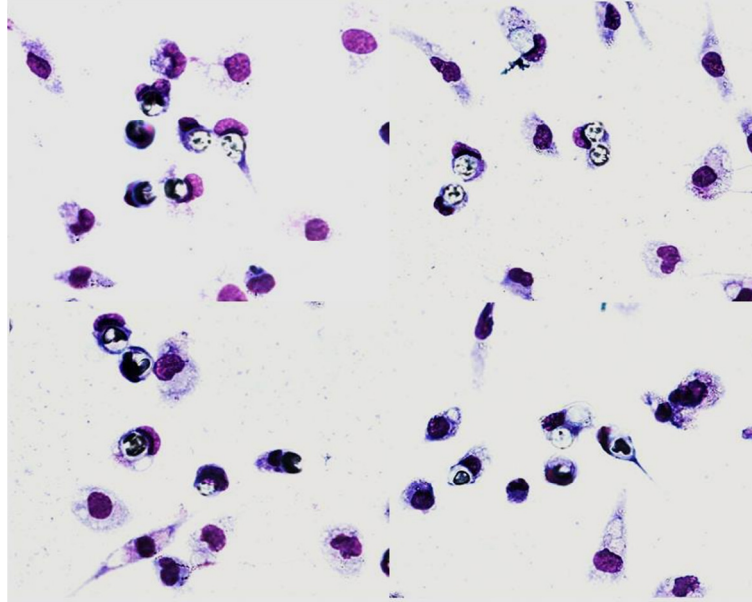


Figura 06: Interação entre macrófagos peritoneais e *L. loboi*. Após 3 horas de interação, já havia fagocitose do fungo por macrófagos (Giemsa, 1000×).

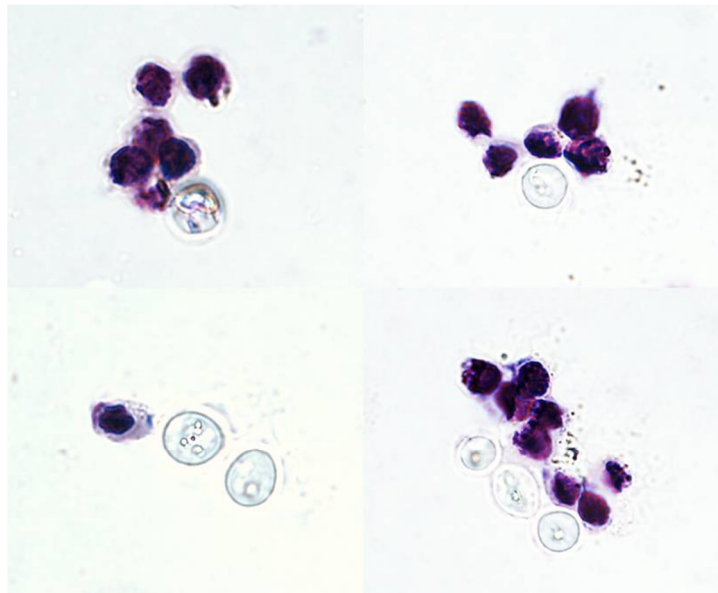


Figura 07: Interação entre Células de Langerhans e *L. loboi*. Não se observou a presença de fungos no interior das células de Langerhans mesmo após 48 horas de interação (Giemsa, 1000×).

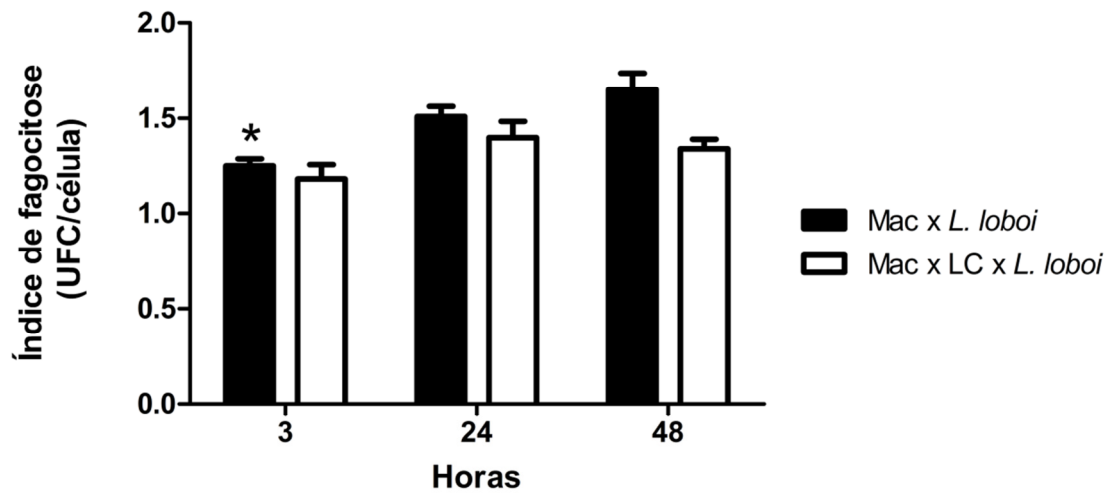


Figura 08: Índice de fagocitose em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c co-cultivados células de Langerhans e/ou *L. loboi*. * $p < 0,001$.

4.4 Índice de fusão celular

Ao avaliar-se o índice de fusão verificou-se que não há a formação de células gigantes multinucleadas em macrófagos cultivados isoladamente, em LC cultivadas isoladamente, bem como em nenhum dos co-cultivos (Figura 09).

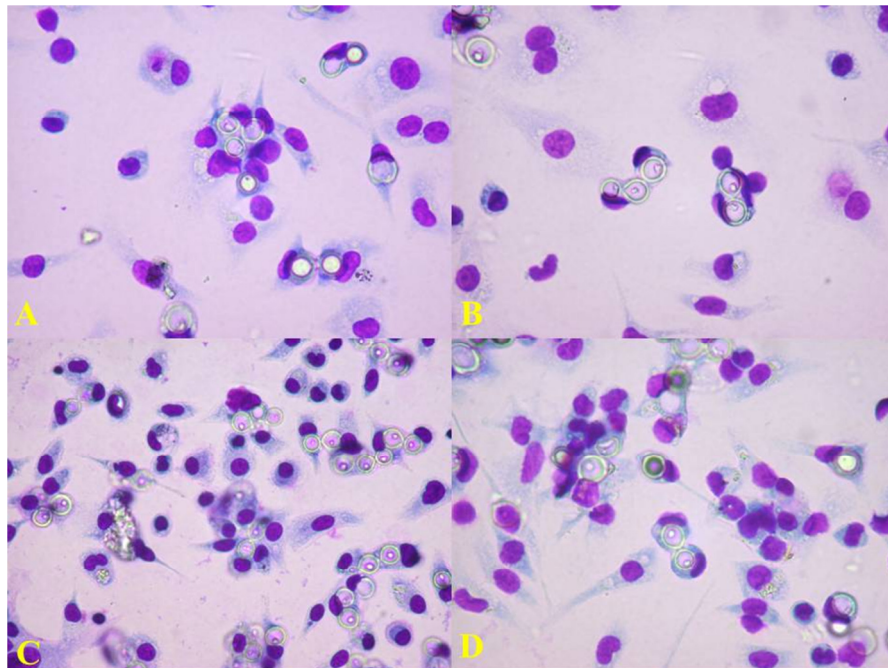


Figura 09. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c co-cultivados com *L. loboi*. Não observou-se fusão celular após 3 (A e B) ou 48 (C e D) horas de interação.

Em algumas ocasiões, observou-se aglomerado de células e fungos, mas com limites nítidos entre os citoplasmas celulares, não caracterizando a formação de sincício, ou seja, de células multinucleadas, em que uma membrana celular engloba vários núcleos.

4.5 Quantificação de citocinas

Após os tempos de interação (3, 24 e 48 horas), quantificou-se a produção das citocinas TNF- α , IL-6, IL-10, IL-2, IL-4, e IL-12 no sobrenadante das culturas e verificou-se que não houve diferença significativa na produção IL-10, IL-4 e IL-2 nas interações estudadas.

