



Universidade de Brasília
Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular

Modulação da atividade dos macrófagos por diferentes
formas do *Fonsecaea pedrosoi*

LUIZA CHAVES DE MIRANDA LEONHARDT

Brasília

2014

LUIZA CHAVES DE MIRANDA LEONHARDT

Modulação da atividade dos macrófagos por diferentes formas do *Fonsecaea pedrosoi*

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, como parte necessária para obtenção do Título de Mestre em Patologia Molecular-Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Anamélia Lorenzetti Bocca

Brasília

2014

Agradecimentos

Aos meus pais, pelo apoio incondicional que me fortaleceu para a realização de mais um sonho. Somente tenho a agradecer pelas palavras amigas e incentivadoras, mesmo que vocês não estejam perto de mim todos os dias!

Ao meu marido Renato, pelo amor e pelo companheirismo!

À professora Anamélia, pela confiança depositada no gerenciamento e administração do laboratório. E posteriormente pela oportunidade em trabalhar como pesquisadora. Obrigada por todo o conhecimento, e técnicas ensinadas!

A todos os amigos do Laboratório de Imunologia Aplicada pelos conselhos, ideias, artigos, e companhia. Em especial ao Isaque e ao Raffael, pelas padronizações que conseguimos no grupo da cromoblastomicose, e pela agradável companhia nos finais de semana! Aos amigos de outros laboratórios, Fabi pela disposição e ajuda sempre que necessário. Aos professores, Aldo, Kelly, Ildinete por todos os ensinamentos e pela ajuda sempre que necessário.

Ao professor João Santana por suas contribuições que foram fundamentais

À FAPDF, Capes e CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	3
Sumário.....	4
Índice de figuras	7
Lista de Abreviaturas	10
Resumo.....	12
Abstract.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
1. 1 Cromoblastomicose.....	14
1.1.1 Etiologia.....	14
1.1.2 Epidemiologia.....	15
1.1.3 <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	16
1.1.4 Características clínicas.....	18
1.1.5 Imunopatologia da CBM.....	19
1.1.6 Tratamento.....	22
1.1.7 Diagnóstico.....	22
1. 2 Fagocitose	23
1. 3 Receptores do tipo Toll.....	25
2. OBJETIVOS.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 Animais.....	29
3.2 Diferenciação de macrófagos derivados de medula óssea.....	29

3.3 Células fúngicas	30
3.3.1 Obtenção de conídeos	30
3.3.2 Obtenção de células muriformes	31
3.4 Ensaios de interação de macrófagos com células fúngicas.....	32
3.4.1 Co-cultivo de macrófagos peritoneais com células fúngicas.....	32
3.4.2 Co-cultivo de macrófagos BMDM com células fúngicas.....	33
3.4.3 Co-cultivo de macrófagos peritoneais com lipídeo total extraído de células muriformes de <i>F. pedrosoi</i>	33
3.5 Quantificação das unidades formadoras de colônia.....	34
3.6 Índice de fagocitose	34
3.7 Microscopia confocal	35
3.8 Dosagem de citocinas e mediadores solúveis	35
3.9 Análise estatística	36
4. RESULTADOS	37
4.1 Análise da capacidade fagocítica e microbicida de macrófagos murinos com conídeos de <i>F. pedrosoi</i>	37
4.1.1 Co-cultura de conídeos de <i>F. pedrosoi</i> com macrófagos BMDM deficientes para TLR4.....	40
4.2 Análise da capacidade fagocítica e microbicida de macrófagos murinos com células muriformes de <i>F. pedrosoi</i>	41
4.2.1 Co-cultura de células muriformes de <i>F. pedrosoi</i> com macrófagos deficientes para TLR4	44
4.3 Dosagem de citocinas da co-cultura de macrófagos peritoneais com diferentes formas fúngicas de <i>F. pedrosoi</i>.....	45

4.4 Dosagem de citocinas da co-cultura de macrófagos peritoneais e lipídeo total extraído da célula muriforme de <i>F. pedrosoi</i>.....	47
5. DISCUSSÃO.....	51
6. CONCLUSÕES.....	57
7. FIGURAS SUPLEMENTARES.....	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

Índice de figuras

Figura 1. Distribuição dos casos de cromoblastomicose nos últimos 50 anos.....	16
Figura 2. Macro e micromorfologia do <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	17
Figura 3. Morfologia das formas fúngicas de <i>Fonsecaea pedrosoi</i> observadas no Microscópio Eletrônico de Varredura e no microscópio de luz	17
Figura 4. Reação granulomatosa induzida pela inoculação intraperitoneal ou subcutânea de células conidiogênicas e conídeo de <i>F. pedrosoi</i>	20
Figura 5. Esquematização procedimentos realizados após ensaio de interação de macrófagos com células fúngicas de <i>F. pedrosoi</i>	32
Figura 6. Índice de fagocitose na interação de macrófagos previamente estimulados com agonistas de TLR2/TLR6, TLR4, Dectina-1 ou inibidor de acidificação com conídeos de <i>F. pedrosoi</i>	38
Figura 7. Quantificação da UFC e UFC/ relativa na interação de macrófagos previamente estimulados com agonistas de TLR2/TLR6, TLR4, Dectina-1 ou inibidor de acidificação com conídeos de <i>F. pedrosoi</i>	39
Figura 8. Influência da acidificação do fagolisossomo na capacidade fagocítica na interação de macrófagos com conídeos de <i>F. pedrosoi</i>	40

Figura 9. Quantificação da UFC e UFC relativa da interação de conídeos de *F. pedrosoi* com macrófagos C57 selvagens, TLR4-/- previamente estimulados com cloroquina41

Figura 10. Índice de fagocitose na interação de macrófagos previamente estimulados com agonistas de TLR2/TLR6, TLR4, Dectina-1 ou inibidor de acidificação com células muriformes de *F. pedrosoi*.....42

Figura 11. Quantificação da UFC e UFC/ relativa na interação de macrófagos previamente estimulados com agonistas de TLR2/TLR6, TLR4, Dectina-1 ou inibidor de acidificação com células muriformes de *F. pedrosoi*.....43

Figura 12. Quantificação UFC e UFC relativa da interação de células muriformes de *F. pedrosoi* com macrófagos C57 selvagens TL4-/- previamente estimulados com cloroquina.....44

Figura 13. Quantificação da produção da citocina MCP-1 da co-cultura de macrófagos peritoneais com hifas, conídeos e CM de *F. pedrosoi*, MOI (1:1) nos períodos de 6,12, 24 e 48h de interação.....45

Figura 14. Quantificação da produção da citocina IL-6 da co-cultura de macrófagos peritoneais com hifas, conídeos e CM de *F. pedrosoi* no período de 6, 12, 24 e 48h de interação.....46

Figura 15. Quantificação da produção da citocina TNF- α da co-cultura de macrófagos peritoneais com hifas, conídeos e CM de *F. pedrosoi* no período de 6, 12, 24 e 48h de interação.....46

Figura 16. Dosagem da citocina MCP-1 do sobrenadante da co-cultura de macrófagos peritoneais e lipídeo total extraído da célula muriforme de *F. pedrosoi* em diferentes concentrações (1,10,50µg/ml) e em diferentes tempos de interação (6, 12, 24 e 48h).....48

Figura 17. Dosagem da citocina IL-6 do sobrenadante da co-cultura de macrófagos peritoneais e lipídeo total extraído da célula muriforme de *F. pedrosoi* em diferentes concentrações (1,10,50µg/ml) e em diferentes tempos de interação (6, 12, 24 e 48h).
.....48

Figura 18. Dosagem da citocina IL-12 do sobrenadante da co-cultura de macrófagos peritoneais e lipídeo total extraído da célula muriforme de *F. pedrosoi* em diferentes concentrações (1,10,50µg/ml) e em diferentes tempos de interação (6, 12, 24 e 48h).....49

Figura 19. Quantificação de NO pela reação de Griess do sobrenadante da co-cultura de macrófagos peritoneais e lipídeo total extraído da célula muriforme de *F. pedrosoi*.....50

Figura 20. Imagens de microscopia óptica obtidas do ensaio de interação de conídeos de *F. pedrosoi* com macrófagos peritoneais previamente estimulados com agonistas de TLR4, TLR2 e Dectina-1 ou cloroquina.....58

Figura 21. Imagens de microscopia óptica obtidas do ensaio de interação de células muriformes de *F. pedrosoi* com macrófagos peritoneais previamente estimulados com agonistas de TLR4, TLR2 e Dectina-1 ou cloroquina.....59

Lista de Abreviaturas

ANOVA- análise de variância

BD - meio Batata Dextrose

BF - meio Butterfield

BMDM - macrófagos derivados de medula óssea

CBM - cromoblastomicose

CM - célula muriforme

CLOR - cloroquina

CON - conídio

h- horas

IF - índice de fagocitose

IFN - interferon γ

KO - Knockouts

LPS- lipossacarídeo

min- minutos

nm - nanomolar

p - significância estatística

Pam2CSK4- Synthetic bacterial lipoprotein- TLR2- TLR6 ligand

PAMPs - padrões moleculares associados à patógenos

PBS - tampão fosfato

PRRs - receptores do reconhecimento de padrões

RPM- rotações por minuto

SFB - Soro Fetal Bovino

SDA - meio Sabourad Ágar

UFC - unidades Formadoras de Colônia

μg - microgramas

μL - microlitros

μmol - micromolar

ZIM- zymosan

TLR - receptores do tipo Toll (*Toll like receptors* - TLR)

Resumo

A cromoblastomicose (CBM) é uma micose subcutânea, crônica, de distribuição cosmopolita, causada por vários fungos demáceos, pigmentados e dimórficos, sendo o *Fonsecaea pedrosoi* um dos agentes etiológicos mais recorrente. Estudos a respeito da importância dos receptores do tipo Toll no processo da internalização e reconhecimento de *F. pedrosoi* ainda são escassos de modo que o presente trabalho analisou a participação de alguns receptores de reconhecimento padrão dos macrófagos infectados com diferentes formas do fungo. Nossos resultados demonstraram que os conídeos são capazes de proliferar no interior dos macrófagos previamente estimulados com agonistas de TLR4, TLR2/TLR6 e Dectina-1. Já as células muriformes, apresentaram um resultado diferente, onde macrófagos infectados com essa forma fúngica e previamente estimulados com zymosan e LPS, apresentaram ação fungicida. Outros componentes da parede do fungo, que poderiam interferir na ativação correta dos macrófagos são os lipídeos, porém lipídeos totais extraídos das células muriformes de *F. pedrosoi* não modularam a ativação dos macrófagos quanto à produção das citocinas MCP-1, IL-6, IL-12 e NO. A ativação adequada dos macrófagos, para que possa eliminar o fungo internalizado, depende da ativação conjunta de mais de um receptor, como quando estimulado com zymosan e LPS, bem como da adequada maturação do endossomo, considerando que o fungo consegue sobreviver em meio ácido.

Palavras chaves: células muriformes, conídeo, *Fonsecaea Pedrosoi*, receptores do tipo Toll

Abstract

The chromoblastomycosis is a chronic subcutaneous mycosis of cosmopolitan distribution, caused by several pigmented (dematiaceous) and dimorphic fungi. *Fonsecaea pedrosoi* is one of the most recurrent etiological agents. Studies on the importance of pattern recognition receptors (PRR) in the process of internalization and recognition *F. pedrosoi* are poor, so the objective of this work was examined the participation of some macrophage PRR during infection with different forms of this fungus. Our results showed a higher proliferation index of conidia within macrophages when macrophage were previously stimulated with TLR4, TLR2 / TLR6 and Dectin-1 agonists. Macrophages previously stimulated with zymosan and LPS and infected with muriformes cells showed a fungicidal action. Other components of the fungal wall, which could interfere with proper activation of macrophages are lipids, but total lipids extracted from *F. pedrosoi* muriformes cells did not modulate macrophage activation inducing production of MCP-1, IL-6, IL-12 and NO. Macrophages properly activated can eliminate internalized fungus and this activity is associated with a receptors crosstalk, as when stimulated with zymosan and LPS.

Keywords: Muriformes cells, conidia, *Fonsecaea pedrosoi*, Toll-like receptors

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cromoblastomicose

1.1.1 Etiologia

A cromoblastomicose é uma micose subcutânea crônica, granulomatosa, supurativa, por vezes debilitante, causada por fungos filamentosos, dimórficos, pertencentes à antiga família *Dematiaceae* (Londero & Ramos, 1976; McGinnis *et al.*, 1985; Rippon, 1988; Martinez & Tolvar, 2007). Estes fungos apresentam em comum a deposição de melanina na parede celular e adicionalmente em vesículas intracelulares (Franzen *et al.*, 2008). Vários fungos demácios estão relacionados com a etiologia da cromoblastomicose (natureza multietiológica). No entanto, *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladophialophora carrionii* são as espécies isoladas com maior frequência das lesões dos pacientes. Ambas são identificadas em regiões tropicais e subtropicais, embora o *F. pedrosoi* seja encontrado preferencialmente em áreas úmidas enquanto que o *C. carrionii* é prevalente em áreas de clima semi-áridos (Leslie & Beardmore, 1979; Esterre *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 1998; Bonifaz *et al.*, 2001; Minotto *et al.*, 2001; Perez-Blanco *et al.*, 2006; Schell & Esterre, 2006).

Com menor frequência, a CBM pode ser causada por *Fonsecaea compacta*, *Phialophora verrucosa*, *Rhinocladiella aquaspersa* ou *Exophiala dermatitidis* (Borelli, 1972; Rippon, 1982; McGinnis, 1983; Matsumoto *et al.*, 1993; Martínez & Tovar, 2007). *Exophiala jeanselmei* e *Exophiala spinifera* também foram observados formando células muriformes em lesões típicas da CBM (Naka *et al.*, 1986; Padhye & Ajello, 1987; Barba-Gomez *et al.*, 1992). Todos esses agentes etiológicos pertencem à mesma ordem de ascomicetos, a *Chaetothyriales*. Estudos taxonômicos moleculares revelaram que *F. compacta* representa uma espécie variante morfológica de *F. pedrosoi* e, recentemente, *F. monophora* foi descrita como uma nova espécie com fenótipo similar à *F. pedrosoi*,

porém, geneticamente distinta (De Hoog *et al.*, 2004; Xi *et al.*, 2008). Embora *F. monophora* seja considerada espécie oportunista, pouco relacionada à CBM, estudos moleculares revelaram ser o agente predominante em casos da doença no sul da China.

1.1.2 Epidemiologia

A CBM tem distribuição mundial sendo prevalente em países de clima tropical e subtropical como Brasil, Madagascar, África do Sul e Costa Rica (Figura. 1). No continente americano também foram diagnosticados casos nos seguintes países: México, Cuba, República Dominicana, Colômbia, Equador e Venezuela (Pretelt, 1989; Bonifaz, 2001). Apesar de apresentar características climáticas similares, o continente asiático registra baixos índices da doença, sendo a maioria dos casos observados no Sri Lanka, Índia, China e Japão (Attapattu, 1997; Rajendran *et al.*, 1997; Xi *et al.*, 2009). Pequeno número de casos tem sido descrito nos Estados Unidos e na Europa (Rippon, 1988; Queiroz-Telles *et al.*, 2009).

No Brasil, segundo Matte *et al.* (1997), algumas áreas também são consideradas endêmicas como o Rio Grande do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. Foram diagnosticados 100 casos no estado do Rio Grande do Sul entre 1963-1998 (Minotto *et al.*, 2001), 71 casos no estado do Paraná entre 1985 e 1996 (Queiroz Filho, 1997) e, após um estudo entre 1942-1997, com 325 casos diagnosticados, a região Amazônica foi considerada endêmica (Silva *et al.*, 1998).



Figura 1. Distribuição dos casos de cromoblastomicose nos últimos 50 anos. Fonte: Laboratório de Dermato-Imunologia (adaptado de Yamano, 2008)

1.1.3 *Fonsecaea pedrosoi*

O *F. pedrosoi*, cuja classificação taxonômica é posicionada no reino *Fungi*, filo *Ascomycota*, classe *Euascomycetes*, ordem *Chaetothyriales* e família *Herpotrichiellaceae*, é o principal agente etiológico da CBM no mundo, sendo o fungo mais frequente isolado das lesões (Santos *et al.*, 2007; Martinez & Tovar, 2007). Ele é um fungo polimórfico, pigmentado, que vive na natureza como saprófita (Figura 2, A-D), sendo encontrado no solo, nos vegetais e em troncos de madeira em decomposição (Nimrichter *et al.*, 2004; Lacaz *et al.*, 2002). O *F. pedrosoi* foi isolado de algumas outras fontes como os espinhos da planta *Mimosa pudica* e do coco Babaçu (*Orgignya phalerata* Martius) (Salgado *et al.*, 2004; Marques *et al.*, 2006).

O *F. pedrosoi* é considerado um fungo polimórfico por apresentar mais de duas formas de desenvolvimento, como os conídeos, hifas ou micélios, consideradas como formas saprofíticas, e as células muriformes isoladas ou ligadas às hifas, que são

consideradas como formas patogênicas (Figura 3, A-D) (Alviano *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2007).

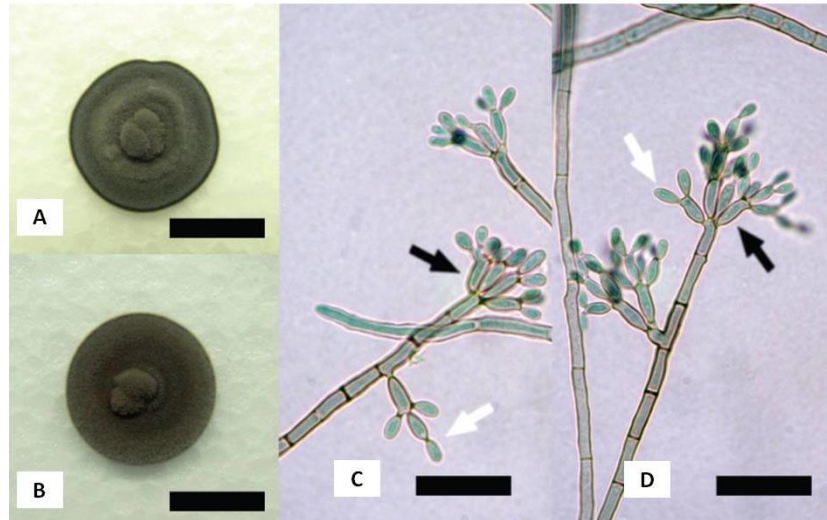


Figura 2. Macro e micromorfologia do *Fonsecaea pedrosoi*. Aspectos macroscópicos da cultura do fungo (A-B), que apresenta coloração negra e aspecto cotonoso. Micromorfologia de hifas, com a presença de conidióforos terminais (setas pretas) e conídeos (setas brancas) (C-D) (Salgado *et al.*, 2004).

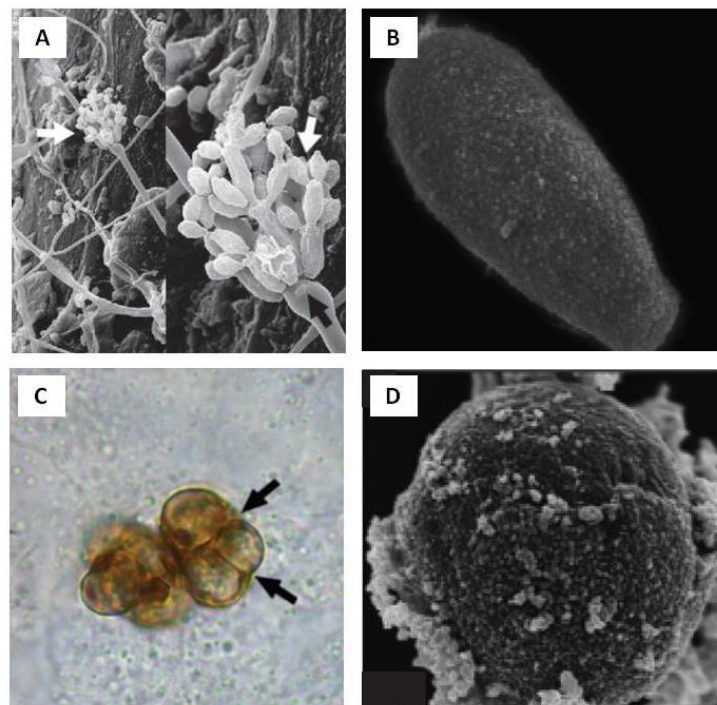


Figura 3. Morfologia das formas fúngicas de *Fonsecaea pedrosoi* observadas no Microscópio Eletrônico de Varredura (A-B e D) e no microscópio de luz (C). (A) Ultramicrografias de varredura das hifas, conidióforo (seta preta), células conidiogênicas, (A-B) conídeos; (C-D) células muriformes do *F. pedrosoi* (seta preta). A,C (Salgado *et al.*, 2004); B,D (Franzen *et al.*, 2006).

1.1.4 Características clínicas

A virulência, viabilidade e quantidade de inóculo do parasita, além dos fatores relacionados ao hospedeiro como idade e condições imunológicas, são fatores determinantes do curso da infecção. Os mecanismos de defesa influenciam no surgimento e na severidade das infecções fúngicas, assim como a forma clínica da doença depende da resposta imune do hospedeiro (Romani, 2011; Gimenes, 2006).

Comumente, a CBM desenvolve-se após a inoculação transcutânea de propágulos fúngicos (fragmentos de hifas, conídeos e células conidiogênicas), geralmente em decorrência de traumas por fragmentos vegetais contaminados, como espinhos e lascas de madeira (Esterre & Queiroz-Telles, 2006). No entanto, embora os relatos sejam raros, outras vias de infecção também foram descritas, as quais incluem inalação de esporos e disseminação hematogênica (Howard *et al.*, 1991). O local frequentemente acometido é a extremidade dos membros inferiores, seguido de membros superiores, região glútea, tronco e face. Uma vez instalado no tecido, o fungo adere-se às células epiteliais e diferencia-se em estruturas parasitárias características, denominadas células muriformes, as quais resistem à destruição pelas células efetoras do hospedeiro favorecendo assim o estabelecimento crônico da doença (Gimenes *et al.*, 2006; Queiroz-Telles *et al.*, 2009)

Clinicamente, a CBM é caracterizada pelo desenvolvimento lento de lesões polimórficas como: nódulos, verrugas, tumores, placas e cicatrizes (McGinnis, 1983; Queiroz-Telles *et al.*, 2003). Durante a fase inicial da doença é comum ocorrer a eliminação transepitelial ou dermoepitelial espontânea do fungo, em que o tecido conectivo lesado, pela inoculação de lascas de madeira ou espinhos, pode expelir o fungo através da epiderme, resultando em pontos negros na superfície da lesão (Limongi *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2002). Tais pontos negros representam uma forma de resistência do

fungo, que é capaz de sobreviver por longos períodos e recidivar a lesão. Ao mesmo tempo, também estão relacionados à auto-inoculação do fungo, bem como ao seu retorno à natureza (Bayles, 1986; Rosen & Overholt, 1996).

1.1.5 Imunopatologia da CBM

A reação granulomatosa, característica das lesões na CBM (Figura. 4), associada com abscessos ricos em neutrófilos, demonstra a incapacidade das células fagocíticas em eliminar completamente o fungo. Os neutrófilos representam a primeira linha de defesa do hospedeiro seguido por macrófagos ativados, às vezes na forma de células epitelióides e/ou células multinucleadas gigantes (Esterre *et al.*, 1993). Os neutrófilos destroem as células fúngicas pela produção de reativos intermediários do oxigênio, produção de mieloperoxidase ou outros componentes secretados por essas células, enquanto os macrófagos quando ativados atuam de forma fungistática. Existem evidências de que estruturas do fungo (como a melanina) possam modular negativamente a capacidade do macrófago em eliminar o fungo *in vitro*, como inibindo a produção de óxido nítrico (Rozental *et al.*, 1994; Farbiarz *et al.*, 1992; Machado *et al.*, 2004; Bocca *et al.*, 2006).

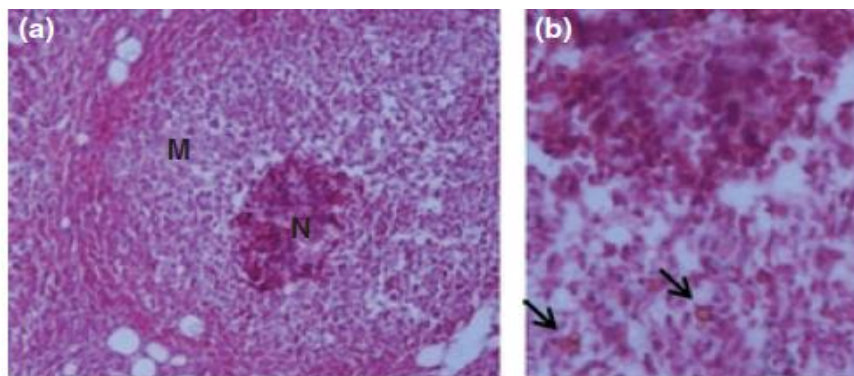


Figura 4. Reação granulomatosa induzida pela inoculação intraperitoneal ou subcutânea de células conidiogênicas e conídeo de *F. pedrosoi*. Abscesso com regiões ricas em macrófagos (M) na periferia e neutrófilos na zona central (a). Células fúngicas (setas pretas), intactas observadas na região do macrófago (Machado *et al.*, 2009)

Indivíduos infectados com o *F. pedrosoi*, que apresentam a forma branda da doença, produzem altos níveis de citocinas, com um perfil majoritariamente inflamatório. Entretanto, pacientes com a forma severa da doença apresentam um perfil de produção de citocinas com um predomínio da produção de IL-10, baixos níveis de IFN- γ e com baixos índices de proliferação de células T (Gimeneses *et al.*, 2005). Esta capacidade do patógeno em estimular de diferentes formas os macrófago, determina se as células irão desenvolver uma resposta preferencialmente do tipo Th1 ou Th2 (Souza *et al.*, 2008). Geralmente a imunidade mediada por células do tipo Th1 é requerida para o combate a infecções intracelulares, enquanto a imunidade do tipo Th2 resulta em susceptibilidade a estas infecções. (Altamura, *et al.*, 2001).

A resposta inflamatória murina que resulta no tipo de hipersensibilidade retardada, de acordo com Souza e colaboradores (2006), está diminuída somente na ausência de células TCD4 em camundongos infectados por *F. pedrosoi*. Não foram observadas diferenças em camundongos nocautes (KO) para TCD8. Resultados obtidos por Machado e colaboradores (2010) sugerem que a estimulação antigênica em múltiplos sítios pode aumentar a tolerância periférica a infecção por *F. pedrosoi*. Foi observada uma resposta inflamatória inicial baixa no local da infecção secundária e quando os camundongos foram pré-estimulados via oral ou pela mucosa pulmonar com células fúngicas viáveis e não viáveis, a infecção foi mais prolongada. Em animais KOCD4 ou KOCD8, o curso da infecção foi diferente após a co-estimulação onde camundongos KOCD4 demonstraram significativo inchaço nas patas após infecção, mas esta regressou na maioria dos casos após 60 dias. Em contraste, camundongos KOCD8 co-estimulados apresentaram extensas lesões necróticas com progressivo inchaço nas patas e não houve sinal de cura. A presença dos anticorpos também é importante no curso da CBM. Esterre

et al. (2000) demonstraram a participação da imunoglobulina M (IgM) e IgA na resposta imune humoral em pacientes com cromoblastomicose.

Componentes álcali insolúvel da parede celular do *F. pedrosoi*, *F. compactum* e *Cladosporium carrioni* são capazes de induzir a formação de granulomas (Silva & Fazioli, 1985). Esta fração contém altas concentrações de b-glicana e já foi descrito na literatura que moléculas como as β -glicanas estimulam a resposta dos receptores do tipo toll (*Toll Like Receptor* – TLR) (Levitz, 2004). Componentes da parede do fungo, como a fração F1 constituída basicamente de quitina e β -1,3-glicana), são capazes de modular a resposta imune do hospedeiro no controle da cromoblastomicose (Alviano *et al.*, 2003; de Medeiros Nobrega *et al.*, 2010). Não só os polissacarídeos da parede celular do fungo são importantes para a interação com as células do hospedeiro, Limongi *et al.*, (2001) demonstraram que conídeos de *F. pedrosoi* possuem uma forte interação com células que expõem manose ou N-acetilglucosamina em suas superfícies, sugerindo que a adesina possui um papel no reconhecimento celular assim como potencial para influenciar o curso da infecção por *F. pedrosoi*.

Souza *et al.*, (2011) descobriram que a co-estimulação de leucócitos com agonistas de TLR purificados induz uma intensa resposta inflamatória ao *F. pedrosoi*, indicando que a falta de reconhecimento para esta família de PAMPs é responsável por um defeito na resposta imune inata. Semelhante a Dectina-1, a resposta inflamatória requer a sinalização via SyK-CARD-9, mas foi desencadeada pelo receptor FcR- γ acoplado ao Mincle. Utilizando-se um modelo murino de infecção sistêmica, a administração de LPS intravenoso e intraperitoneal reduziu significativamente a carga fúngica nos órgãos infectados, corroborando a hipótese destes mesmo autores de que administração exógena de agonistas de TLR4 auxilia na ação da infecção *in vivo*. Desta

forma, as condições em que ocorre a interação fungo-fagócito são fundamentais para a progressão da doença.

1.1.6 Tratamento

O tratamento inclui a combinação de drogas antifúngicas e excisão cirúrgica da lesão (Martinez & Tovar, 2007; Queiros-Telles *et al.*, 2009). Entretanto, diagnósticos incorretos, recaídas e interrupções terapêuticas são frequentes, causando uma alta porcentagem de morbidez (Bonifaz *et al.*, 2001). O tratamento convencional da cromoblastomicose, apesar de reduzir a carga fúngica nos tecidos, não restabelece a resposta imunológica protetora (Amaral *et al.*, 2009). Estudos mais recentes, como de Siqueira (2010), propõe a utilização de vacinas de DNA, uma vez que oferecem uma série de vantagens econômicas, técnicas e logísticas quando comparadas ao uso de vacinas clássicas.

Mesmo sendo o agente etiológico mais comum, o *F. pedrosoi* mostra-se o menos suscetível às terapias antifúngicas quando comparado com *C. carrionii* ou *P. verrucosa*. (Ameen, 2008). De forma geral, a forma de tratamento escolhida deve ser guiada conforme critérios clínicos, micológicos e histopatológicos frequentemente reavaliados (Queiroz-Telles *et al.*, 2009).

1.1.7 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial é realizado através do exame micológico direto, da identificação do fungo em cultura ou por exames anatomopatológicos. Associados a esses, exames histopatológicos de fragmentos do tecido lesionado podem ser utilizados para a confirmação do diagnóstico, bem como para a avaliação do curso da doença (Queiroz-Telles *et al.*, 2009). As células muriformes apresentam morfologia arredondada, coloração marrom-acastanhadas e podem ser visualizadas isoladamente ou em pequenos grupos (Lacaz *et al.*, 2002). Tais estruturas fúngicas aparecem envoltas por células do hospedeiro, muitas vezes

dentro de células gigantes, estando também presentes em microabscessos situados na interface do tecido epitelial e derme. (Esterre & Queiroz-Telles, 2006)

Histologicamente, os aspectos teciduais são similares a outras micoses profundas nas quais hiperqueratose e hiperplasia pseudoepiteliomatosa são os principais aspectos observados no estrato córneo e na epiderme. Todavia, os padrões histológicos apresentados na CBM variam de acordo com o aspecto da doença (D'Ávila *et al.*, 2002; Queiroz-Telles *et al.*, 2009).

1.2 Fagocitose

O processo de fagocitose é definido como o mecanismo pelo qual as células internalizam e destroem uma variedade de objetos particulares, incluindo micro-organismos, células mortas e debris celulares, maiores que 0,5 μm (Underhill & Goodridge, 2012; Aderem & Underhill, 1999). Células fagocíticas estão envolvidas em inúmeros processos biológicos, incluindo o reconhecimento e controle de patógenos invasores (Kerrigan & Brown, 2009). A internalização ocorre através de uma série de passos: inicialmente a partícula interage com a superfície celular; ocorre a polimerização da actina, que leva a extensão do pseudópodo ao redor da partícula, que é completamente engolfada pela célula; e posteriormente a actina é despolimerizada, permitindo assim que ocorra a maturação do fagossomo através de eventos transportadores via membrana (Aderem & Underhill, 1999). A fagocitose é comumente desencadeada por receptores especializados na superfície os quais reconhecem diretamente estruturas das membranas dos organismos ou interage indiretamente com padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) solúveis, sistema complemento e/ou proteínas surfactantes (Aderem & Underhill, 1999).