Através da figura 10, podemos perceber que existe aumento da produção de TNF- α na interação de macrófagos com *L. loboi*, e de macrófagos, células de Langerhans e *L. loboi* em relação a outras interações, sendo que na interação entre macrófagos e *L. loboi* a produção de TNF- α diminui ao longo do tempo, enquanto que quando adiciona-se LC verificamos aumento da produção dessa citocina ao longo do tempo, principalmente após 48 horas, onde esse aumento foi estatisticamente significativo. Com relação aos níveis de TNF- α ao longo da incubação dentro de cada interação, não houve diferença significativa estatisticamente.

Com relação à produção de IL-6 (Figura 11), verificamos que LC modulam negativamente a produção dessa citocina por macrófagos e que *L. loboi* também inibe essa produção por macrófagos ou LC isoladamente e em co-cultivo .

A quantificação de IL-12 nos sobrenadantes dos diferentes co-cultivos mostrou que *L. loboi* estimula significativamente a produção de IL-12 por macrófagos co-cultivados com LC, comparado a LC ou macrófagos cultivados isoladamente (Figura 12). Apesar e estatisticamente não significativo, destaca-se um aumento na produção de IL-12 por macrófagos co-cultivados com *L. loboi* em relação ao controle.

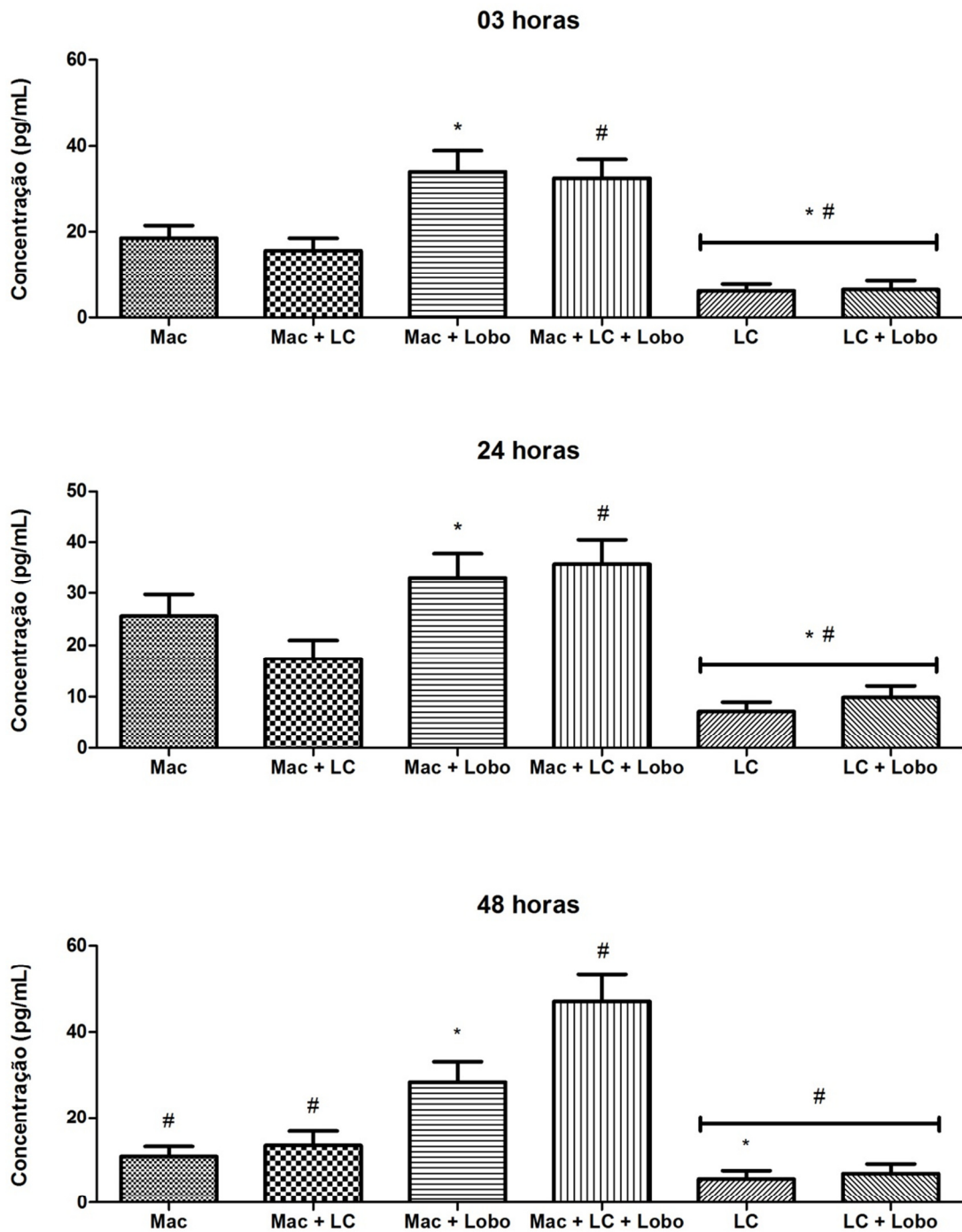


Figura 10: Produção de TNF- α por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, células de Langerhans isoladamente ou em co-cultivo com *L. loboi* após 3, 24 e 48 horas de interação. Resultado representativo de três experimentos ($p < 0.005$).

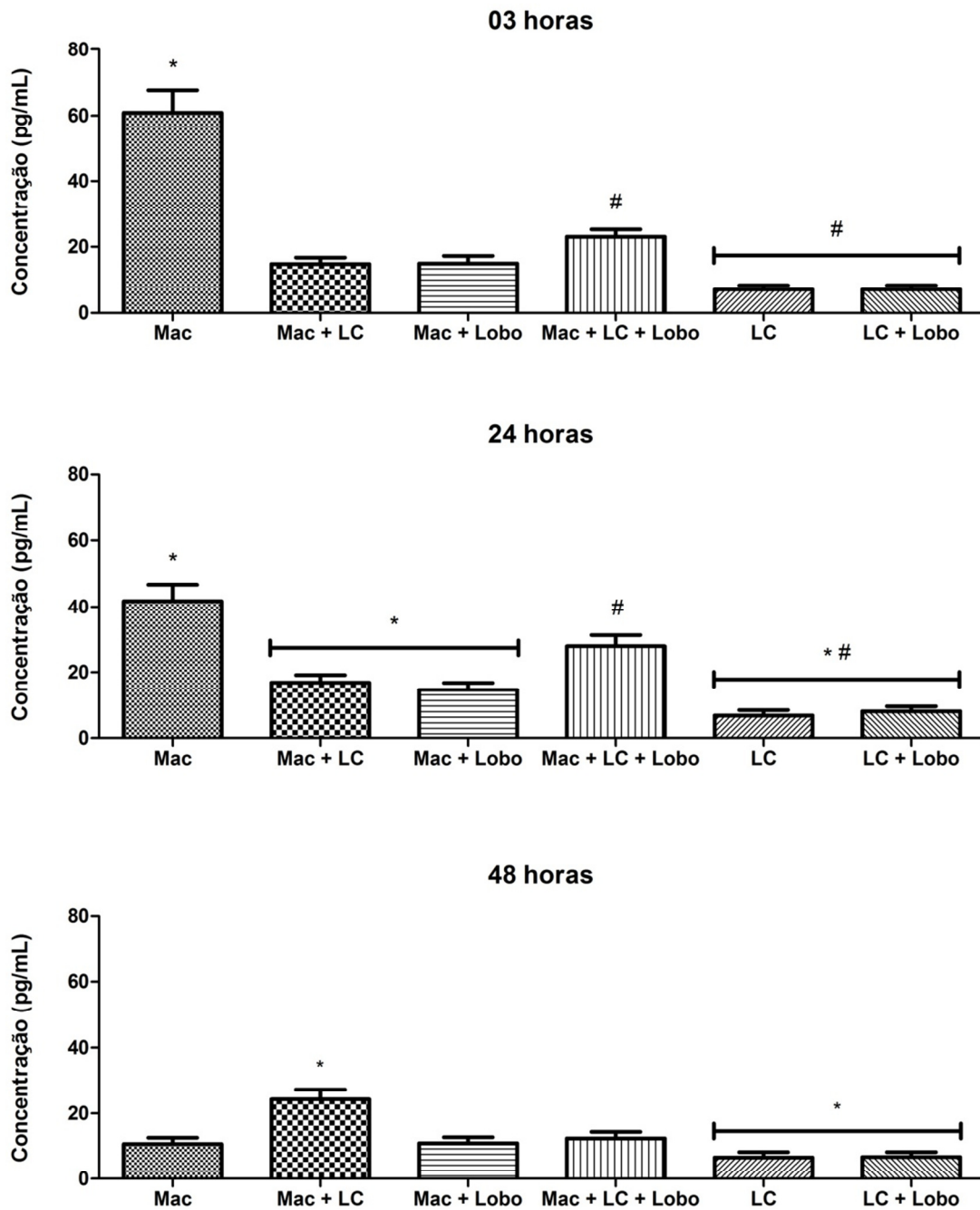


Figura 11: Produção de IL-6 por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, células de Langerhans isoladamente ou em co-cultivo com *L. loboi* após 3, 24 e 48 horas de interação. Resultado representativo de três experimentos ($p < 0,005$).

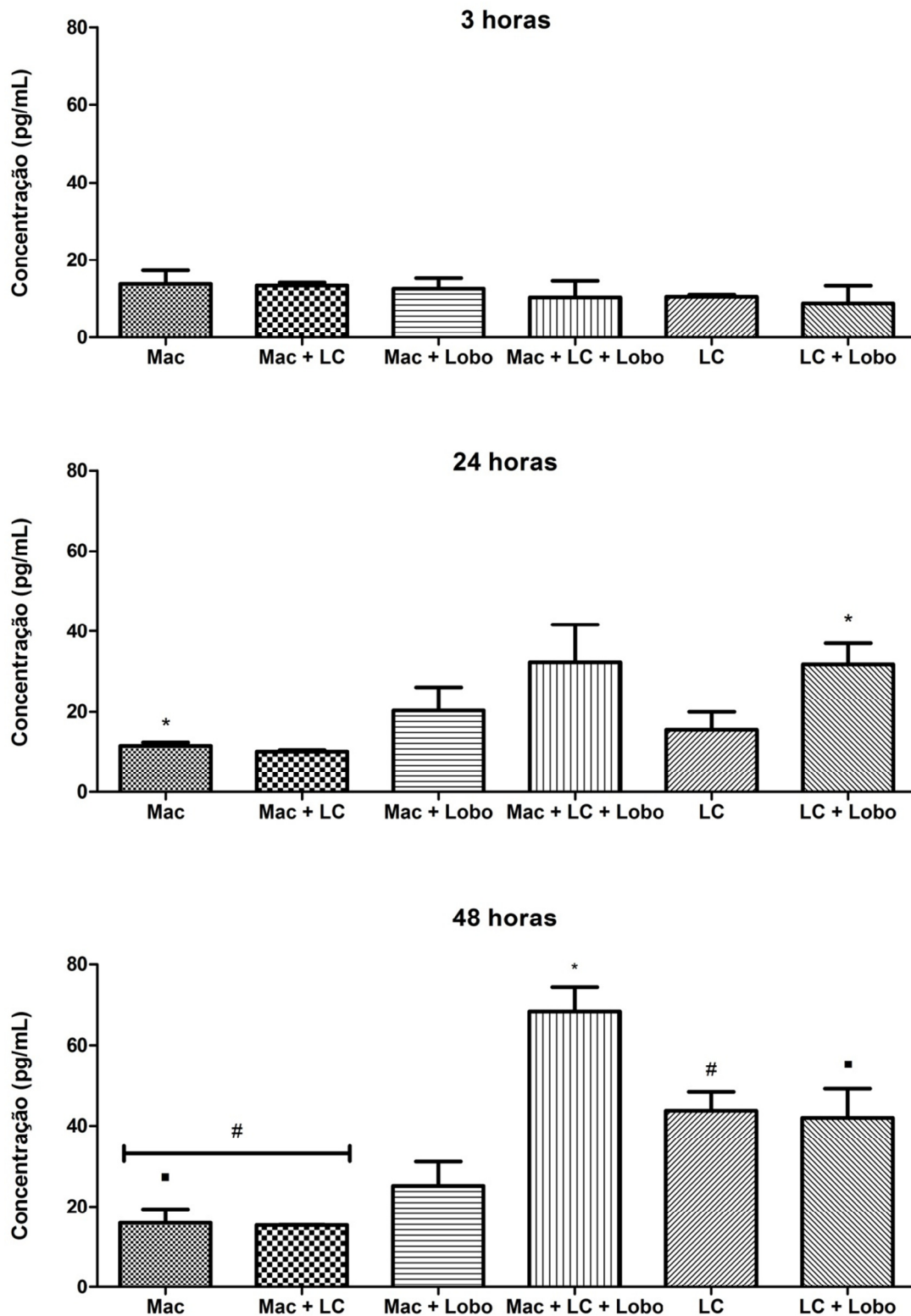


Figura 12: Produção de IL-12 por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, células de Langerhans isoladamente ou em co-cultivo com *L. loboi* após 3, 24 e 48 horas de interação. Resultado representativo de três experimentos ($p < 0,005$).

5 DISCUSSÃO

Os estudos envolvendo a interação fungo-hospedeiro na lobomicose são escassos. Até o momento, existem apenas dois trabalhos de um mesmo grupo, um abordou a fagocitose do fungo *L. loboi* por monócitos de sangue periférico humano (Vilani-Moreno, Lauris e Opromolla, 2004) e o outro que avaliou o perfil de citocinas em sobrenadante de cultura de monócitos do sangue periférico de pacientes com lobomicose co-cultivados com *L. loboi* (Vilani-Moreno, Silva e Opromolla, 2004). Entretanto, as amostras fúngicas utilizadas em ambos os experimentos foram autoclavadas antes do co-cultivo, o que compromete a viabilidade do fungo. Não existe relato na literatura sobre interação entre LC e *L. loboi* e nem sobre avaliação da viabilidade celular em nenhum tipo de interação envolvendo o fungo.

Pesquisas mostraram a importância de padrões de resposta imune relacionados à apresentação clínica da doença de Jorge Lobo (Pecher, Croce e Ferri, 1979; Opromolla *et al.*, 2000). Pecher e colaboradores (1979) sugeriram a presença de imunodeficiência celular, apesar da ocorrência de lesões predominantemente constituídas por macrófagos e células gigantes fagocitando grande quantidade de estruturas fúngicas. Por outro lado, não há estudos relatando agravamento ou disseminação de lesões nos casos associados à imunodeficiência celular grave.

Nossos resultados demonstraram que *L. loboi* não influencia a viabilidade de LC ou macrófagos, mesmo após 48 horas de interação. Romera (2012), em interação entre macrófagos e *Paracoccidioides brasiliensis* demonstrou viabilidade celular de aproximadamente 70% após 4 horas e 80% após 8 horas na ausência ou presença do fungo, sugerindo que *P. brasiliensis* não foi citotóxico para macrófagos. Nossos resultados sugerem que o mesmo ocorre com *L. loboi* quando em interação com macrófagos, LC ou ambos.

O índice de infecção na interação entre macrófagos e *L. loboi* foi semelhante à interação entre macrófagos, LC e *L. loboi* em todos os tempos. Porém, em relação aos tempos de incubação em cada interação, o índice de infecção é significativamente menor na terceira hora em relação a 24 e 48 horas ($p < 0,01$), indicando um aumento significativo nas primeiras 24 horas de interação, seguido por uma estabilização na quantidade de macrófagos infectados com células leveduriformes de *L. loboi*.

Vilani-Moreno e colaboradores (2004) avaliaram a atividade fagocítica dos monócitos sanguíneos frente ao *L. loboi* tanto em pacientes portadores da doença como em indivíduos saudáveis (grupo controle), utilizando 3 e 24 horas de incubação. Foi demonstrado que não houve diferença significativa entre o percentual de fagocitose do fungo pelos monócitos de pacientes e do grupo controle, porém em relação aos tempos de incubação, houve diferença significativa, isto é, às 3 horas o percentual de fagocitose foi maior (39,3% em pacientes e 34% no controle) que o obtido às 24 horas (37,5% em pacientes e 29,3% no controle). Os autores sugeriram que monócitos de pacientes portadores de lobomicose são hábeis em fagocitar o fungo, à semelhança do que foi visto em indivíduos do grupo controle. Esses resultados diferem do que foi observado no nosso estudo, onde o número de macrófagos que fagocitaram *L. loboi* em 24 horas (64,3% na interação entre macrófagos e *L. loboi* e 67,1% na interação entre macrófagos, LC e *L. loboi*) foi significativamente maior do que em 3 horas (35,9% na interação entre macrófagos e *L. loboi* e 43,7% na interação entre macrófagos, LC e *L. loboi*).