Ibrahim-Granet *et al.* (2003) analisaram a fagocitose de conídeos não opsonizados de *Aspergillus fumigatus*, e descobriram que a internalização de esporos em repouso de *A. fumigatus* por macrófagos pode ser bloqueada por citocalasina D, por conseguinte requer uma reorganização do sistema de microfilamentos. Estes dados foram confirmados por Luther *et al.* (2008) que demonstraram que a internalização de conídeos de *A. fumigatus* é acompanhada pela formação maciça de estruturas ricas em F-actina. A fagocitose do *F. pedrosoi* pelos macrófagos é inibida pela exposição de α -manana, com modulação negativa da expressão de moléculas MHC-II e CD80 (Hayakawa *et al.*, 2006). Silva *et al.*, (2007) demonstraram que células de Langerhans podem internalizar conídeos de *F. pedrosoi* com inibição da diferenciação de conídeos em hifa. No entanto, a presença do conídio dificulta a maturação das células de Langerhan, com menor expressão de CD40 e B7-2.

Os fatores que controlam a cinética da fagocitose e maturação do fagossomo não são compreendidos completamente, mas aparentemente são regulados durante a ingestão fúngica (Brown, 2011). Apesar da função dos TLRs na maturação do fagossomo ser controversa (Yates & Russell, 2005), há evidências de que os mesmos influenciam a fagocitose fúngica, e isto pode ter uma ligação com a indução de via de autofagia (Sanjuan *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007). Foi demonstrado que macrófagos primários de camundongos nocautes para TLR2 apresentam uma redução da translocação de LC3 em resposta ao zymosan (Sanjuan *et al.*, 2007).

Apesar dos receptores que desencadeiam a resposta fagocítica variarem, o processo culmina na formação de um fagossomo, o qual sofre uma série de modificações bioquímicas convertendo-se em uma potente organela microbicida (Flannagan *et al.*, 2012). Dentre estas modificações bioquímicas, em revisão realizada por Flannagan *et al.*, (2012) destaca-se a GTPase Rab5 por ser vital no recrutamento de fagossomos

primários, Rab7 no processo de finalização da maturação, além de fatores adicionais como componentes estruturais dos fagossomas tardios, por exemplo LAMP. Outras alterações, como a acidificação, torna o fagossomo altamente oxidativo e enriquecido com enzimas hidrolíticas que ultimamente degradam seu conteúdo (Flannagan *et al.*, 2012). Estes mecanismos já foram em partes elucidados para alguns patógenos tais como *A. fumigatus* (Boterrel *et al.*, 2008; Henriet *et al.*, 2013). Por fim, fagócitos que são células apresentadoras profissionais também podem apresentar antígenos a células linfóides derivados da internalização de partículas, possuindo assim um papel essencial na iniciação da resposta imune adaptativa. Todavia dados a respeito deste papel no processo de desenvolvimento da infecção por *F. pedrosoi* ainda são escassos.

1.3 Receptores do tipo Toll

A interação entre TLRs e PRRs, de uma maneira sinérgica ou antagônica com agonistas fúngicos, pode resultar em diferentes resposta efetoras (Th1, Th2 e Th17) e regulatórias (Treg), e normalmente determina a evolução da doença. Por exemplo, leveduras de *P. brasiliensis* aparentemente são reconhecidas por TLR2 e TLR4, resultando em um aumento na capacidade fagocítica e secreção de NO (Calich *et al.*, 2008).

Componentes de parede fúngica são considerados a principal fonte de PAMPs reconhecidos por PRRs em células de mamíferos (Latje, 2010). Os três principais constituintes de parede, encontrados em fungos de importância médica são: β -glicana, quitina e manana (Romani, 2011). A interação entre PAMPs e PRRs leva a ativação das células do sistema imune, e subsequentemente a produção de mediadores utilizados para

eliminação de patógenos invasores e controle da resposta imune adaptativa (Calich *et al.*, 2008).

A interação entre fungos intactos e os fagócitos do hospedeiro é complexa, envolvendo múltiplos PRRs (Brown, 2011). Os receptores TLR e Dectina-1 estão envolvidos no reconhecimento de diversos fungos, e sugere-se que receptores específicos são requeridos para o reconhecimento de distintos organismos. Por exemplo, a Galectina-3 cuja qual permite a fagocitose discriminada entre *Candida Albicans* e leveduras não patogênicas (Jouault *et al.*, 2003). Netea *et al.*,(2006) demonstraram que o reconhecimento de *C. albicans* por macrófagos/ monócitos envolve um reconhecimento múltiplo dos receptores TLR-4, TLR-2, Dectina-1 e receptor de manose.

Reconhecimento do fungo através do receptor TLR2, que heterodimeriza com TLR1 ou TLR6, TLR4 e TLR9, direciona a indução de numerosas quimiocinas/ citocinas. Camundongos deficientes no receptor adaptador Myd88 são altamente susceptíveis a infecção por *C. albicans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *A. fumigatus* e *C. neoformans*, apesar de alguns defeitos no receptor de IL-1 β provavelmente contribuir para este fenótipo (Bellocchio *et al.*, 2004; Calich *et al.*, 2008; Poeck & Ruland, 2010) Entretanto o que é menos evidente na literatura refere-se ao papel individual dos receptores TLR na imunidade antifúngica, assim como há uma literatura contraditória para a maioria dos TLR no reconhecimento de patógenos fúngicos (Calich *et al.*, 2008).

Em estudo realizado por Brown *et al.* (2003) foi demonstrado que a Dectina-1 é um receptor essencial na internalização de partículas de zymosan assim como de leveduras vivas de *Candida albicans* e *Saccharomyces Cerevisae*. Foi demonstrado que macrófagos ativados com LPS, ligante de TLR-4, exibiram um aumento da adesão celular, motilidade e macropinocitose, processos cujo os quais provavelmente

contribuem amplamente para a ligação e internalização de microorganismos (Underhill & Goodridge, 2012). Recentemente têm sido demonstrado que o reconhecimento de galactomanana ou β 1,3 glicana por receptores específicos DC- SIGN e dectina-1 desencadeiam a internalização de conídeos por *A. fumigatus* (Luther *et al.*, 2007, Gomes, *et al.*, 2004).

Entretanto estudos que relacionam a importância dos receptores TLR no processo da internalização e reconhecimento de *F. pedrosoi* ainda são escassos. *F. pedrosoi* é reconhecido por receptores de lectina do tipo C, entretanto este reconhecimento não é suficiente para induzir uma resposta protetora (Souza *et al.*, 2011). Dados obtidos por Yamano (2008) sugerem que a resposta ao fungo é diferente entre camundongos Balb/c e C57BL/6, diferindo também a resposta de um mesmo tipo de macrófago para cada forma fúngica, sendo as células muriformes aparentemente mais imunogênicas que os conídeos.

A interação entre os fagócitos e o *F. pedrosoi* é complexa, possuem muitos pontos não elucidados, e esta interação é responsável na maioria das vezes para a progressão e cronificação da doença.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi:

Analisar a participação de alguns receptores de reconhecimento padrão dos macrófagos infectados com diferentes formas fúngicas de *F. pedrosoi* e estimulados com diferentes agonistas

As metas para atingir o objetivo foram:

- Realização de ensaios de fagocitose com ou sem estimulação prévia com agonistas dos receptores TLR4, TLR2 e Dectina-1 para calcular o IF de conídeos e células muriformes em diferentes tempos
- Análise da interferência da acidificação no processo de morte celular das formas patogênica (CM) e infectante (conídeos) de *F. pedrosoi*
- Realização de ensaios de viabilidade fúngica
- Quantificação da UFC relativa para análise do papel fungistático e ou/ fungicida do macrófago após a sua estimulação.
- Avaliar o papel dos lipídeos no processo de ativação dos macrófagos
- Identificar quais citocinas são secretadas no sobrenadante das culturas através da técnica de Elisa

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos Balb-C (*Mus musculus*) fêmeas e C57Bl/6, com 6 a 12 semanas de idade. Animais nocautes para TLR4 foram cedidos pelo professor João Santana da Silva da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Em modelo desenvolvido no laboratório, camundongos Balb-c infectados com conídeos de *F. pedrosoi* desenvolveram características mais semelhantes às humanas,. Quando comparado com os em camundongos C57Bl/6, foi observado um maior grau de inflamação, com maior depósito de colágeno no local do processo inflamatório. Para a obtenção de macrófagos peritoneais, foram inoculados 2mL de meio Tioglicolato (BD®) intraperitonealmente e, após 72h, procedeu-se com a eutanásia dos animais por exposição prolongada ao CO₂ em câmara fechada. Com o auxílio de seringa de 10mL, foi procedida a lavagem intraperitoneal com meio RPMI simples (Sigma®)gelado. A seguir, as células foram centrifugadas à 300g e ressuspendidas em meio RPMI suplementado com 2% de Soro Fetal Bovino (SFB) e acrescido de gentamicina na concentração de 80µg/mL. A viabilidade das células foi aferida com a utilização do corante azul de tripan (0,4%) Sigma® de forma que todos os ensaios contaram com mais de 90% de viabilidade celular.

3.2 Diferenciação de macrófagos derivados de medula óssea

Foram retirados os fêmures e tíbias de 5 camundongos C57Bl/6 machos (tipo selvagem) e nocautes para TLR4. Posteriormente ficaram imersos durante 5 min em álcool 70% na placa de petri. A fim de obter o máximo de células da medula, os ossos foram cortados no meio, mantendo-se as epífises intactas. Aplicou-se em cada metade de RPMI não suplementado utilizando seringa de 5mL. As células obtidas do lavado foram

colocadas em tubo Fálcon já contendo meio RPMI, e posteriormente centrifugadas a 300g, 5 min e a temperatura ambiente. O sedimento obtido foi ressuspenso em meio RPMI não suplementado, levemente dissociando os grumos com a pipeta sorológica. As células foram contadas no contador de células Luna cell counter, e a suspensão ajustada para 2×10^6 células por placa de petri contendo 10 ml de RPMI 2% SFB + GM-CSF (20ng/ml). No dia 3 de diferenciação adicionou-se 100% volume de RPMI 2% SFB (10mL/placa) + GM-CSF (20ng/mL). No 6 dia coletou-se 10ml de sobrenadante das placas de petri em um tubo Fálcon, e este foi centrifugado a 300g 5min a temperatura ambiente. Posteriormente as células foram lavadas com RPMI não suplementado, e novamente utilizou-se a centrífuga. O pellet obtido foi ressuspendido em meio RPMI 2% SFB (10ml) +GM-CSF (20ng/ml) e a suspensão devolvida para as placas de petri. Por fim, no oitavo dia retirou-se o sobrenadante contendo células não aderentes e fracamente aderentes com a utilização da solução Tryple TM Express gibco[®]. As placas de petri contendo esta solução foram incubadas durante 20 min na estufa á 37°C, e posteriormente lavadas com RPMI não suplementado. A suspensão obtida foi centrifugada a 300g, 5min a temperatura ambiente e ressuspensa em meio RPMI 2% SFB. A viabilidade das células foi aferida com a utilização do corante azul de tripan (0,4%) Sigma[®], de forma que todos os ensaios contaram com mais de 90% de viabilidade celular.

3.3 Células fúngicas

3.3.1 Obtenção de conídeos

Para a obtenção de conídeos, propágulos virulentos do fungo (obtidos após a passagem sucessiva em animais com posterior recuperação em meio Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) foram cultivados em meio Batata Dextrose (10% batata e 1% dextrose, a

37°C, sob 180 rotações por minuto (RPM)). Camundongos Balb/c machos foram infectados no coxim plantar com 50µl de PBS contendo 1×10^6 propágulos (hifas, conídios e células conidiogênicas) do fungo *F. pedrosoi*, e após 15 dias foi recuperado o fungo a partir da lesão. Após 5 a 15 dias de cultivo, conídeos e hifas filtrados inicialmente em lã de vidro estéril para remoção de grumos e grandes fragmentos de hifa foram submetidos à sucessivas filtrações em *cell strainer* (BD®) de 70µm e 40µm, respectivamente. Células fúngicas foram ressuspendidas em tampão fosfato e centrifugadas à 2000g. O filtrado foi submetido à nova filtração em membrana de 14µm, visando à obtenção de conídeos com mais de 98% de pureza

3.3.2 Obtenção de células muriformes

Para a obtenção de células muriformes, propágulos virulentos do fungo foram cultivados no meio quimicamente definido Butterfield (BF), suplementado com 800µM de DL-propranolol, em pH 2,7, à 37°C por 45 dias sob 180 rpm conforme descrito previamente (Alviano *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 2002). Para a utilização nos ensaios, as células muriformes foram coletadas e lavadas sucessivamente com PBS seguidos de centrifugações à 1000g, visando à completa remoção de qualquer resíduo de meio BF. Por fim, essas células foram filtradas em *cell strainer* de 40µm, para dissociação de grumos e liberação de células muriformes isoladas.

3.4 Ensaio de interação de macrófagos com células fúngicas

Foram realizados os procedimentos abaixo:

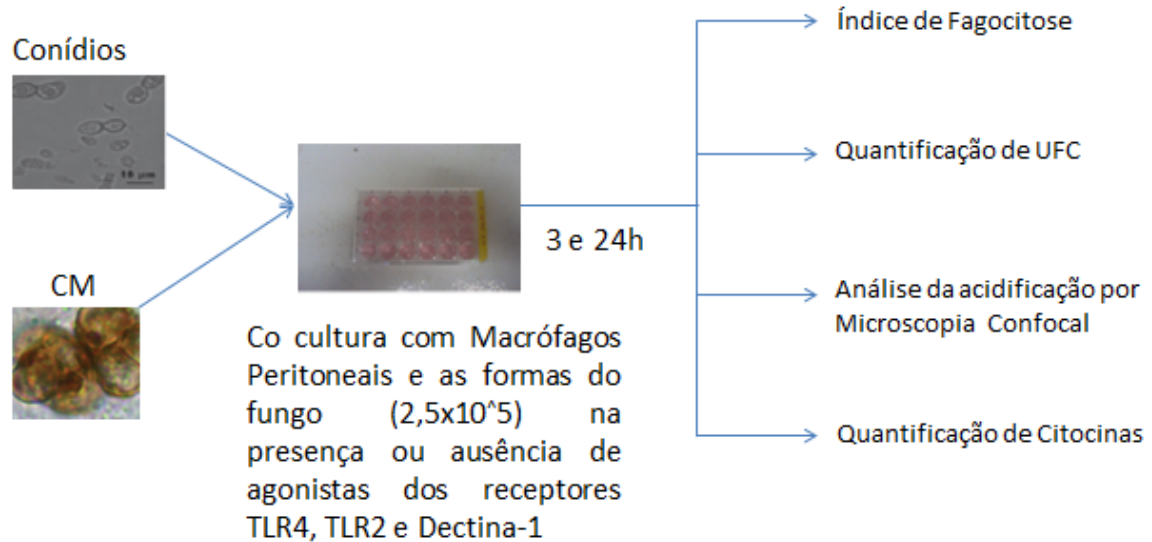


Figura 5. Esquemática dos procedimentos realizados após ensaio de interação de macrófagos com células fúngicas de *F. pedrosoi*

3.4.1 Co-cultivo de macrófagos peritoneais com células fúngicas

Macrófagos peritoneais coletados conforme descrito acima foram incubados em placa de cultura de 48 poços na densidade de $2,5 \times 10^5$ células/poço em estufa a 36°C , com 5% de CO_2 por 24 horas para adesão de macrófagos. Após, os poços foram lavados com RPMI 2% SFB em temperatura ambiente de forma que foram removidas as células não aderentes.

As células foram então estimuladas com LPS ($1\mu\text{g/ml}$), partículas de zymosan ($100\mu\text{g/ml}$), Pam2CSK4 (100ng/ml), agonistas dos receptores de TLR4, Dectina-1 e TLR2/TLR6 respectivamente, ou cloroquina ($10\mu\text{M}$) 30 minutos antes da adição de conídeos ou CM de *F. pedrosoi*, com um índice de infecção de 1:1. Como controle as células foram estimuladas apenas com conídeos ou CM de *F. pedrosoi*. Após 3 horas os

poços foram lavados com tampão fosfato, e posteriormente as células foram reestimuladas com os mesmo estímulos usados previamente, aguardando-se 21h.

3.4.2 Co-cultivo de macrófagos BMDM com células fúngicas

Macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) conforme descrito acima foram incubadas em placas de 96 poços na concentração 4×10^4 cel/poço e estimuladas conforme descrito para ensaio de cocultura de macrófagos peritoneais e células fúngicas acima.