Estudo comparando a atividade fagocítica de macrófagos derivados de monócitos humanos ou neutrófilos humanos frente à *Candida albicans* (Rudkin *et al.*, 2013) revelou que o cultivo na proporção células/fungo de 1:1, tanto com monócitos quanto com neutrófilos resultou em um índice de infecção similar em ambos os grupos celulares (65% e 62,7% para macrófagos e neutrófilos, respectivamente), no entanto, quando *C. albicans* foram incluídas na cultura em maior quantidade (proporção célula/fungo passou a ser de 1:3), o índice de infecção foi maior para macrófagos (85%) em comparação com neutrófilos (68,7%). O índice de fagocitose é significativamente maior para macrófagos em relação a neutrófilos, independente da concentração de *C. albicans*, sendo que neutrófilos são mais suscetíveis à morte por *C. albicans*. Entretanto, quando a concentração de fungos é mais baixa, os neutrófilos fagocitam mais rapidamente que os macrófagos. Em contraste, quando ambos os fagócitos foram co-cultivados, a taxa de morte celular foi semelhante entre eles, sendo que o aumento da suscetibilidade de macrófagos foi explicado pelo maior número de hifas fúngicas surgidas nessas circunstâncias. Na presença de ambas as células, o fungo foi predominantemente e mais rapidamente fagocitado por neutrófilos. Estas observações demonstraram que a fagocitose de agentes patogênicos fúngicos depende, e é modificada por diferentes populações celulares presentes no local da infecção.

O índice de infecção encontrado no presente trabalho está de acordo com um estudo sobre a fagocitose de *P. brasiliensis* por macrófagos alveolares murinos, o qual revelou que

64,2% dos macrófagos fagocitavam o fungo, sendo que essa porcentagem aumentava significativamente após 24 horas quando as culturas eram tratadas com INF- γ , além de aumentarem também a sua capacidade fungicida (Brummer *et al.*, 1988). Mais recentemente, em interação *in vitro* entre monócitos humanos ou macrófagos derivados de monócitos e *P. brasiliensis*, pesquisadores detectaram taxa de infecção de 80% (Moscardi-Bacchi, Brummer e Stevens, 1994).

Gildea e colaboradores (2005) demonstraram que DC fagocitam, matam e degradam o fungo *H. capsulatum* por meio de hidrolases lisossomais, ao contrário de macrófagos humanos que são permissivos para o crescimento intracelular do fungo.

Nossos resultados demonstram que *L. loboi* é fagocitado por macrófagos, mas não por LC e que já há fagocitose após 3 horas de interação, sendo que depois de 48 horas a maioria dos fungos fagocitados permaneceram íntegros, diferente do que foi observado em trabalho anterior do nosso grupo (Da Silva *et al.*, 2007), com a fagocitose e destruição de conídios de *Fonsecaea pedrosoi* – principal agente etiológico da cromoblastomicose, outra micose de implantação prevalente na nossa região, – por LC de camundongos Balb/c.

De fato, corroborando a observação anterior de destruição do fungo *F. pedrosoi* por LC (Da Silva *et al.*, 2007) e não do *L. loboi* neste sistema, observamos (dados não mostrados) que a inoculação de conídios ou escleróticas de *F. pedrosoi* nas patas de camundongos Balb/c não culminam com a formação de lesões, enquanto que a inoculação de células leveduriformes de *L. loboi* resulta no surgimento de lesões semelhantes àsquelas encontradas em humanos.

Não houve diferença quanto ao índice de fagocitose entre as interações ao longo do tempo, com média de 1,6 fungo/macrófago na interação entre macrófagos e *L. loboi* e 1,4 fungo/macrófago na interação entre macrófagos, LC e *L. loboi* após 48 horas. Entretanto, na interação entre macrófagos e *L. loboi*, observou-se que o índice de fagocitose após 3 horas de interação é significativamente menor ($p < 0,01$) que nos outros tempos, o que não ocorreu na interação entre macrófagos, LC e *L. loboi*.

Opromolla e colaboradores (2000) observaram em cortes histológicos na lobomicose que histiócitos fagocitam o fungo e se agrupam formando sincícios, os quais podem originar

células gigantes tipo corpo estranho. Entretanto, o grande número de macrófagos é insuficiente para controlar a infecção fúngica, sugerindo a dificuldade de eliminação desses fungos, talvez em virtude da constituição química de sua parede celular e/ou à baixa imunidade celular do hospedeiro frente ao fungo, que se acumula no tecido prolongadamente, mas que por apresentar baixa patogenicidade leva à cronicidade da doença.

A observação da expressão de TGF- β e CD68, por imunoistoquímica, em lesões cutâneas de pacientes com lobomicose (Xavier *et al.*, 2008) mostrou abundância de fibras colágenas, fraca imunomarcção de macrófagos para CD68 (proteína transmembrana localizada principalmente nos lisossomos de macrófagos) e intensa reatividade para TGF- β , citocina com forte poder supressor de macrófagos, sugerindo que TGF- β desempenha papel fundamental na etiopatogenia da infecção por *L. loboi*, inibindo a resposta imune celular mediada por macrófagos e induzindo fibrose, responsável pelo aspecto queloidiforme frequentemente adquirido nessas lesões.

Vilani-Moreno e colaboradores (2005) realizaram um estudo no qual sugerem que *L. loboi* é fagocitado por histiócitos, formando agregados que originam células gigantes cujo processo de maturação dá origem às células gigantes multinucleadas tipo Langhans, que conduzem à formação dos granulomas típicos.

Não se observou a formação de células gigantes em nenhum dos co-cultivos realizados no presente estudo. Talvez, a formação de células multinucleadas ocorra lentamente e em tempos posteriores aos analisados no presente trabalho, já que há evidências de que na lobomicose o fungo multiplica-se muito lentamente, paralelo a deficiência imunológica do hospedeiro humano, demonstrada por grandes acúmulos de fungos, imaturidade das células gigantes, pequeno número de linfócitos, raros granulomas tuberculóides típicos e ineficiência na eliminação dos fungos mortos (Opromolla *et al.*, 2000).

Quaresma e colaboradores (2010) realizaram um estudo imunoistoquímico para identificação de LC (marcação com anti-CD1a) nas lesões cutâneas de lobomicose, no qual verificaram que a morfologia destas células não diferia daquela observada em tecidos não infectados, admitindo existir um mecanismo de escape ao sistema imune local por parte do fungo e evasão à apresentação de antígenos por estas células.

Existem dois mecanismos principais pelos quais os fagócitos destroem microorganismos patogênicos. O primeiro mecanismo é através da produção de radicais tóxicos de oxigênio e/ou óxido nítrico; e o segundo, através da fusão fagossomo-lisossomo (Gildea *et al.*, 2005). Entretanto, os fungos patogênicos desenvolveram eficientes mecanismos para escapar da morte por células do sistema imune inato, os quais podem envolver a evasão do reconhecimento por células do sistema imune mediada pelo mascaramento/mimetismo de moléculas de superfície imunoestimulatórias; utilização de barreiras físicas para evitar a fagocitose (como por exemplo, manoproteínas de *C. albicans* e a cápsula de *C. neoformans*), inibindo a opsonização ou modificando o citoesqueleto fagocítico das células imunes efetoras (Seider *et al.*, 2010).

O perfil de citocinas em sobrenadante de cultura de células mononucleares foi avaliado, através de ELISA, por Vilani-Moreno e colaboradores (2004), que verificaram níveis maiores de IL-4 e níveis menores de IL-2 quando comparado ao grupo controle, diferente do que foi encontrado em nosso estudo, onde não houve diferenças significativas nos níveis dessas citocinas entre as interações estudadas.

A produção de IL-10 foi similar entre os pacientes com lobomicose e o grupo controle, semelhante ao encontrado em nosso estudo. Vilani-Moreno e colaboradores sugeriram uma alteração no perfil de citocinas representadas por um predomínio Th2, privilegiando a produção de anticorpos por linfócitos B, o que indica uma predominância de resposta imunológica humoral (Vilani-Moreno, Lauris e Opromolla, 2004). A produção de IL-10 não parece ter muita relevância na interação entre *P. brasiliensis* e macrófagos, mesmo quando os macrófagos são estimulados previamente com LPS (Romera, 2012), corroborando com os nossos resultados sobre *L. loboi*. O mesmo foi observado em um estudo que demonstrou a resistência a infecções fúngicas primárias ou secundárias por *C. albicans* não se altera em camundongos deficientes para IL-10 (Romani, 2000).

A IL-4 diminui a migração de macrófagos, causando também a sua agregação e induzindo a formação de células gigantes (Mcnally e Anderson, 1995; 2011). A observação de ausência de formação de células gigantes e o perfil de IL-4 encontrado no presente estudo também contribuem para os indícios de que a formação de células gigantes na lobomicose não é expressiva (Opromolla *et al.*, 2000), já que os níveis de IL-4 nas interações com *L. loboi* não

diferem dos controles, ou seja, não ocorre aumento dos níveis de IL-4, o que pode contribuir para impedir a fusão de macrófagos e assim a formação de células gigantes.

O TNF- α é uma potente citocina pró-inflamatória que regula muitos aspectos da função dos macrófagos, sendo produzida rapidamente após trauma, infecção ou exposição à LPS bacteriano. Atua na regulação da produção da cascata de citocinas pró-inflamatórias, além de modular a apoptose, proliferação e diferenciação celular. Por isso, constitui componente principal no recrutamento e ativação de células inflamatórias, desempenhando um papel crítico no desenvolvimento de muitas doenças inflamatórias crônicas (Parameswaran e Patial, 2010). Além disso, TNF- α também participa do processo de inicialização e regulação da migração de DC da pele para os órgãos linfóides.

No estudo de Vilani-Moreno e colaboradores (2004), a produção de TNF- α foi similar entre o grupo de interação com *L. loboi* e o grupo controle, diferente do encontrado no presente trabalho, no qual a produção de TNF- α diminui ao longo do tempo na interação entre macrófagos e *L. loboi*, enquanto a adição de LC induz aumento da produção de TNF- α , principalmente após 48 horas. Isso pode ser explicado pelo fato de que, em geral, DC imaturas são tolerogênicas, enquanto DC maduras são imunoestimuladoras (Cruvinel *et al.*, 2010). Assim, as LC poderiam estimular os macrófagos, mantendo os níveis de TNF- α elevados.

Um estudo envolvendo de interação entre macrófagos e *P. brasiliensis* (Romera, 2012), evidenciou diminuição na produção de TNF- α quando o macrófago é previamente estimulado com LPS, porém, após adição de DAPT (inibidor γ -secretase) houve aumento da produção dessa citocina principalmente após 12 horas de interação. Nos nossos experimentos houve aumento significativo de TNF- α após 48 horas de interação entre macrófagos, LC e *L. loboi*. Em interação entre macrófagos humanos e *Fusarium solani* (Vieira, 2008) também foi demonstrado aumento da produção de TNF- α após 24 horas de interação.

Em relação a IL-6, nossos resultados demonstram que os macrófagos diminuem a sua produção ao longo do tempo, em cultivo. Entretanto, o resultado mais interessante em relação à interação fungo x hospedeiro, foi a completa inibição da produção de IL-6 por *L. loboi* em co-cultivo com macrófagos e LC.

A IL-6 é uma pancitocina, produzida por macrófagos, LC e linfócitos T, com um papel preponderante na resposta imune pró-inflamatória e na geração de febre (Zetterstrom *et al.*, 1998), assim como é uma citocina essencial na proteção contra infecções fúngicas, conforme observado em camundongos deficientes para IL-6, que se tornam altamente suscetíveis a infecções por *C. albicans* (Basu *et al.*, 2008), o que é compatível com a sua inibição em macrófagos e LC por *L. loboi*, porém contrastante com os achados da literatura (Vilani-Moreno, Lauris e Opromolla, 2004), que descrevem um aumento de IL-6 por monócitos do sangue circulante de pacientes de lobomicose, *in vitro*. Esta diferença pode estar relacionada a diversos fatores, que variam desde a espécie estudada, até ao tempo de cultivo e a origem de monócitos e macrófagos.

A associação de DC imaturas a co-cultura de macrófagos com células apoptóticas reduziu a produção de IL-6 e Proteína Inflamatória Macrofágica-2 (MIP-2), mas aumentou de forma significativa a atividade fagocítica de macrófagos em relação ao índice de fagocitose (Takahashi, Kurosaka e Kobayashi, 2004), corroborando nossos achados de aumento da fagocitose ao longo do tempo, mesmo na ausência de IL-6. Adicionalmente, demonstrou-se que a IL-6 induz a proliferação de neutrófilos e é uma citocina crítica para a defesa do organismo frente à *C. albicans* (Basu *et al.*, 2008), o que também está de acordo com os nossos resultados, considerando que microabscessos neutrofílicos estão presentes em menos da metade dos casos de lobomicose (Miranda *et al.*, 2010).

Na fase inicial da resposta imune aos fungos, os principais receptores de reconhecimento padrão (PRRs) presentes na superfície das células do hospedeiro e que estão envolvidos nesta resposta são os receptores toll-like (TLR), principalmente os TLR2, TLR4 e TLR6. O reconhecimento por TLR2 e TLR4 resulta na produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e MIP-2. Descreveu-se um mecanismo imunomodulador em que conídios de *Aspergillus fumigatus* induzem diminuição de IL-6 e IL-1 β em células mononucleares humanas via TLR2 e TLR4. Os conídios de *A. fumigatus* ativam macrófagos através de TLR2 e TLR4, mas as hifas do fungo inibem seletivamente a resposta mediada por TLR4, o que facilita a invasão de *A. fumigatus* (Chai *et al.*, 2009; Brakhage *et al.*, 2010)

Quanto a IL-12, houve uma inibição da produção desta citocina por LC quando em co-cultivo com macrófagos. Pesquisadores demonstraram que o GM-CSF inibe a produção de IL-12 por LC, o que poderia explicar esta inibição, já que os macrófagos são os principais

produtores de GM-CSF (Tada *et al.*, 2004). A presença de *L. loboi* em co-cultivo com LC não afetou a produção de IL-12. No entanto, *L. loboi* aumentou a produção de IL-12 pelos macrófagos e este aumento foi altamente potencializado pela presença de LC no cultivo, o que pode ser explicado pelos altos níveis de TGF- β produzido por macrófagos (Xavier *et al.*, 2008), uma citocina que possui a capacidade de aumentar a IL-12 em LC (Tada *et al.*, 2004).

Não há dados na literatura sobre a produção de IL-12 por macrófagos ou LC em interação com *L. loboi*, mas um estudo recente demonstrou que LC pulsadas *in vitro* com *C. albicans* estimulam mais a proliferação de linfócitos T em comparação com LC não pulsadas, e que a principal citocina presente nas LC foi a IL-12 (Nakagawa *et al.*, 2014).

As LC parecem estar em igual número na epiderme, tanto em pacientes de lobomicose, quanto nos controles (Quaresma *et al.*, 2010), o que revela que não há estímulo para a migração destas células a derme, apesar da infecção. Em diferentes trabalhos, as citocinas TNF- α e IL-6 foram caracterizadas como parcialmente necessárias para a migração das LC (Saitoh *et al.*, 1999; Stoitzner *et al.*, 1999), e a inibição de ambas pelo fungo *L. loboi* poderia explicar a ausência de LC nos infiltrados inflamatórios granulomatosos da doença de Jorge Lobo.