3.4.3 Co-cultivo de macrófagos peritoneais com lipídeo total extraído de células muriformes de *F. pedrosoi*

Macrófagos peritoneais coletados conforme descrito acima foram incubados em placa de cultura de 24 poços na concentração de 5×10^5 células/mL e encubadas em estufa a 36°C, com 5% de CO₂ por 24 horas para adesão de macrófagos. Após, os poços foram lavados com RPMI 2% SFB em temperatura ambiente de forma que foram removidas as células não aderentes. O extrato total de lipídeos isolados de células muriformes de *F. pedrosoi* foram obtidos conforme método descrito por Blight & Dyer (1959). Para isso, lipídeos totais foram extraídos durante 2h com uma solução contendo 5ml de clorofórmio-metanol e água (2:1:0,8 v/v), com agitação intermitente. Após a centrifugação de 5min a 1300rpm, o sobrenadante foi coletado e o sedimento submetido a uma segunda extração lipídica durante 1h. A quantidade de lipídeos totais foi determinada gravitacionalmente.

As células foram então estimuladas com células muriformes de *F. pedrosoi* do fungo (MOI 1:1), separadamente ou em co-cultura com diferentes concentrações (1, 10 e 50µg/ml) de lipídeo total extraído dessa forma fúngica, por diferentes tempos: 6, 12, 24 e 48h. Como controle positivo, utilizou-se LPS (500ng/mL) e interferon γ (100U/mL).

3.5 Quantificação das unidades formadoras de colônias

Após ensaio de co-cultura com macrófagos peritoneais nos tempos de 3 e 24h as células foram lisadas com solução SDS 0,05%, acrescentando-se 100µL por poço em triplicata. Posteriormente realizou-se uma diluição seriada na proporção de 1:1000 de modo que o lisado foi plaqueado em placas de meio SDA, e as colônias contadas após 5 dias.

3.6 Índice de fagocitose

Após ensaio de co-cultura das células de linhagem *in vivo* de camundongos Balb/c foi calculado o índice de fagocitose para os tempos de 3 e 24h. As células foram lavadas com meio RPMI 2% para remoção das células fúngicas não fagocitadas, posteriormente as células foram coradas com o conjunto de corantes para coloração diferencial rápida em hematologia Instant- Prov New Prov. O número de células fúngicas internalizadas, 100 macrófagos por triplicata, foi avaliado em microscópio invertido (32x). O índice foi calculado através da média numérica de células fagocitadas multiplicado pela porcentagem das células internalizadas pelos fagócitos.

Índice de Fagocitose= Porcentagem da média de fungos por Macrófagos

$$\text{Índice de Fagocitose relativo} = \frac{\text{IF 24h}}{\text{Média IF 3h}} \times 100$$

3.7 Microscopia confocal

Foram colocadas lamínulas estéreis em uma placa de 24 poços para posterior análise em microscópio confocal. Macrófagos peritoneais coletados conforme descrito acima foram incubados na densidade de $2,5 \times 10^5$ células/poço, e estimulados com LPS (1µg/ml), partículas de zymosan (100µg/ml), o inibidor de acidificação, cloroquina (10 µM) 30 minutos anteriormente a interação com conídio de *F. pedrosoi*, MOI 1:1. As células fúngicas foram ressuspensas em uma solução de Uvitex, um corante fluorescente que se liga á quitina em paredes fúngicas, a 1% durante 1 hora, em um Fálcon coberto com papel alumínio a 37°C. Posteriormente foram lavadas 2 vezes com PBS 1x, e centrifugadas a 1.000g durante 5 min. O pellet obtido foi ressuspendido em uma nova alíquota de meio RPMI 2% SFB, e a seguir as células *in vivo* estimuladas. Faltando 2h para o tempo de interação, o meio de cultura foi substituído por um novo contendo o fluoróforo LysoTracker® Deep Red (molecular probes®) na concentração final de 50nm. Posteriormente o meio de cultura foi substituído por meio RPMI 2% SFB, e as lamínulas preparadas para leitura no microscópio.

3.8 Dosagem de citocinas e mediadores solúveis

As citocinas MCP1, IL-6, IL-12 produzidas pelas células peritoneais foram quantificadas pelo método imunoenzimático (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay* -

ELISA) utilizando-se os kits comerciais fluorométricos BD Pharmigen® ou da eBioscience®. O nível absoluto de citocina presente no sobrenadante da cultura descrita acima foi calculado com base na curva padrão fornecida por cada o kit comercial.

A dosagem de NO foi quantificada pela Reação colorimétrica de Griess, contendo NEED 0,1% (N-(1-Naphthyl) ethyl-enedinamine – SIGMA Chemical, USA) e sulfanilamida 1% diluída em ácido orto-fosfórico (H₃PO₄) a 5%. As amostras foram lidas em leitor de ELISA com filtro de 540nm.

3.9 Análise estatística

Para determinar as diferenças entre os grupos experimentais foi utilizada a análise da variância, seguida pelo método Bonferroni *post-tests* (pós teste), realizado no programa estatístico GraphPad Prism, versão 6.0, GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA. Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Análise da capacidade fagocítica e microbicida de macrófagos murinos na interação com conídeos de *F. pedrosoi*

Para analisar a capacidade de diferentes moléculas estimuladoras dos PRRs dos macrófagos durante o processo da fagocitose, macrófagos peritoneais foram previamente estimulados e depois infectados por 3h com conídeos do *F. pedrosoi*, conforme descrito em materiais e métodos. Macrófagos não estimulados apresentaram um índice de fagocitose superior após 24h de incubação.

Ao analisar a influência dos agonistas de TLR2/TLR6, TLR4 e Dectina-1 na interação de macrófagos peritoneais com conídeos de *F. pedrosoi*, observou-se que no período de 3h de interação houve um maior índice de internalização nas células previamente estimuladas com LPS e Pam2CSK4 (Figura 6A, F e G), agonistas dos receptores TLR4 e TLR2, respectivamente. Quando os macrófagos foram estimulados com zymosan, houve uma diminuição no IF em 3h de infecção, que se manteve baixa após 24h (Figura 6 A). Não houve diferença significativa quando macrófagos foram estimulados simultaneamente com zymosan e LPS (Figura 6 A, H).

Considerando que o pH é um importante fator no processo da fagocitose, analisamos a sua influência no IF após 24h de infecção dos macrófagos com a forma infectante da cromoblastomicose. Observou-se que ao incubar previamente os macrófagos com os estímulos na presença do inibidor de acidificação, a cloroquina, e os conídeos houve um aumento no índice de fagocitose (Figura 6. C, B e D), no período de 3h de interação, que se manteve alto durante o período avaliado.

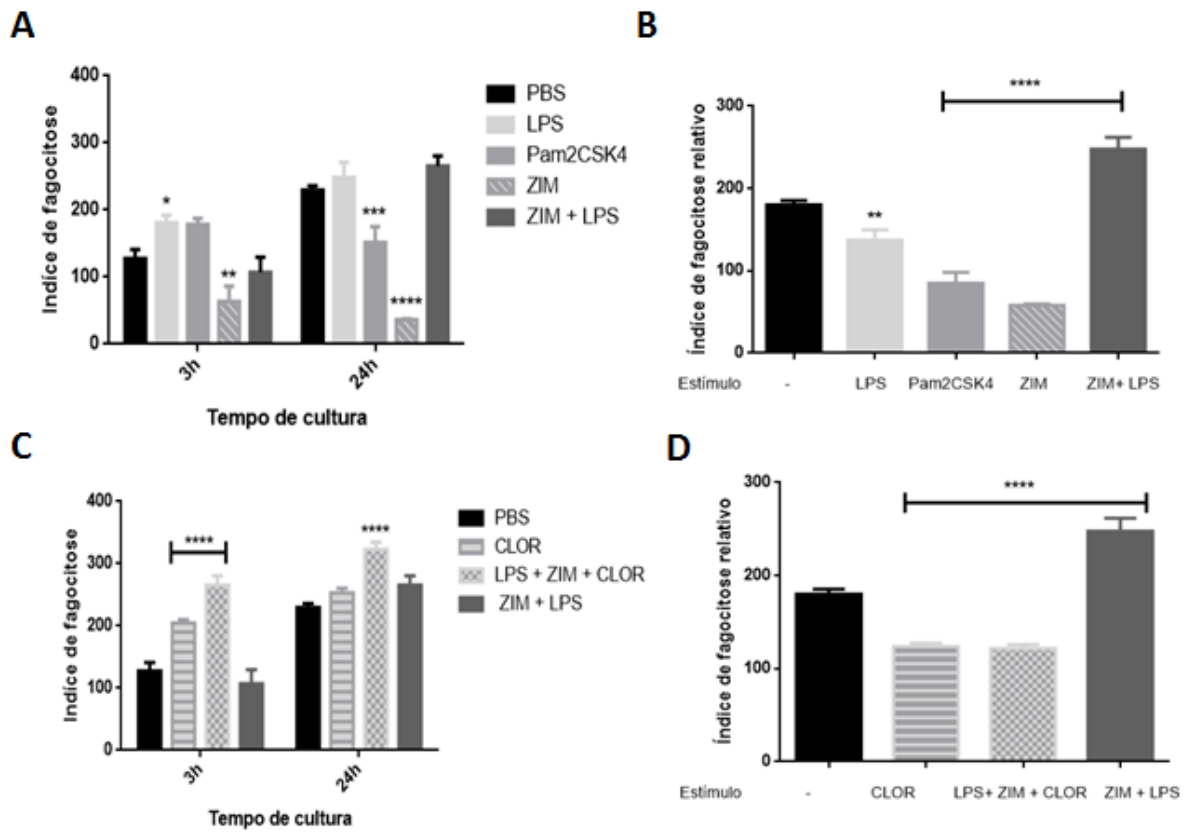


Figura 6. Índice de fagocitose na interação de macrófagos previamente estimulados com agonistas de TLR2/TLR6, TLR4, Dectina-1 ou inibidor de acidificação com conídeos de *F. pedrosoi*. Macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c previamente estimulados com (A) ZIM (100µg/ml), LPS (1µg/ml), ZIM+LPS, Pam2CSK4(100ng/ml) ou cloroquina (10µM) (B), foram infectados com conídeos MOI (1:1) de *F. pedrosoi*. Após 3 e 24h de interação foi calculado o índice de fagocitose e o IF relativo (B,D). O índice de fagocitose relativo foi calculado dividindo-se o IF de 24h pelo IF de 3h x 100.

A respeito da influência da acidificação na viabilidade fúngica em interação de macrófagos peritoneais com conídeos de *F. pedrosoi*, observou-se que o valor da UFC relativa de fungos previamente estimulados com cloroquina em comparação com o grupo controle foi significativamente menor (Figura 7, D) onde o macrófago apresentou um papel fungicida nestas condições. Com estes resultados também podemos inferir que a forma fúngica infectante de *F. pedrosoi* se adapta e apresenta um bom crescimento em meio ácido. A acidificação é demonstrada na figura 8, onde macrófagos previamente

estimulados com LPS (Figura 7 C), ZIM e LPS (Figura 7 D) e tratados com cloroquina (7E e F) apresentaram um padrão diferente de acidificação do fagolisossomo.

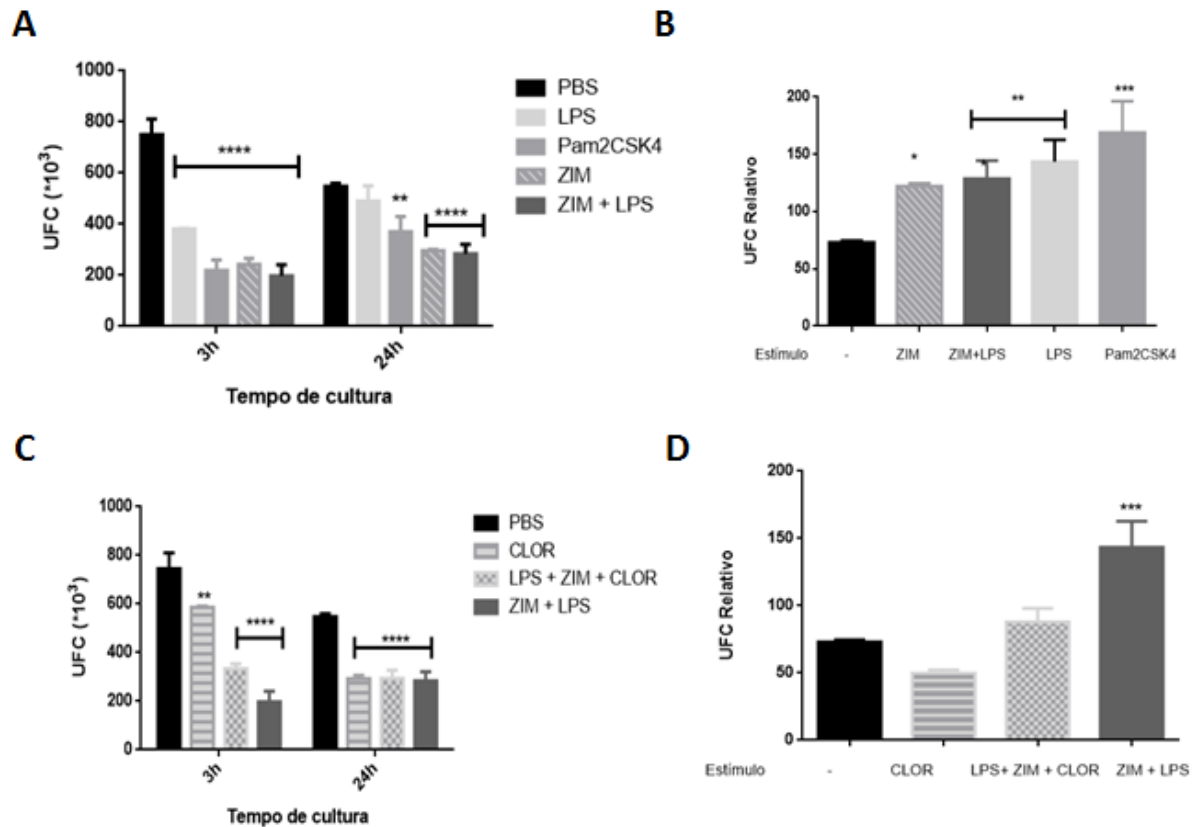


Figura 7. Quantificação da UFC e UFC/ relativa na interação de macrófagos previamente estimulados com agonistas de TLR2/TLR6, TLR4, Dectina-1 ou inibidor de acidificação com conídeos de *F. pedrosoi*. (A) Macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c previamente estimulados com ZIM (100µg/ml), LPS (1µg/ml), ZIM+LPS e Pam2CSK4(100ng/ml), (C) cloroquina (10µM), LPS + ZIM + Cloroquina foram infectados com conídeos MOI(1:1) de *F. pedrosoi*, após 3 h e 24h de interação foi quantificado a UFC(A, C) e a UFC relativa (B, D). UFC relativo foi calculado dividindo-se a UFC de 24h pela UFC de 3h x 100 *p< 0,05 comparado com macrófagos estimulados somente com o fungo.

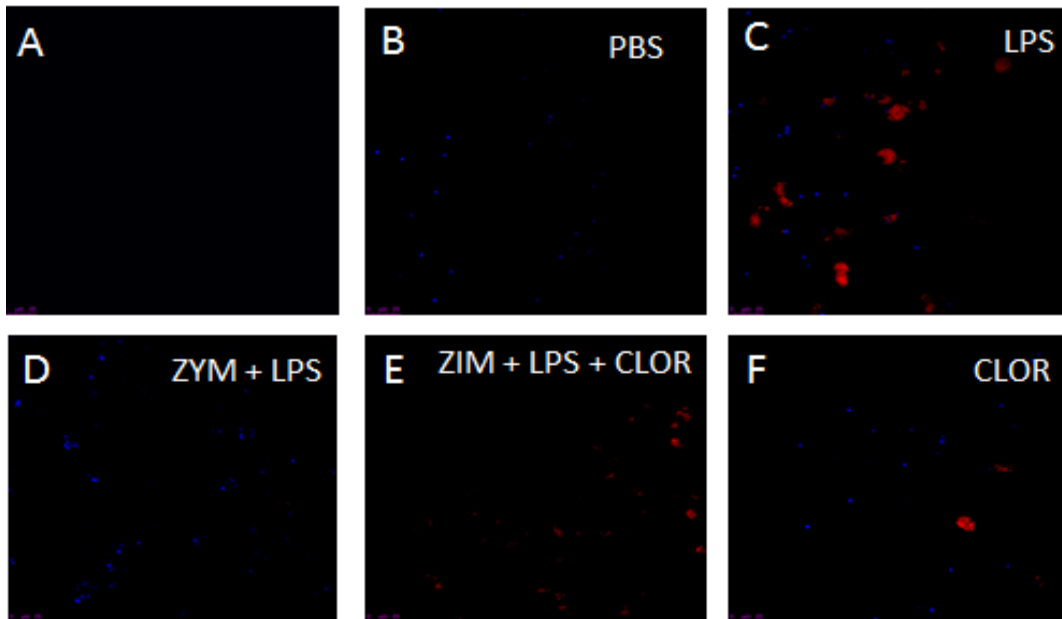


Figura 8. Influência da acidificação do fagolisossomo na capacidade fagocítica na interação de macrófagos com conídeos de *F. pedrosoi*. Macrófagos peritoneais previamente estimulados com LPS (C), ZIM + LPS (D) e cloroquina (F) foram incubados com conídeos de *F. pedrosoi* marcados com Uvitex 1% (Azul). Faltando 2h para o tempo de interação o meio de cultura foi substituído por um novo contendo o fluoróforo LysoTracker® Deep Red (molecular probes®) na concentração de 50nm. Posteriormente o meio de cultura foi substituído pelo meio RPMI 2% SFB e as lâminas preparadas para leitura no microscópio confocal. (A) Controle negativo, (B) Macrófago estimulado somente com conídio de *F. pedrosoi*. (E) Macrófagos previamente estimulado com ZIM + LPS + CLOR.