Em conjunto, nossos dados demonstram que até o tempo estudado, de 48 horas, o fungo *L. loboi* tem a capacidade de imobilizar os macrófagos, considerando a ausência de formação de células gigantes, encontradas em grande quantidade na interação *F. pedrosoi* x macrófagos (Salgado, 2010) e a inibição significativa da produção de TNF- α e IL-6, duas citocinas pró-inflamatórias fundamentais na resposta imune celular. A presença das LC consegue reverter a inibição da produção de TNF- α , mas não de IL-6 e aumenta a produção de IL-12, única citocina – dentre as estudadas – que é estimulada pela presença do fungo *L. loboi*. Talvez a presença das LC possa auxiliar em uma boa resposta imunológica no momento da implantação do fungo na pele, impedindo, junto com outras células do sistema imune, a formação e perpetuação da lesão e da doença, o que poderia contribuir para explicar parcialmente o número baixo de casos de lobomicose na população. Novos trabalhos são necessários para esclarecer melhor esta hipótese, bem como para o melhor entendimento da fisiopatogenia da infecção fungo-hospedeiro, contribuindo para o surgimento de novas terapêuticas, mais eficazes, visando melhorar a saúde da população atingida pela lobomicose, ainda essencialmente localizada na região Amazônica.

6 CONCLUSÕES

1 *L. loboi* é fagocitado por macrófagos, mas não por LC e mesmo depois de 48 horas a maioria dos fungos fagocitados permaneceram íntegros no interior dos macrófagos.

2 *L. loboi* não influencia a viabilidade de LC ou macrófagos, mesmo após 48 horas de interação.

3 LC não influencia na atividade fagocítica de *L. loboi* por macrófagos.

4 Não há formação de células gigantes multinucleadas *in vitro* na interação entre macrófagos e/ou LC e *L. loboi*.

5 Não houve diferenças significativas nos níveis de IL-4, IL-2 e IL-10 entre as interações estudadas.

6 A adição de LC ao co-cultivo de macrófagos e *L. loboi*, induz aumento da produção de TNF- α , principalmente após 48 horas de interação.

7 Há inibição da produção de IL-6 por *L. loboi* em co-cultivo com macrófagos e LC.

8 *L. loboi* estimula significativamente a produção de IL-12 por macrófagos co-cultivados com LC, mas não em LC ou macrófagos isoladamente.

Em suma, nossos dados sugerem que *L. loboi* aparentemente tem a capacidade de imobilizar os macrófagos, inibindo a formação de células gigantes e a produção de TNF- α e IL-6, citocinas fundamentais na resposta imune inata, e importantes na estimulação e migração de células de Langerhans e de neutrófilos ao local da infecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-DARAJI, W. I.; HUSAIN, E.; ROBSON, A. Lobomycosis in African patients. **Br J Dermatol**, England, v. 159, n. 1, p. 234-6, 2008. ISSN 1365-2133 (Electronic)0007-0963 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08586.x> >.

ARDAVÍN, F. A. et al. Definition of Dendritic Cell Subpopulations Present in the Spleen, Peyer's Patches, Lymph Nodes, and Skin of the Mouse. 1999-01-15 1999. Disponível em: < <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/93/2/590.long> >.

ARORA, S. K.; SINHA, R.; SEHGAL, S. Use of in vitro method to assess different brands of anti-leishmanial drugs. **Med Microbiol Immunol**, v. 180, n. 1, p. 21-7, 1991. ISSN 0300-8584 (Print)0300-8584. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245-52, Mar 19 1998. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/32588> >.

BARUZZI, R. G. et al. Occurrence of Lobo's blastomycosis among "Caiabi," Brazilian Indians. **Int J Dermatol**, v. 12, n. 2, p. 95-9, Mar-Apr 1973. ISSN 0011-9059 (Print)0011-9059. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. **Ocorrência de blastomicose queiloideana entre índios Caiabí.** **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 9, p. 135-42, 1967.

BARUZZI, R. G.; LACAZ, S.; DE SOUZA, F. A. [Natural history of Jorge Lobo's disease. Occurrence among the Caiabi Indians (Central Brazil)]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 21, n. 6, p. 303-38, Nov-Dec 1979. ISSN 0036-4665 (Print)0036-4665. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BARUZZI, R. G.; MARCOPITO, L. F. **Doença de Jorge Lobo.** In: (Ed.). **Tratado de Infectologia.** 4ª ed. rev. e atual. São Paulo: Atheneu, 2009. p.1116-9.

BARUZZI, R. G. et al. Early diagnosis and prompt treatment by surgery in Jorge Lobo's disease (keloidal blastomycosis). **Mycopathologia**, v. 74, n. 1, p. 51-4, Apr 10 1981. ISSN 0301-486X (Print)0301-486x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BASU, S. et al. Mice lacking both G-CSF and IL-6 are more susceptible to *Candida albicans* infection: critical role of neutrophils in defense against *Candida albicans*. **Growth Factors**, v. 26, n. 1, p. 23-34, Feb 2008. ISSN 0897-7194 (Print)0897-7194. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/08977190801987513> >.

BERMUDEZ, L. et al. Lobomycosis in man and lobomycosis-like disease in bottlenose dolphin, Venezuela. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 8, p. 1301-3, Aug 2009. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3201/eid1508.090347> >.

BIRBECK, M. S. et al. An Electron Microscope Study of Basal Melanocytes and High-Level Clear Cells (Langerhans Cells) in Vitiligo1. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 37, n.

1, p. 51-64, 1961-07-01 1961. ISSN 0022-202X. Disponível em: < <http://www.nature.com/jid/journal/v37/n1/abs/jid196180a.html> >.

BRAKHAGE, A. A. et al. Interaction of phagocytes with filamentous fungi. **Curr Opin Microbiol**, v. 13, n. 4, p. 409-15, Aug 2010. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2010.04.009> >.

BRITO, A. C. D.; QUARESMA, J. A. S. Lacaziosis (Jorge Lobo's disease): review and update. **An. Bras. Dermatol.**, v. 82, n. 5, p. 461-474, 10/2007 2007. ISSN 0365-0596. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0365-05962007000500010&lng=en&nrm=iso&tlng=pt >.

BRUMMER, E. et al. In vivo and in vitro activation of pulmonary macrophages by IFN-gamma for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. **J Immunol**, v. 140, n. 8, p. 2786-9, Apr 15 1988. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BURDETT HART, L. et al. Lacaziosis and lacaziosis-like prevalence among wild, common bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* from the west coast of Florida, USA. **Dis Aquat Organ**, v. 95, n. 1, p. 49-56, May 24 2011. ISSN 0177-5103 (Print)0177-5103. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3354/dao02345> >.

BURNS, R. A. et al. Report of the first human case of lobomycosis in the United States. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 3, p. 1283-5, Mar 2000. ISSN 0095-1137 (Print)0095-1137. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BUSTAMANTE, B. et al. Lobomycosis successfully treated with posaconazole. **Am J Trop Med Hyg**, v. 88, n. 6, p. 1207-8, Jun 2013. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.12-0428> >.

CARSON, R. T.; VIGNALI, D. A. Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay. **J Immunol Methods**, v. 227, n. 1-2, p. 41-52, Jul 30 1999. ISSN 0022-1759 (Print)0022-1759. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CARVALHO, A. L. V. C. **Ativação das células dendríticas da pele por alérgenos e citocinas epidérmicas**. 2003. Universidade de Coimbra, Coimbra.

CHAI, L. Y. et al. Modulation of Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 responses by *Aspergillus fumigatus*. **Infect Immun**, v. 77, n. 5, p. 2184-92, May 2009. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/iai.01455-08> >.

CRUVINEL, W. D. M. et al. Sistema Imunitário – Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n. 4, p. 434-61, 2010.

CUMBERBATCH, M.; DEARMAN, R. J.; KIMBER, I. Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta for migration. **Immunology**, v. 92, n. 3, p. 388-95, Nov 1997. ISSN 0019-2805 (Print)0019-2805. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DA SILVA, J. P. et al. Phagocytosis of *Fonsecaea pedrosoi* conidia, but not sclerotic cells caused by Langerhans cells, inhibits CD40 and B7-2 expression. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 50, n. 1, p. 104-11, Jun 2007. ISSN 0928-8244 (Print)0928-8244. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00239.x> >.

DE BRITO, A. C. **Lobomycose**. In: RIVITTI, S. A. (Ed.). **Dermatologia**. 2ª. São Paulo: Artes Médicas, 2001.

DE HOOG, G. S.; **GUARRO, J. G.; FIGUERAS, M. J. Atlas of Clinical Fungi**. 2ª. Spain: Amer Society for Microbiology, 2000.