4.1.1 Co-cultura de conídeos de *F. pedrosoi* com macrófagos BMDM deficientes para TLR4

Como a estimulação de diferentes PRRs repercutiu na internalização e eliminação do fungo em sua forma infectante, utilizamos animais deficientes para o receptor TLR-4. No ensaio de interação de conídeos com macrófagos BMDM deficientes para TLR4, observou-se que houve uma redução na viabilidade fúngica com o tratamento do inibidor de acidificação (Figura 9 A, B)

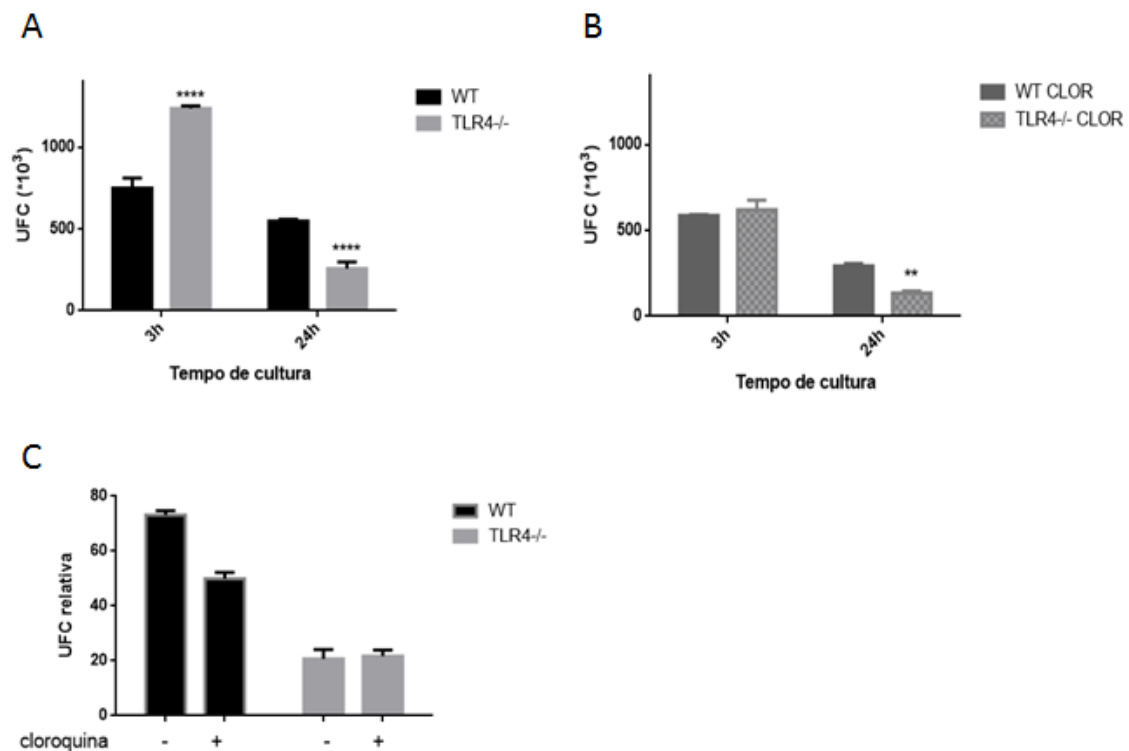


Figura 9. Quantificação da UFC e UFC relativa da interação de conídeos de *F. pedrosoi* com macrófagos C57 selvagens, TLR4^{-/-} previamente estimulados com cloroquina. Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57 selvagens deficientes para TLR4 (A) foram tratados previamente com cloroquina (10 μ M) (B), e infectados com conídeos de *F. pedrosoi* MOI 1:1, após 3 e 24h foi quantificado a UFC (A, B) e a UFC relativa (C). UFC relativo foi calculado dividindo-se a UFC de 24h pela UFC de 3h x 100 p<0,05 comparado com o grupo estimulado somente com o fungo.

4.2 Análise da capacidade fagocítica e microbicida de macrófagos murinos na interação com células muriformes de *F. pedrosoi*

Assim como observado para os conídeos, macrófagos peritoneais são capazes de internalizar células muriformes após 3h de infecção e o IF permanece aumentado significativamente após 24h de cultura. A estimulação dos macrófagos interfere no IF da forma fúngica observada na fase crônica da cromoblastomicose, após 3h e 24h de interação. A estimulação com zymosan ou zymosan + LPS reduziu o IF após 24 (Figura 10, A e B) . A estimulação dos macrófagos com LPS ou Pam2CSK4 não apresentou diferença nos níveis de IF no período avaliado (Figura 10, A, F e I)

A respeito da influência da acidificação na interação com esta forma fúngica, observou-se que ocorre um ligeiro aumento no IF do grupo incubado com a cloroquina e uma diminuição do IF nos grupos estimulados com LPS e zymosan, mesmo na presença da cloroquina (Figura 10 B).

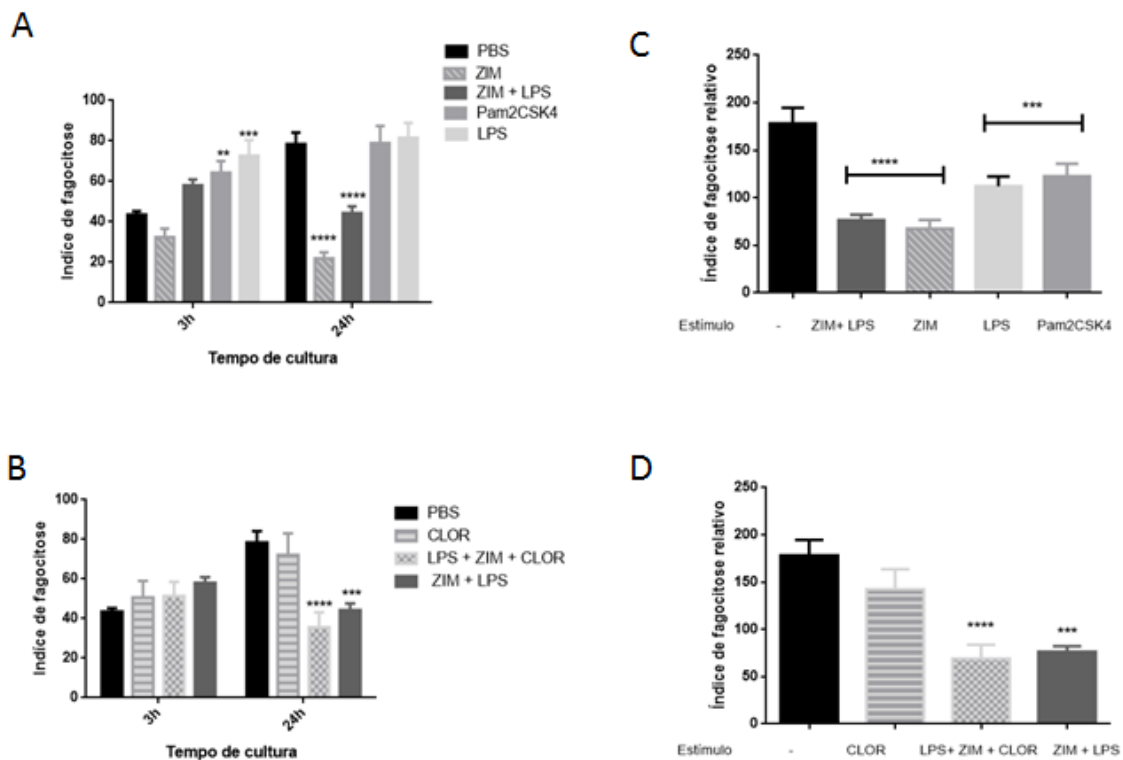


Figura 10. Índice de fagocitose na interação de macrófagos previamente estimulados com agonistas de TLR2/TLR6, TLR4, Dectina-1 ou inibidor de acidificação com células muriformes de *F. pedrosoi*. (A) Macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c previamente estimulados com ZIM (100 μ g/ml), LPS (1 μ g/ml), ZIM+LPS, Pam2CSK4(100ng/ml) ou cloroquina (10 μ M) (B), foram infectados com células muriformes MOI(1:1) de *F. pedrosoi*, Após 3 e 24h de interação foi calculado o índice de fagocitose (A,B) e o IF relativo (C,D). O índice de fagocitose relativo foi calculado dividindo-se o IF de 24h pelo IF de 3h x 100.

Ao analisar a influência dos estímulos utilizados na viabilidade fúngica em interação de células muriformes de *F. pedrosoi*, observou-se que após 24h de incubação

com os macrófagos todos os estímulos separadamente foram capazes de reduzir a carga fúngica, com exceção do Zymosan e LPS (figura 11 A e B).

A ausência de pH ácido não aumentou significativamente a morte das células muriformes, cujo CFU relativo estava similar ao grupo não estimulado/tratado. No entanto, os macrófagos estimulados com LPS e zymosan, e tratados com cloroquina aumentaram a capacidade de destruir as CMs. (Figura 11, D).

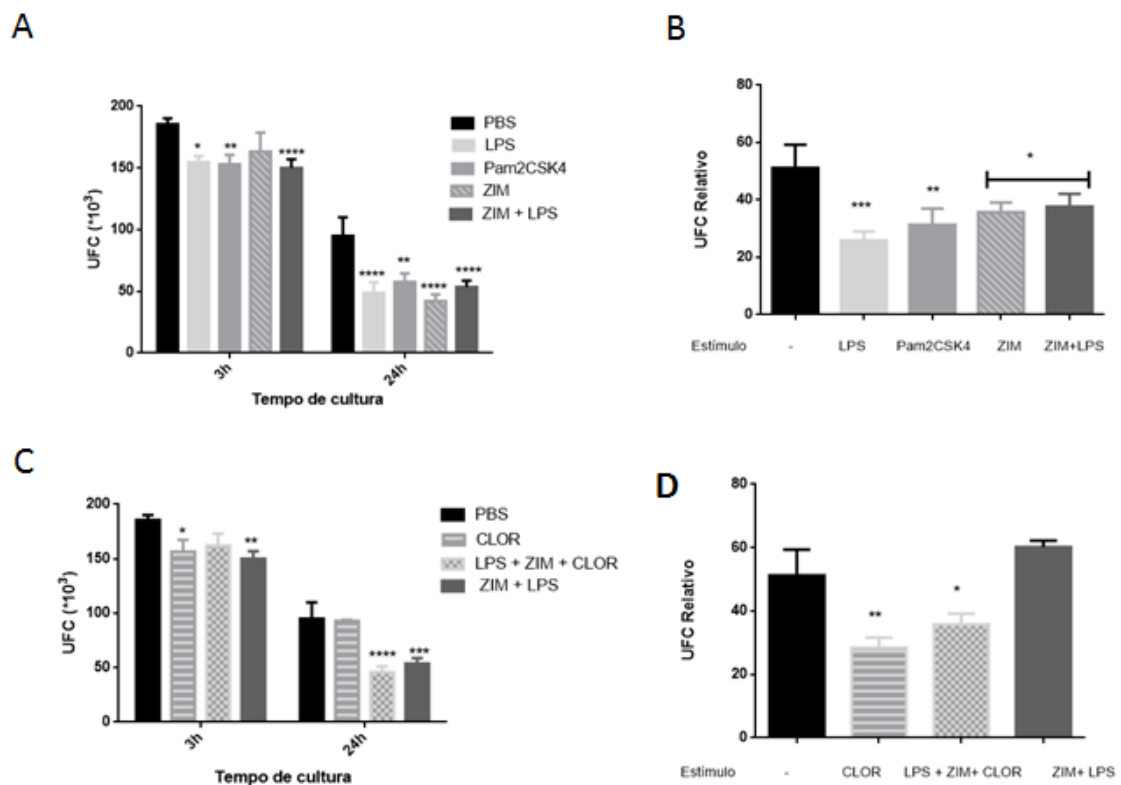


Figura 11. Quantificação da UFC e UFC/ relativa na interação de macrófagos previamente estimulados com agonistas de TLR2/TLR6, TLR4, Dectina-1 ou inibidor de acidificação com células muriformes de *F. pedrosoi*. (A) Macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c previamente estimulados com ZIM (100 μ g/ml), LPS (1 μ g/ml), ZIM+LPS e Pam2CSK4(100ng/ml), (C) cloroquina (10 μ M), LPS + ZIM + Cloroquina foram infectados com células muriformes MOI(1:1) de *F. pedrosoi*, após 3 h e 24h de interação foi quantificado a UFC(A, C) e a UFC relativa (B, D). UFC relativo foi calculado dividindo-se a UFC de 24h pela UFC de 3h x 100 *p< 0,05 comparado com macrófago não estimulados

4.2.1 Co-cultura de células muriformes de *F. pedrosoi* com macrófagos BMDM deficientes para TLR4

Ao contrário do observado em ensaio de interação com conídeos de *F. pedrosoi* e macrófagos peritoneais, o tratamento de acidificação em ensaio de co-cultura com a forma patogênica do fungo não repercutiu fortemente na eliminação do mesmo. Este fato foi corroborado em ensaio de interação utilizando-se células BMDMs nocautes para (Figura 12).

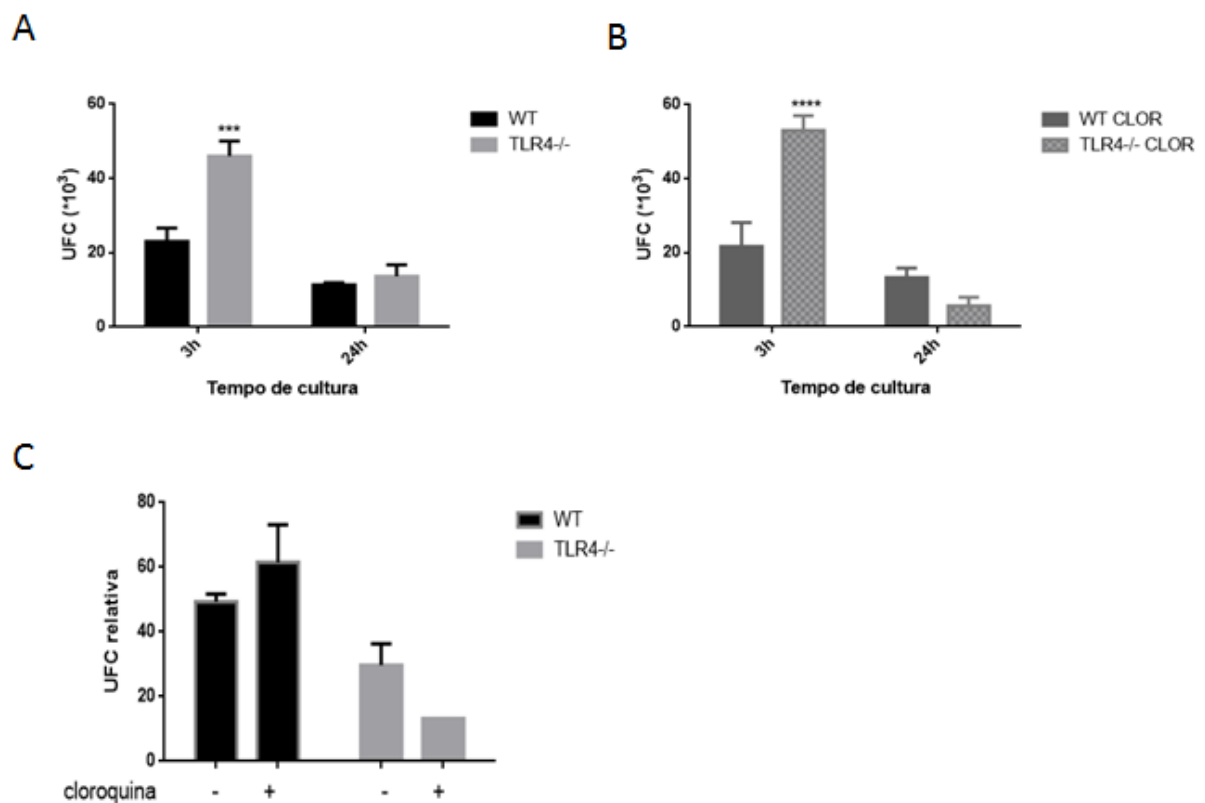


Figura 12. Quantificação UFC e UFC relativa da interação de células muriformes de *F. pedrosoi* com macrófagos C57 selvagens. TL4^{-/-} previamente estimulados com cloroquina. Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57 selvagens deficientes para TLR4 (A) foram tratados previamente com cloroquina (10 μ M) (B), e infectados com conídeos de *F. pedrosoi* MOI 1:1, após 3h e 24h foi quantificado a UFC (A, B) e a UFC relativa (C). A UFC relativa foi calculada dividindo-se a UFC de 24h pela UFC de 3h x 100 *p <0,05 comparado ao macrófago estimulado somente com o fungo.