DURDEN, W. N. et al. Lacaziosis in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Indian River Lagoon, Florida, USA. **J Wildl Dis**, v. 45, n. 3, p. 849-56, Jul 2009. ISSN 0090-3558 (Print)0090-3558. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-45.3.849> >.

FISCHER, M. et al. [Sucessful treatment with clofazimine and itraconazole in a 46 year old patient after 32 years duration of disease]. **Hautarzt**, v. 53, n. 10, p. 677-81, Oct 2002. ISSN 0017-8470 (Print)0017-8470. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00105-002-0351-y> >.

GILDEA, L. A. et al. Human dendritic cell activity against *Histoplasma capsulatum* is mediated via phagolysosomal fusion. **Infect Immun**, v. 73, n. 10, p. 6803-11, Oct 2005. ISSN 0019-9567 (Print)0019-9567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/iai.73.10.6803-6811.2005> >.

GOLCMAN, B. A. Y., M. E. Blastomycose queloidiana de Jorge Lobo - Tratamento cirúrgico de 2 casos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 48, p. 1-5, 1973. Disponível em: < <http://www.anaisdedermatologia.org.br/detalhe-artigo/1908/Blastomycose-queloidiana-de-Jorge-Lobo---Tratamento-cirurgico-de-2-casos> >.

GREENBERG, S. Signal transduction of phagocytosis. **Trends Cell Biol**, v. 5, n. 3, p. 93-9, Mar 1995. ISSN 0962-8924 (Print)0962-8924. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HERR, R. A. et al. Phylogenetic analysis of *Lacazia loboi* places this previously uncharacterized pathogen within the dimorphic Onygenales. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 1, p. 309-14, Jan 2001. ISSN 0095-1137 (Print)0095-1137. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.39.1.309-314.2001> >.

HUME, D. A. et al. The mononuclear phagocyte system revisited. **J Leukoc Biol**, v. 72, n. 4, p. 621-7, Oct 2002. ISSN 0741-5400 (Print)0741-5400. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KIMBER, I.; HOLLIDAY, M. R.; DEARMAN, R. J. Cytokine regulation of chemical sensitization. **Toxicol Lett**. v. 82-83, p. 491-6, Dec 1995. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8597100> >.

KIMBER, I.; DEARMAN, R. J. **Contact hypersensitivity: immunological mechanisms**. In: (Ed.). **Toxicology of contact hypersensitivity**. London: Taylor & Francis, 1996. p.4-25.

KISSENFENNIG, A. et al. Disruption of the langerin/CD207 gene abolishes Birbeck granules without a marked loss of Langerhans cell function. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 1, p. 88-

99, Jan 2005. ISSN 0270-7306 (Print)0270-7306. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/mcb.25.1.88-99.2005> >.

KOYAMA, Y. et al. Isolation and culture of panning method-enriched Langerhans cells from dispase-dissociated epidermal cells of the mouse. **J Dermatol**, v. 17, n. 4, p. 211-7, Apr 1990. ISSN 0385-2407 (Print)0385-2407. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LACAZ, C. S.; BARUZZI, R. G.; ROSA, M. C. B. **Doença de Jorge Lobo**. 1. São Paulo: USP-IPIS, 1986.

LACAZ, C. S. et al. **Doença de Jorge Lobo**. In: (Ed.). **Tratado de Micologia Médica** 9ª. São Paulo: Sarvier, 2002.

LEITE, J. M. **Doença de Jorge Lobo: Contribuição ao seu estudo anátomo-patológico**. . 1954. Faculdade de Medicina do Pará, Pará.

LOBO, J. O. **Um caso de Blastomicose produzido por uma espécie nova, encontrada em Recife**. **Revista Médica de Pernambuco**, v. 1, p. 763-765, 1931.

LUND-JOHANSEN, F. et al. Flow cytometric analysis of immunoprecipitates: high-throughput analysis of protein phosphorylation and protein-protein interactions. **Cytometry**, v. 39, n. 4, p. 250-9, Apr 1 2000. ISSN 0196-4763 (Print)0196-4763. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MA, J. et al. Regulation of macrophage activation. **Cell Mol Life Sci**, v. 60, n. 11, p. 2334-46, Nov 2003. ISSN 1420-682X (Print)1420-682x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-003-3020-0> >.

MADEIRA, S. et al. Comparative experimental infection of *Lacazia loboi* in BALB/c and B10.A mice. **Rev Iberoam Micol**, v. 20, n. 2, p. 55-9, Jun 2003. ISSN 1130-1406 (Print)1130-1406. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MARCOS, E. V. C. et al. Estudo de associação entre antígenos leucocitários humanos e doença de Jorge Lobo. **Rev. Soc. Bra. Med. Trop.**, v. 38, n. 5, p. 399-401, set-out, 2005. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822005000500007 >.

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, n. 5, p. 1487-99, Nov 1995. ISSN 0002-9440 (Print)0002-9440. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. Macrophage fusion and multinucleated giant cells of inflammation. **Adv Exp Med Biol**, v. 713, p. 97-111, 2011. ISSN 0065-2598 (Print)0065-2598. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-0763-4_7 >.

MIGAKI, G. et al. Lobo's disease in an atlantic bottle-nosed dolphin. **J Am Vet Med Assoc**, v. 159, n. 5, p. 578-82, Sep 1971. ISSN 0003-1488 (Print)0003-1488. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MIRANDA, M. F. et al. [Transepidermal elimination of parasites in Jorge Lobo's disease]. **An Bras Dermatol**, v. 85, n. 1, p. 39-43, Jan-Feb 2010. ISSN 0365-0596. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

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, n. 2, p. 205-10, Feb 2004. ISSN 0007-0963 (Print)0007-0963. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MORGAN, E. et al. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. **Clin Immunol**, v. 110, n. 3, p. 252-66, Mar 2004. ISSN 1521-6616 (Print)1521-6616. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2003.11.017> >.

MOSCARDI-BACCHI, M.; BRUMMER, E.; STEVENS, D. A. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. **J Med Microbiol**, v. 40, n. 3, p. 159-64, Mar 1994. ISSN 0022-2615 (Print)0022-2615. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MURDOCH, M. E. et al. Lacaziosis in bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* along the coastal Atlantic Ocean, Florida, USA. **Dis Aquat Organ**, v. 92, n. 1, p. 69-73, Oct 26 2010. ISSN 0177-5103 (Print)0177-5103. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3354/dao02282> >.

MURREY, P. R. et al. **Elements of host protective response**. In: (Ed.). **Medical Microbial** 3^a, 1998.

NAKAGAWA, M. et al. IL-12 secretion by Langerhans cells stimulated with *Candida* skin test reagent is mediated by dectin-1 in some healthy individuals. **Cytokine**, v. 65, n. 2, p. 202-9, Feb 2014. ISSN 1043-4666. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2013.11.002> >.

OPROMOLLA, D. V. A. et al. Correlação Clínico patológica em 40 casos novos de blastomicose. **An. Bras. Dermatol.**, v. 75, p. 425-434, 2000.

PANIZ-MONDOLFI, A. et al. Lobomycosis: an emerging disease in humans and delphinidae. **Mycoses**, v. 55, n. 4, p. 298-309, Jul 2012. ISSN 0933-7407. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2012.02184.x> >.

PANIZ-MONDOLFI, A. E.; SANDER-HOFFMANN, L. Lobomycosis in inshore and estuarine dolphins. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 4, p. 672-3, Apr 2009. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3201/eid1504.080955> >.

PAPADAVID, E. et al. Lobomycosis: A case from Southeastern Europe and review of the literature. **J Dermatol Case Rep**, v. 6, n. 3, p. 65-9, Sep 28 2012. ISSN 1898-7249. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3315/jdcr.2012.1104> >.

PARAMESWARAN, N.; PATIAL, S. Tumor Necrosis Factor- α Signaling in Macrophages. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, v. 20, n. 2, p. 87-103, 2010. ISSN 1045-4403 (Print). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PECHER, S. A.; CROCE, J.; FERRI, R. G. Study of humoral and cellular immunity in lobomycosis. **Allergol Immunopathol (Madr)**, v. 7, n. 6, p. 439-44, Nov-Dec 1979. ISSN 0301-0546 (Print)0301-0546. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

QUARESMA, J. A. et al. Immunohistochemical study of Langerhans cells in cutaneous lesions of the Jorge Lobo's disease. **Acta Trop**, v. 114, n. 1, p. 59-62, Apr 2010. ISSN 0001-706x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.12.005> >.

RABINOVITCH, M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. **Trends Cell Biol**, v. 5, n. 3, p. 85-7, Mar 1995. ISSN 0962-8924 (Print)0962-8924. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

RAMOS, E. S. M. et al. Lobomycosis. Literature review and future perspectives. **Actas Dermosifiliogr**, v. 100 Suppl 1, p. 92-100, Nov 2009. ISSN 0001-7310 (Print)0001-7310. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ROMANI, L. Innate and adaptive immunity in *Candida albicans* infections and saprophytism. **J Leukoc Biol**, v. 68, n. 2, p. 175-9, Aug 2000. ISSN 0741-5400 (Print)0741-5400. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ROMERA, L. M. D. **Análise da interação entre *Paracoccidioides brasilienses* e macrófagos através de receptores do tipo Notch.** 2012. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ROTSTEIN, D. S. et al. Lobomycosis in offshore bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*), North Carolina. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 4, p. 588-90, Apr 2009. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3201/eid1504.081358> >.

RUDKIN, F. M. et al. Altered dynamics of *Candida albicans* phagocytosis by macrophages and PMNs when both phagocyte subsets are present. **MBio**, v. 4, n. 6, p. e00810-13, 2013. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00810-13> >.

SAITOH, A. et al. Migration of Langerhans cells in an in vitro organ culture system: IL-6 and TNF-alpha are partially responsible for migration into the epidermis. **J Dermatol Sci**, v. 19, n. 3, p. 166-74, Apr 1999. ISSN 0923-1811 (Print)0923-1811. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SALGADO, C. G. Fungal x host interactions in Chromoblastomycosis: what we have learned from animal models and what is yet to be solved. **Virulence**, United States, v. 1, n. 1, p. 3-5, 2010. ISSN 2150-5608 (Electronic)2150-5594 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4161/viru.1.1.10169> >.

SALGADO, C. G. et al. Differential effects of cytokines and immunosuppressive drugs on CD40, B7-1, and B7-2 expression on purified epidermal Langerhans cells1. **J Invest Dermatol**, v. 113, n. 6, p. 1021-7, Dec 1999. ISSN 0022-202X (Print)0022-202x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00785.x> >.

_____. Enzymatic isolation of *Lacazia loboi* cells from skin lesions of lobomycosis. **Med Mycol**, v. 47, n. 2, p. 119-23, Mar 2009. ISSN 1369-3786 (Print)1369-3786. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/13693780802127177> >.

SEIDER, K. et al. Interaction of pathogenic yeasts with phagocytes: survival, persistence and escape. **Curr Opin Microbiol**, v. 13, n. 4, p. 392-400, Aug 2010. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2010.05.001> >.

SILVERSTEIN, S. C. Phagocytosis of microbes: insights and prospects. **Trends Cell Biol**, v. 5, n. 3, p. 141-2, Mar 1995. ISSN 0962-8924 (Print)0962-8924. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SIMÕES-LOPES, P. C. et al. **First case of lobomycosis in a bottlenose dolphin from Southern Brazil. Marine Mammal Science**, v. 9, n. 3, p. 329-331, 1993.

STAFFORD, J. L.; NEUMANN, N. F.; BELOSEVIC, M. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. **Crit Rev Microbiol**, v. 28, n. 3, p. 187-248, 2002. ISSN 1040-841X (Print)1040-841x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/1040-840291046731> >.

STOITZNER, P. et al. Migration of langerhans cells and dermal dendritic cells in skin organ cultures: augmentation by TNF-alpha and IL-1beta. **J Leukoc Biol**, v. 66, n. 3, p. 462-70, Sep 1999. ISSN 0741-5400 (Print)0741-5400. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TABORDA, P. R.; TABORDA, V. A.; MCGINNIS, M. R. *Lacazia loboi* gen. nov., comb. nov., the etiologic agent of lobomycosis. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 6, p. 2031-3, Jun 1999. ISSN 0095-1137 (Print)0095-1137. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TADA, Y. et al. Differential effects of LPS and TGF-beta on the production of IL-6 and IL-12 by Langerhans cells, splenic dendritic cells, and macrophages. **Cytokine**, v. 25, n. 4, p. 155-61, Feb 21 2004. ISSN 1043-4666 (Print)1043-4666. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TAKAHASHI, M.; KUROSAKA, K.; KOBAYASHI, Y. Immature dendritic cells reduce proinflammatory cytokine production by a coculture of macrophages and apoptotic cells in a cell-to-cell contact-dependent manner. **J Leukoc Biol**, v. 75, n. 5, p. 865-73, May 2004. ISSN 0741-5400 (Print)0741-5400. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.1003471> >.

TALHARI, C. et al. Disseminated lobomycosis. **Int J Dermatol**, v. 47, n. 6, p. 582-3, Jun 2008. ISSN 0011-9059. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-4632.2008.03678.x> >.

_____. Lobomycosis. **An Bras Dermatol**, v. 85, n. 2, p. 239-40, Mar-Apr 2010. ISSN 0365-0596. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TALHARI, S.; TALHARI, C. Lobomycosis. **Clin Dermatol**, v. 30, n. 4, p. 420-4, Jul-Aug 2012. ISSN 0738-081x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2011.09.014> >.

TEUNISSEN, M. B. et al. Human epidermal Langerhans cells undergo profound morphologic and phenotypical changes during in vitro culture. **J Invest Dermatol**, v. 94, n. 2, p. 166-73, Feb 1990. ISSN 0022-202X (Print)0022-202x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

VIEIRA, R. T. **Interação de *Mycobacterium leprae*, *Leishmania amazonensis* e *Fusarium solani* com macrófagos humanos – papel do óxido nítrico e derivados de piridinas.** 2008. Universidade Federal Fluminense, Niterói.

VILANI-MORENO, F. R. et al. Immunohistochemical characterization of the cellular infiltrate in Jorge Lobo's disease. **Rev Iberoam Micol**, v. 22, n. 1, p. 44-9, Mar 2005. ISSN 1130-1406 (Print)1130-1406. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

VILANI-MORENO, F. R.; LAURIS, J. R.; OPROMOLLA, D. V. Cytokine quantification in the supernatant of mononuclear cell cultures and in blood serum from patients with Jorge Lobo's disease. **Mycopathologia**, v. 158, n. 1, p. 17-24, Jul 2004. ISSN 0301-486X (Print)0301-486x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

VILANI-MORENO, F. R.; SILVA, L. M.; OPROMOLLA, D. V. Evaluation of the phagocytic activity of peripheral blood monocytes of patients with Jorge Lobo's disease. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 37, n. 2, p. 165-8, Mar-Apr 2004. ISSN 0037-8682 (Print)0037-8682. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

WOODS, W. J. et al. Ten years experience with Jorge Lobo's disease in the state of Acre, Amazon region, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 52, n. 5, p. 273-8, Sep-Oct 2010. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

XAVIER, M. B. et al. Macrophage and TGF-beta immunohistochemical expression in Jorge Lobo's disease. **Hum Pathol**, v. 39, n. 2, p. 269-74, Feb 2008. ISSN 0046-8177 (Print)0046-8177. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2007.06.016> >.

ZAMBRUNO, G. et al. Functional intercellular adhesion molecule-3 is expressed by freshly isolated epidermal Langerhans cells and is not regulated during culture. **J Invest Dermatol**, v. 105, n. 2, p. 215-9, Aug 1995. ISSN 0022-202X (Print)0022-202x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ZETTERSTROM, M. et al. Delineation of the proinflammatory cytokine cascade in fever induction. **Ann N Y Acad Sci**, v. 856, p. 48-52, Sep 29 1998. ISSN 0077-8923 (Print)0077-8923. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ZHANG, X.; MOSSER, D. M. Macrophage activation by endogenous danger signals. **J Pathol**, v. 214, n. 2, p. 161-78, Jan 2008. ISSN 0022-3417 (Print)0022-3417. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/path.2284> >.