4.3 Dosagem de citocinas da co-cultura de macrófagos peritoneais com diferentes formas fúngicas de *F. pedrosoi*

Nossos resultados demonstraram um perfil de produção diferenciado da produção de citocinas induzidas por hifas, conídeos e CM de *F. pedrosoi* em diferentes tempos de interação com macrófagos peritoneais. Nenhuma das formas estimularam a produção da citocina IL-12 (Figura 13). E células muriformes aparentaram ser mais imunogênicas que os conídeos, uma vez que apenas essas induziram uma produção significativa de IL-6 e TNF- α (Figura 14, 15).

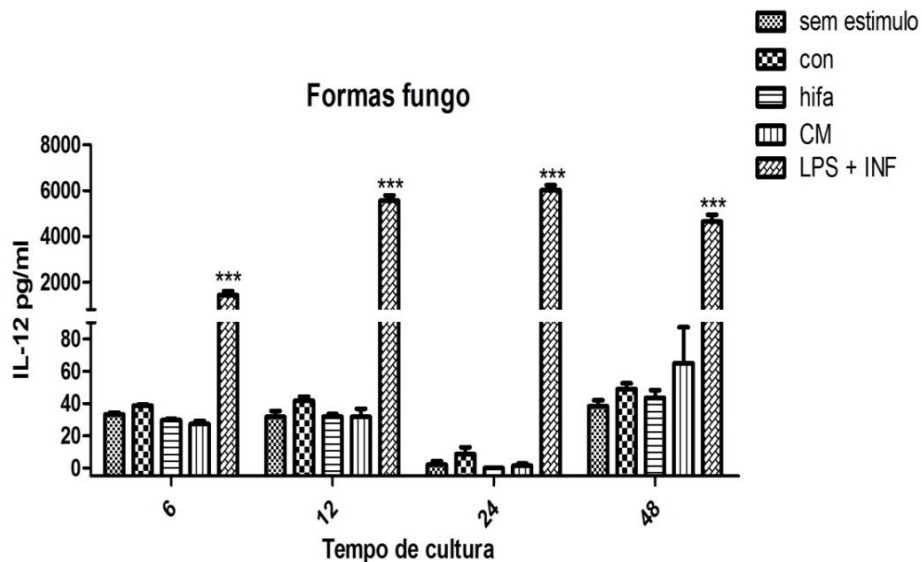


Figura 13. Quantificação da produção da citocina IL-12 da co-cultura de macrófagos peritoneais com hifas, conídeos e CM de *F. pedrosoi*, MOI (1:1) nos períodos de 6, 12, 24 e 48h de interação. Macrófagos foram estimulados com células muriformes (CM), hifas e conídeos (CON) de *F. pedrosoi* (MOI 1:1). Após o tempo de interação de 6, 12, 24 e 48h, o sobrenadante foi coletado e a citocina IL-12 quantificada utilizando-se o método Elisa. Como controle positivo utilizou-se LPS (500ng/mL) e interferon γ (100U/mL).

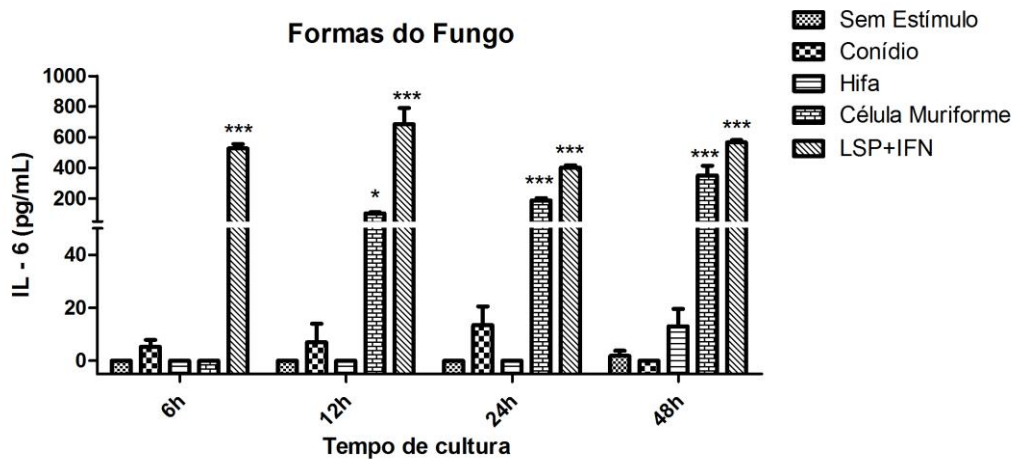


Figura 14. Quantificação da produção da citocina IL-6 da co-cultura de macrófagos peritoneais com hifas, conídeos e CM de *F. pedrosoi* no período de 6, 12, 24 e 48h de interação. Macrófagos foram estimulados com células muriformes (CM), hifas e conídeos (CON) de *F. pedrosoi* (MOI 1:1). Após o tempo de interação de 6,12, 24 e 48h o sobrenadante foi coletado e a citocina IL-6 quantificada pelo método Elisa. Como controle positivo, utilizou-se LPS (500ng/mL) e interferon γ (100U/mL).

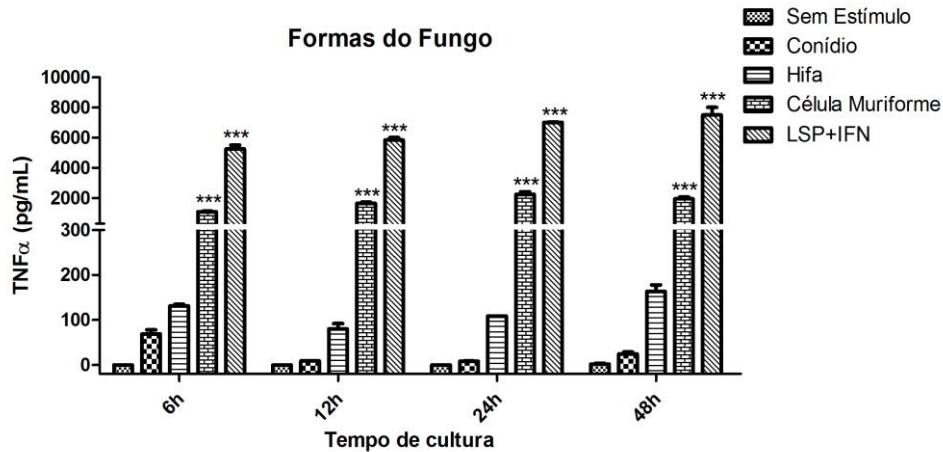


Figura 15. Quantificação da produção da citocina TNF- α da co-cultura de macrófagos peritoneais com hifas, conídeos e CM de *F. pedrosoi* no período de 6, 12, 24 e 48h de interação. Macrófagos foram estimulados com células muriformes (CM), hifas e conídeos (CON) de *F. pedrosoi* (MOI 1:1). Após o tempo de interação de 6,12, 24 e 48h o sobrenadante foi coletado e a citocina TNF- α quantificada pelo método Elisa. Como controle positivo, utilizou-se LPS (500ng/mL) e interferon γ (100U/mL).

4.4 Dosagem de citocinas da co-cultura de macrófagos peritoneais com lipídeo total extraído da célula muriforme de *F. pedrosoi*

Uma outra possibilidade de estimulação dos macrófagos são os lipídeos presentes na parede celular dos fungos. Macrófagos estimulados com diferentes concentrações de lipídeos (Figura 16, 17, 18 e 19). Para avaliar se a interação de componentes da CM é capaz de modular negativamente a ativação dos macrófagos, lipídeos da parede celular do CM foram extraídos, macrófagos foram estimulados previamente a infecção com CM e citocinas foram dosadas.

Neste modelo experimental não observamos modulação dos macrófagos pelos lipídeos em nenhuma das concentrações analisadas quanto a produção de citocinas MCP-1, IL-6 e IL-12 (Figura 16, 17 e 18, respectivamente) e óxido nítrico. (Figura 19).

Nenhuma das concentrações de lipídeos utilizadas neste trabalho foram capazes de estimular ou inibir a produção de citocinas (Figura 16, 17, 18).

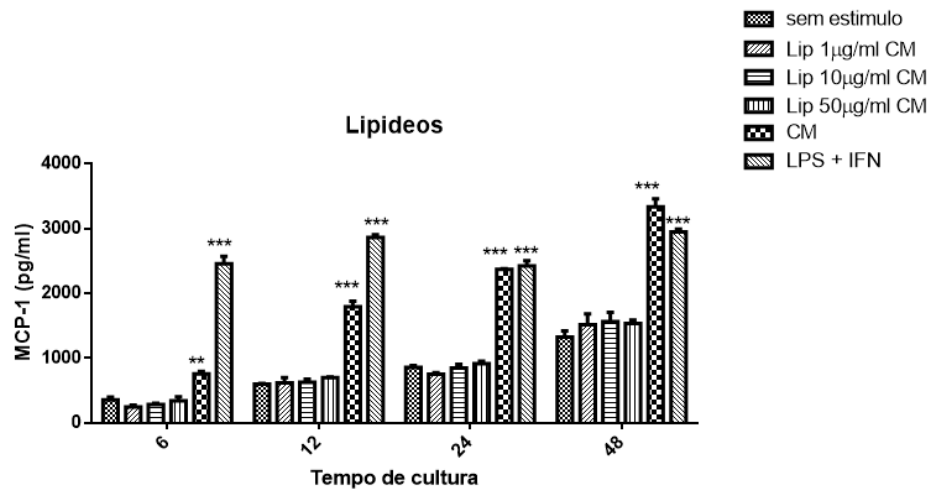


Figura 16. Dosagem da citocina MCP-1 do sobrenadante da co-cultura de macrófagos peritoneais e lipídeo total extraído da célula muriforme de *F. pedrosoi* em diferentes concentrações (1,10,50µg/ml) e em diferentes tempos de interação (6, 12, 24 e 48h). Macrófagos foram estimulados com células muriformes (CM) de *F. pedrosoi* (MOI 1:1), separadamente ou em co-cultura com diferentes concentrações (1, 10 e 50µg/ml) de lipídeo total extraído dessa forma fúngica. Após os tempos de interação de 6, 12, 24 e 48h, o sobrenadante foi coletado e a citocina MCP-1 quantificada pelo método Elisa. Como controle positivo, utilizou-se LPS (500ng/mL) e interferon γ (100U/mL)

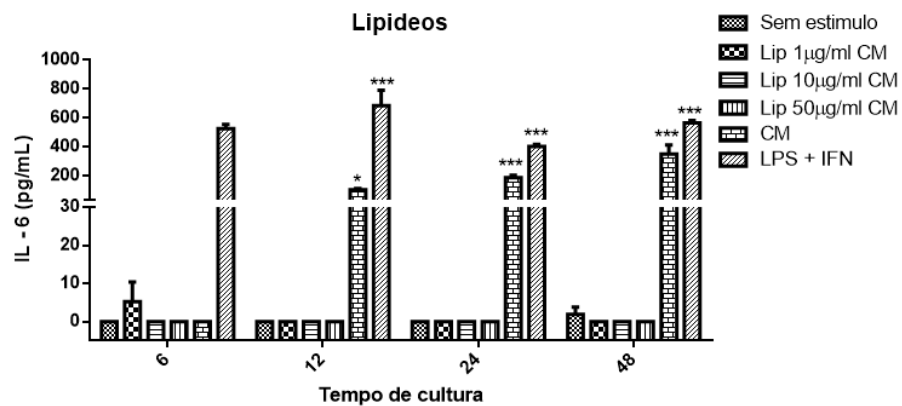


Figura 17. Dosagem da citocina IL-6 do sobrenadante da co-cultura de macrófagos peritoneais e lipídeo total extraído da célula muriforme de *F. pedrosoi* em diferentes concentrações (1,10,50µg/ml) e em diferentes tempos de interação (6, 12, 24 e 48h). Macrófagos foram estimulados com células muriformes (CM) de *F. pedrosoi* (MOI 1:1), separadamente ou em co-cultura com diferentes concentrações (1, 10 e 50µg/ml) de lipídeo total extraído dessa forma fúngica. Após os tempos de interação de 6, 12, 24 e 48h, o sobrenadante foi coletado e a citocina IL-6 quantificada pelo método Elisa. Como controle positivo, utilizou-se LPS (500ng/mL) e interferon γ (100U/mL).

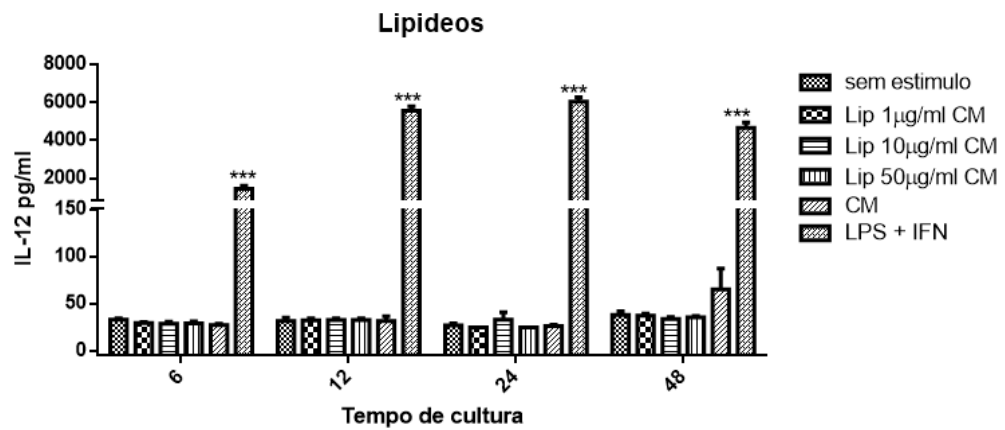
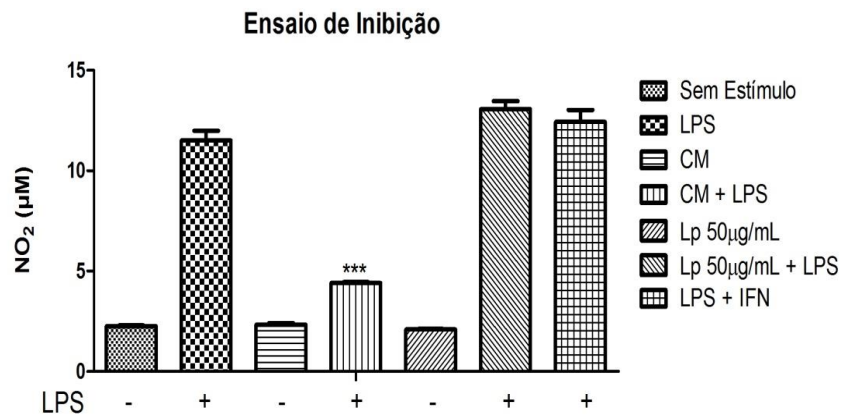


Figura 18 Dosagem da citocina IL-12 do sobrenadante da co-cultura de macrófagos peritoneais e lipídeo total extraído da célula muriforme de *F. pedrosoi* em diferentes concentrações (1,10,50µg/ml) e em diferentes tempos de interação (6, 12, 24 e 48h). Macrófagos foram estimulados com células muriformes (CM) de *F. pedrosoi* do fungo (MOI 1:1), separadamente ou em co-cultura com diferentes concentrações (1, 10 e 50µg/ml) de lipídeo total extraído dessa forma fúngica. Após os tempos de interação de 6, 12, 24 e 48h, o sobrenadante foi coletado e a citocina IL-12 quantificada pelo método de Elisa. Como controle positivo, utilizou-se LPS (500ng/mL) e interferon γ (100U/mL).

Os lipídeos também não interferiram na baixa produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais quando infectados com células muriformes (figura 19).



***P<0,001 comparado ao grupo LPS.

Figura 19. Quantificação de NO pela reação de Griess do sobrenadante da co-cultura de macrófagos peritoneais e lipídeo total extraído da célula muriforme de *F. pedrosoi*. Macrófagos foram estimulados com células muriformes (CM) de *F. pedrosoi* (MOI 1:1), separadamente ou em co-cultura com 50µg/ml do lipídeo total extraído desta forma fúngica. Após 24h de interação, coletou-se o sobrenadante e a concentração de óxido nítrico foi determinada pela reação colorimétrica de Griess. Como controle positivo, utilizou-se LPS (500ng/mL) e interferon γ (100U/mL.)

5. DISCUSSÃO

No curso da cromoblastomicose, observa-se diferentes formas do *F. pedrosoi*. após o processo de infecção. Observa-se conídeos ou fragmentos de hifas, que se diferenciam em formas miceliares e posteriormente em células muriformes. Existem alguns trabalhos que evidenciam que o conídeo é mais internalizado que a célula muriforme, é mais imunogênico e induz uma menor taxa de formação de células gigantes (Yamano, 2008; Medeiros *et al* – artigo em preparação). Neste sentido, os fagócitos desempenham papéis distintos e fundamentais para a progressão da doença. A importância dos macrófagos foi demonstrado por Rozental *et al* (1994), que observaram que quando estas células estavam ativadas foram incapazes de eliminar conídeos de *F. pedrosoi*, apesar deles causarem um significativa diminuição na formação de tubo germinativo e de hifas. O *F. pedrosoi* pode ser detectado no citoplasma de células epiteliais e macrófagos tratados com citocalasina, sugerindo que o fungo possui uma grande capacidade invasiva. (Farbiarz *et al.*, 1990; Limongi *et al.*, 1997). O processo de internalização envolve, pelo menos, três etapas distintas, como a adesão entre as células, diapedese e a formação dos endossomos primários. Já é consenso na literatura que macrófagos ativados com LPS aumentavam a adesão celular, contribuindo amplamente para o internalização de micro-organismos O índice de fagocitose em macrófagos peritoneais previamente estimulados com LPS aumentou quando estes foram cultivados com células muriformes e conídeos de *F. pedrosoi*, no tempo de 3h. (Underill e Goodridge, 2012).

Considerando a importância da internalização das diferentes formas do fungo pelos macrófagos, neste presente trabalho tentamos avaliar a importância de alguns ligantes para a internalização do fungo e sua destruição pelos macrófagos. Nossos dados mostraram que os agonistas de TLR4 e TLR2 estimularam os macrófagos a uma maior internalização de conídeos de *F. pedrosoi* após 3h de interação, porém eles não foram capazes de eliminar o

fungo. Conforme demonstrado nos dados de UFC relativa, o fungo proliferou no interior dos macrófagos. A estimulação do receptor de Dectina-1 e TLR-2 pelo zymosan levou a uma menor internalização com 3h e menor índice de fagocitose após 24h, porém os dados de UFC permaneceram muito similares. Estes dados corroboram com o estudo realizado por Souza *et al.*, (2011), que demonstraram que a fase crônica da cromoblastomicose é decorrente do reconhecimento pela resposta imune inata de forma inadequada, e subsequente falha em induzir uma resposta protetora. A internalização por si só não confere proteção ao hospedeiro, é necessário que além dela os macrófagos sejam ativados corretamente.

A estimulação adequada dos leucócitos é capaz de induzir uma resposta protetora. Componentes da parede celular do fungo são capazes de modular esta estimulação. Nobrega *et al.*,(2010) relataram que a fração F2 da parede celular do *F. pedrosoi*, que contem melanina e α -glicana, reduziu os índices de fagocitose por macrófagos peritoneais. Estes autores observaram que houve uma diminuição do número de fagócitos que internalizaram as leveduras e não uma redução do número de leveduras ingeridas pelos mesmos. Estes autores propõem também que a melanina assim como a α -glicana impedem que importantes mecanismos microbicidas sejam ativados, tais como a produção de NO e produção de citocinas envolvidas na ativação da resposta imune celular, que contribuiriam para o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva. Por outro lado, a estimulação com a fração F1, que contem β -glicana e quitina, levou a um aumento na produção de IL-12 e TNF- α . Rappleye *et al.*,(2007) demonstraram que a α -1-3 glicana, presente na camada mais externa da parede celular de leveduras de *Histoplasma capsulatum*, contribuíram significativamente para a patogênese da histoplasmose, uma vez que ocultam as β -glicanas imunoestimulatórias durante a estimulação das células fagocíticas do hospedeiro.

Bocca *et al.*,(2005) descreveram níveis menores de produção de óxido nítrico em macrófagos infectados com conídeos e fragmentos de hifas de *F. pedrosoi* comparados aos macrófagos não estimulado. Estes níveis aumentaram após o tratamento dos macrófagos não infectados com LPS e IFN- γ , entretanto incubação de macrófagos com *F. pedrosoi* impediram a produção de óxido nítrico por LPS e IFN- γ . No presente estudo também foi observado uma inibição de NO pela forma patogênica de *F. pedrosoi*, indicando que assim como observado para outros patógenos e já relatado para literatura de *F. pedrosoi*, o fungo é capaz de inibir a produção de NO.

Em relação às células muriformes, ao contrário do observado para ensaio de interação da forma fúngica infectante de *F. pedrosoi*, macrófagos peritoneais previamente estimulados com agonistas de TLR4 e Dectina-1 exercerem um papel fungicida, uma vez que o fungo não proliferou e houve uma redução da carga fúngica comparado ao grupo controle. Yamano (2008) também analisou a interação de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c e células muriformes de *F. pedrosoi*, e observou que os índices de fagocitose obtidos para conídeos também foram maiores comparados à célula muriforme em todos os tempos observados, entretanto não descreveu quais mecanismos diferenciam na internalização das duas formas do *F. pedrosoi*.

Vários estudos demonstram que o pH ácido, privação de Mn^{2+} ou suplementação de cálcio são importantes para a indução da formação de células muriformes similares ao fungos da cromoblastomicose, como por exemplo, *Wangiella dermatitidis* (Karuppaiyl & Szaniszló, 1997). As células muriformes possuem uma grande quantidade de melanina na sua superfície, sendo possível identifica-la no tecido sem coloração especial. A melanina presente na sua superfície confere proteção ao fungo diante dos mecanismos microbicidas dos macrófagos. Neste trabalho observamos que ao se utilizar a cloroquina, que é um inibidor de acidificação, a internalização dos conídeos aumenta, quando comparado com

os controles, porém a estimulação prévia dos macrófagos não reduziu a viabilidade dos fungos. A interação de células muriformes com macrófagos peritoneais, em meio com cloroquina, reduziu o índice de fagocitose depois de 24h, bem como a viabilidade celular. Aparentemente as diferentes formas do *F. pedrosoi* desenvolveram diferentes estratégias para sobreviver no interior dos fagossomos, como descrito para as espécies patogênicas de *Aspergillus*, enquanto *A. terreus* sobrevive em fagolisossomos acidificados em macrófagos, *A. fumigatus* interfere na maturação, germina e eventualmente escapa dos macrófagos. (Slesiona *et al.*, 2012). A acidificação depende de um complexo enzimático denominado v-ATPase cujo transforma a energia de hidrolases de ATP no movimento através da membrana do fagossomo. Enquanto a acidificação do fagossomo e sua regulação representam componentes biológicos essenciais na biologia do fagossomo, outros fatores além do envolvimento das v-ATPase, determinantes do pH do fagossomo, não esta completamente elucidado. (Steinberg e colaboradores, 2007). A cloroquina tem propriedades antifúngicas e diminui a resposta inflamatória de células *in vitro* de pacientes com doença crônica granulomatosa. A atividade antifúngica da cloroquina pode ser benéfica no combate á infecções fúngicas em pacientes com CGD (Henriet *et al.*, 2012). Um mecanismo da cloroquina, como agente antimicrobiano refere-se não á sua ação direta na invasão do patógeno, mas á restrição de ferro intracelular disponível (Newman *et al.*, 1994). Sabe-se também que a cloroquina tem um efeito antifúngico direto em *H. capsulatum* e *C. neoformans*, possivelmente pela acumulação no vacúolo fúngico (Newman *et al.*, 1994; Levitz *et al.*, 1997).

A parede celular dos fungos é composto em sua grande maioria por polissacarídeos e quitina. Uma pequena parte é composta pelos lipídeos. Utilizando dois diferentes isolados do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, foram identificados diferentes lipídeos, como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol,

fosfatidilinositol (Longo *et al.*, 2013), sendo que os glicosilinositolfosforilceramida Pb1 e Pb2 foram descritos como imunogênicos (Bertini *et al.*, 2007). As funções dos lipídeos da parede celular das células fúngicas deixaram de ser apenas estruturais porém ainda não está totalmente esclarecido sua atuação na relação com o hospedeiro. A importância destas moléculas foi revisada por Pinto *et al.*,(2008), mostrando a capacidade do hospedeiro em produzir anticorpos específicos para ceramidas de *P. brasiliensis*, *C. neoformans*, entre outros. Pouco se conhece sobre a composição de carboidratos e lipídeos de *F. pedrosoi* até o momento. Soares *et al.*,(1995) relataram mudanças na composição lipídica durante a formação do conídio. Nimrichter, *et al.* (2005) descobriram que não existe diferença estrutural importante entre cerebrosídeos isolados de células de micélio e escleróticas considerando a antigenicidade das moléculas e a interação com anticorpo monoclonal contra glicoceramida purificado do extrato lipídico de micélio de *F. pedrosoi*. Nimrichter *et al.*,(2004) demonstraram que este anticorpo inibiu o crescimento do conídio e intensificou as funções antifúngicas de macrófagos murinos.

Como os lipídeos das micobactérias são capazes de modular o sistema imune do hospedeiro, os lipídeos extraídos da forma muriforme foram avaliados. Neste estudo foi observado que o lipídeo não alterou a produção de citocinas ou a produção de NO conforme observado somente pela célula fúngica. Apenas com esta análise não é possível dizer se o lipídeo extraído de células muriformes de *F. pedrosoi* não exerce nenhuma função antifúngica no macrófago, entretanto os indícios são fortes de que eles não exercem um papel imunomodulador.

Estes resultados corroboram e colaboram com os dados do grupo, que vêm estudando a imunopatologia das formas do fungo *F. pedrosoi*. A ativação adequada do macrófagos, para que possa eliminar o fungo internalizado, depende da ativação conjunta

de mais de um receptor, como quando estimulado com zymosan, e sugere que depende ainda da maturação do endossomo, considerando que o fungo consegue sobreviver em meio ácido.

6. CONCLUSÕES

Agonistas de TLR2/TRL6, TLR4 e Dectina-1 atuam de formas distintas para as formas patogênica e infectante da cromoblastomicose. Ao contrário do observado em ensaio de interação com células muriformes de *F. pedrosoi*, os conídeos proliferaram no interior dos macrófagos previamente estimulados com agonistas de TLR4, TLR2/TLR6 e Dectina-1. Já no caso de células muriformes, macrófagos previamente estimulados com zymosan e LPS tiveram uma ação fungicida.

O processo de acidificação possui maior importância para a fagocitose e destruição dos CM do que dos conídeos

Aparentemente o lipídeo extraído de células muriformes de *F. pedrosoi* não possui um papel imunomodulador para os macrófagos.

7- FIGURAS SUPLEMENTARES

Macrófagos peritoneais previamente estimulados com agonistas de TLR4, TLR2 e Dectina-1 ou cloroquina foram infectados com conídeos (Figura 20) e células muriformes (Figura 21) de *F. pedrosoi*. Após 3h de interação, os poços foram lavados e corados utilizando-se o kit para coloração de diferencial rápida em hematologia Instant-Prov. Posteriormente imagens foram tiradas no microscópio óptico invertido. Ampliação de 32x.

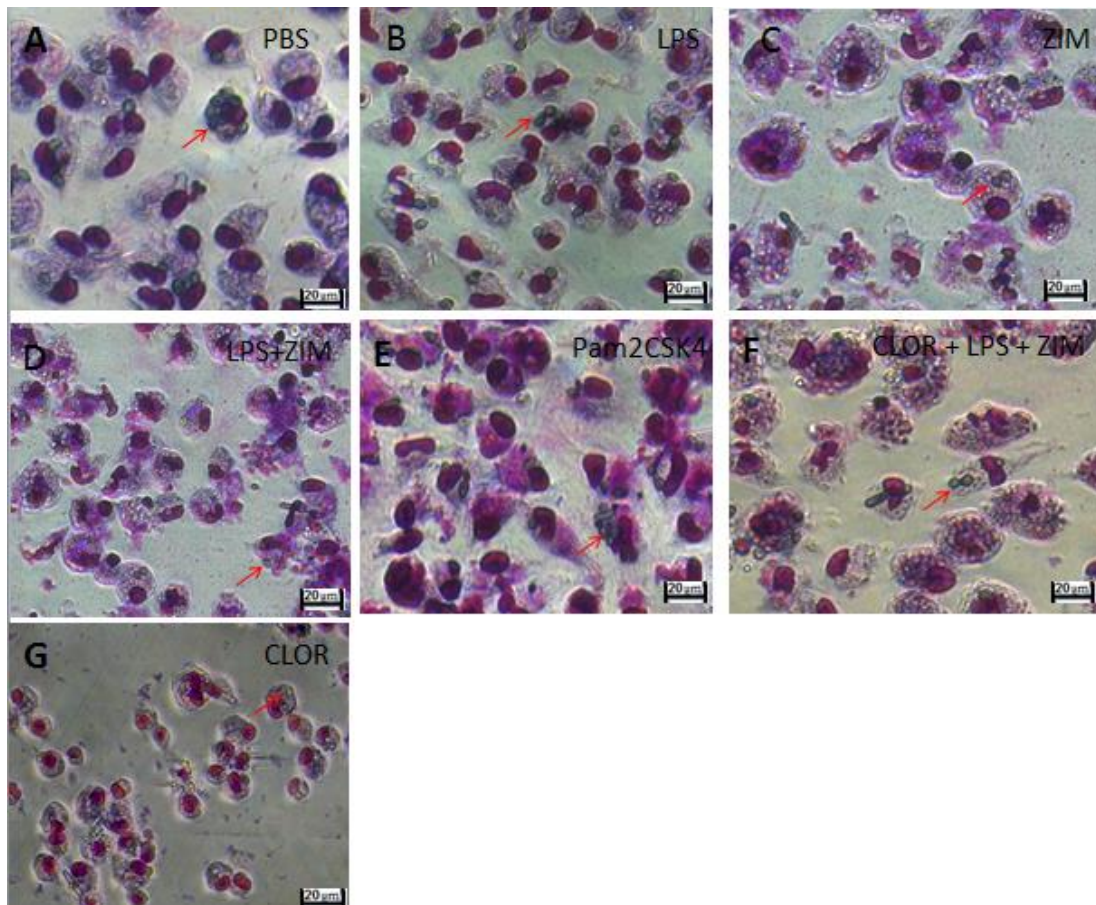


Figura 20. Imagens de microscopia óptica obtidas do ensaio de interação de conídeos de *F. pedrosoi* com macrófagos peritoneais previamente estimulados com agonistas de TLR4, TLR2 e Dectina-1 ou cloroquina. Após 3h de interação de macrófagos previamente estimulados somente com conídeo (A), LPS, ZIM, LPS + ZIM, Pam2CSK4 (B, C, D e E) ou cloroquina (F,G), os poços foram corados com o kit para coloração de diferencial rápida em hematologia Instant-Prov, e fotos foram tiradas no microscópio invertido. Setas indicam conídeos internalizados. Ampliação (32x)

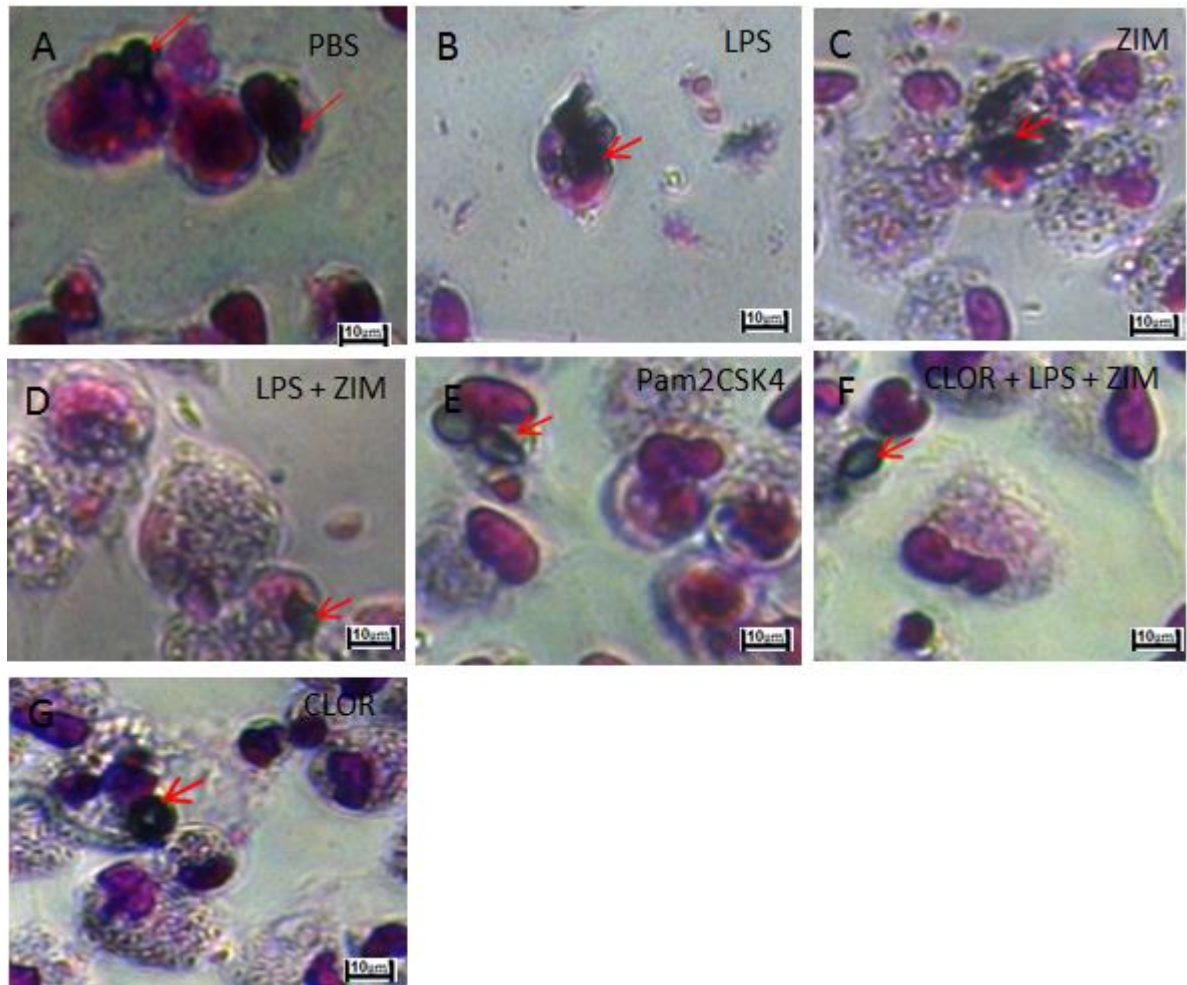


Figura 21. Imagens de microscopia óptica obtidas do ensaio de interação de células muriformes de *F. pedrosoi* com macrófagos peritoneais previamente estimulados com agonistas de TLR4, TLR2 e Dectina-1 ou cloroquina. Após 3h de interação de macrófagos previamente estimulados somente com conídeo (A), LPS, ZIM, LPS + ZIM, Pam2CSK4 (B, C, D e E) ou cloroquina (F,G), os poços foram corados com o kit para coloração de diferencial rápida em hematologia Instant-Prov, e fotos foram tiradas no microscópio invertido. Setas indicam células muriformes internalizadas. Ampliação (32x)

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aderem, A. & Underhill, D. M. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol*, 17: 593-623

Alviano, C. S., Farbiarz, S. R., Travassos, L. R., Angluster, J., & Souza, W. (1992). Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propranolol. *Mycopathologia* , 119(1).

Alviano, D. S., Kneipp, L. F., Lopez, A. H., Travassos, L. R., Meyer-Fernandes, J. R., Rodrigues, M. L., et al. (2003). Differentiation of *Fonsecaea pedrosoi* mycelial forms into sclerotic cells is induced by platelet-activating factor. *Res Microbiol* , 154: 689-695.

Altamura, M. *et al.* Immune responses to fungal infections and therapeutic implications. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 1(3):189-97, 2001

Amaral, A. C., Bocca, A. L., Ribeiro, A. M., Nunes, J., Peixoto, D. L., Simioni, A. R., et al. (2009). Amphotericin B in poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against paracoccidioidomycosis. *J Antimicrob Chemother* , 63(3): 526-33.

Ameen, M. (2008). Chromoblastomycosis: clinical presentation and management. *British Association of Dermatologists - Clinical and Experimental Dermatology* , 34: 849-85

Attapattu, M. C. (1997). Chromoblastomycosis - a clinical and mycological study of 71 cases from Sri Lanka. *Mycopathologia* , 137: 145-151

Barba-Gomez, J. F., Mayorga, J., McGinnis, M. R., & Gonzalez-Mendoza, A. (1992). Chromoblastomycosis caused by *Exophiala spinifera*. *J Am Acad Dermatol* , 26: 367-370.

Bayles, M. A. (1986). Chromomycosis. In: R. Hay, Baillière's Clinical Tropical Medicine and Communicable Diseases. Tropical Fungal Infections (pp. 45-70). London: WB Saunders

Bellocchio, S., Montagnoli, C., Bozza, S., Gaziano, R., Rossi, G., Mambula, S. S., ... Romani, L. (2004). The Contribution of the Toll-Like/IL-1 Receptor Superfamily to Innate and Adaptive Immunity to Fungal Pathogens In Vivo. *The Journal of Immunology*, 172(5), 3059–3069. doi:10.4049/jimmunol.172.5.3059

Bertini S., Colombo, A. L., Takahashi H. K., Straus A. H.(2007) Expression of antibodies directed to *Paracoccidioides brasiliensis* glycosphingolipids during the course of paracoccidioidomycosis treatment. *Clin. Vaccine Immunol*, 14(2):150–156

Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37(8): 911-917

Bocca, A. L., Brito, P. P., Figueiredo, F., & Tosta, C. E. (2006) Inhibition of nitric oxide production by macrophages in chromoblastomycosis: a role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *Mycopathologia* , 161(4): 195-203.

Bonifaz, A., Carrasco-Gerard, E., & Saul, A. (2001). Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. *Mycoses* , 44: 1-7

Borelli, D. (1972). *Acrotheca aquaspersa* nova, new species agent of chromomycosis. *Acta Cient Venez* , 23: 193-196

Botterel, F., Gross, K., Ibrahim-Granet, O., Khoufache, K., Escabasse, V., Coste, A., ... Bretagne, S. (2008). Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by primary nasal epithelial cells in vitro. *BMC Microbiology*, 8, 97.

Brown, G. D. (2011). Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. *Annual Review of Immunology*, 29(October 2010), 1–21. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101229

Brown, G. D., Herre, J., Williams, D. L., Willment, J. a, Marshall, A. S. J., & Gordon, S. (2003). Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(9), 1119–24. doi:10.1084/jem.20021890

Calich, V. L. G., Pina, A., Felonato, M., Bernardino, S., Costa, T. a, & Loures, F. V. (2008). Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in

paracoccidioidomycosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 53(1), 1–7. doi:10.1111/j.1574-695X.2008.00378.x

D'Ávila, S. C., Pagliari, C., & Duarte, M. I. (2002). The cell-mediated immune reaction in the cutaneous lesion of Chromoblastomycosis and their correlation with different clinical forms of the disease. *Mycopathologia*, 156(2), 51-6

De Hoog, G. S., Attili-Angelis, D., Vicente, V. A., Van Den Ende, A. H., & Queiroz-Telles, F. (2004). Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* species. *Med Mycol*, 42: 405-416

Esterre, P., Andriantsimahavandy, A., Ramarcel, E., & Pecarrere, J. (1996). Forty years of chromoblastomycosis in Madagascar: a review. *Am J Trop Med Hyg*, 55: 45-47.

Esterre, P., Jahevitra, M., & Andriantsimahavandy, A. (2000). Humoral immune response in chromoblastomycosis during and after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol*, 7: 497-500

Esterre, P., & Queiroz-Telles. (2006). Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 19: 148-152

Esterre, P., Peyrol, S., & Sainte-Marie, D. (1993). Granulomatous reaction and tissue remodelling in the cutaneous lesions of chromomycosis. *Pathol Res Pract*, 422:285-291.

Farbiaz, S. R., De Carvalho, T. U., Alviano, F. & De Souza, W. (1996). Fine structure and cytochemistry of the interaction between *Fonsecaea pedrosoi* and mouse resident macrophages. *J. Med. Vet. Mycol*, 28: 373-383

Farbiaz, S. R., De Carvalho, T. U., Alviano, C. S., & De Souza, W. (1992). Inhibitory effect of melanin on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with mammalian cells in vitro. *J Med Vet Mycol*, 30: 265-273

Flannagan, R. S., Jaumouillé, V., & Grinstein, S. (2012). The cell biology of phagocytosis. *Annual Review of Pathology*, 7, 61–98. doi:10.1146/annurev-pathol-011811-132445

Franzen, A. J., Cunha, M. M. L., Batista, E. J. O., Seabra, S. H., Souza, W. D. E., & Rozental, S. (2006). Effects of Tryclazole (5-methyl, 1,2,4-triazol[3,4]benzothiazole), a Specific DHN – Melanin Inhibitor, on the Morphology of *Fonsecaea pedrosoi* Conidia and Sclerotic Cells, *737*(July), 729–737. doi:10.1002/jemt

Franzen, A. J., Cunha, M. M. L., Miranda, K., Hentschel, J., Plattner, H. et al. (2008) Ultrastructural characterization of melanosomes of the human pathogenic fungus *Fonsecaea pedrosoi*. *J Struct Biol* 162: 75–84.

Gimenes, V. M., Criado, P. R., Martins, J. E., & Almeida, S. R. (2006). Cellular immune response of patients with chromoblastomycosis undergoing antifungal therapy. *Mycopathologia*, 152 (2), 97-101

Gimenes, V. M., Souza, M. G., Ferreira, K. S., Marques, S. G., Gonçalves, A. G., Santos, D. V., et al. (2005). Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. *Microbes and Infection*, 7(4): 708-713.

Gomez, S. D., Dominguez- Soto, A., Ancochea, J., Jimenez- Heffernan, J.A., Leal. J. A. & Corbi, A. L. (2004) Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin mediates binding and internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by dendritic cells and macrophage, *J. Immunol.* 173: 5635-5643.

Hayakawa, M. *et al.* Phagocytosis, production of nitric oxide and pro inflammatory cytokines by macrophages in the presence of dematiaceous fungi that causes chromoblastomycosis. *Scand J Immunol*, 64(4): 382-387, 2006

Henriet, S. S. V, Jans, J., Simonetti, E., Kwon-Chung, K. J., Rijs, A. J. M. M., Hermans, P. W. M., ... Warris, A. (2013). Chloroquine modulates the fungal immune response in phagocytic cells from patients with chronic granulomatous disease. *The Journal of Infectious Diseases*, 207(12), 1932–9. doi:10.1093/infdis/jit103

Herbst, S., Scheible, U. E. & Schneider, B. E. (2011) Interferon Gamma Activated Macrophages Kill Mycobacteria by Nitric Oxide Induced Apoptosis. *Plos One*,

Howard, R. J., Ferrari, M. A., Roach, D. H., & Money, N. P. (1991). Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(24): 11281-4

Ibrahim-Granet, O., Philippe, B., Boleti, H., Boisvieux-Ulrich, E., Grenet, D., Stern, M., & Latgé, J. P. (2003). Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. *Infection and Immunity*, 71(2), 891–903. Retrieved from <http://iai.asm.org/content/71/2/891.full.pdf+html>

Karuppayil, S. M & Szaniszlo, P. J. Importance of calcium to the regulation of polymorphism in *Wangiella* (*Exophiala*) dermatitidis. (1997) *Journal of Medical & Veterinary Mycology*, 35, 379-388

Kerrigan, A. M., & Brown, G. D. (2009). C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology*, 214(7), 562–75. doi:10.1016/j.imbio.2008.11.003

Lacaz, C. S., Porto, E., Martins, J. E., & Melo, N. T. (2002). *Tratado de Micologia Médica*. 9ª Ed. São Paulo: Sarvier.

Latge, J. P. Tasting the fungal cell wall. *Cell. Microbiol.* **12**, 863–872 (2010).

Leslie, D. F., & Beardmore, G. L. (1979). Chromoblastomycosis in Queensland: a retrospective study of 13 cases at the Royal Brisbane Hospital. *Australas J. Dermatol* , 20: 23-30.

Levitz, S. M. (2004). Interactions of Toll-like receptors with fungi. *Microbes Infect* , 6: 1351-1355.

Levitz, S. M., Harrison, T. S., Tabuni, a, & Liu, X. (1997). Chloroquine induces human mononuclear phagocytes to inhibit and kill *Cryptococcus neoformans* by a mechanism independent of iron deprivation. *The Journal of Clinical Investigation*, 100(6), 1640–6. doi:10.1172/JCI119688

Limongi, C. L., D. Souza, A & Rozental, S. (2001). Isolation and partial characterization of an adhesin from *Fonsecaea pedrosoi*. *Medical Mycolgy*, 39, 429-473

Limongi, C. L., Rozental, S., Alviano, C. S., & de Souza, W. (1997). The influence of surface carbohydrates on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with Chinese hamster ovary glycosylation mutant cells. *Mycopathologia* , 138 (3), 127-135

Londero, A. T., & Ramos, C. D. (1976). Chromomycosis. A clinical and mycological study of 35 cases observed in the hinterland of Rio Grande do Sul. *Brazil Am J Trop Med Hyg*, 25: 132-135.

Longo, L.V., Nakayasu, E. S., Gazos-Lopes, F., Vallejo, M. C., Matsuo, A. L., Almeida, I. C., Puccia, R. (2013) Characterization of cell wall lipids from the pathogenic phase of *Paracoccidioides brasiliensis* cultivated in the presence or absence of human plasma. *PLoS One*. May 17;8(5):e63372.

Luther, K., Rohde, M., Sturm, K., Kotz, A., Heesemann, J., & Ebel, F. (2008). Characterisation of the phagocytic uptake of *Aspergillus fumigatus* conidia by macrophages. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 10(2), 175–184. doi:10.1016/j.micinf.2007.11.001

Luther, K., Torosantucci, A., Brakhage, A. A., Heesemann, J. & Ebel, F. (2007) Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by murine macrophages involves recognition by the dectin-1 beta-glucan receptor and Toll-like receptor 2. *Cellular Microbiology*, 9(2), 368-381.

Machado, A. P., Silva, M. R. R. & Fischman, O. (2010). Prolonged infection by *Fonsecaea pedrosoi* after co-stimulation at different sites in experimental murine chromoblastomycosis. *Virulence*, 1(1): 29-36,.

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

Machado, A. P., Silva, M. R. R. & Fischman, O. (2009) Local phagocytic responses after murine infection with different forms of *Fonsecaea pedrosoi* and sclerotic bodies originating from an inoculum of conidiogenous cells. Blackell Verlag GmbH, 1439-0507

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

Martínez, R. L., & Tovar, L. J. (2007). Chromoblastomycosis. *Clinics in Dermatology*, 188-194

Matsumoto, T., Matsuda, T., McGinnis, M. R., & Ajello, L. (1993). Clinical and mycological spectra of *Wangiella dermatitidis* infections. *Mycoses* , 36: 145-155.

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

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

McGinnis, M. R., Ajello, L., & Schell, M. S. (1985). Mycotic diseases. A proposed nomenclature. *Int J Dermatol* , 24: 9-15

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

Naka, W., Harada, T., Nishikawa, T., & Fukushiro, R. (1986). A case of chromoblastomycosis: with special reference to the mycology of the isolated *Exophiala jeanselmei*. *Mykosen* , 29: 445-452

Netea, M. G., Gow, N. A. R., Munro, C. A., Bates, S., Collins, C., Ferwerda, G., ... Kullberg, B. J. (2006). Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *Journal of Clinical ...*, 116(6).

Newman, S., & Gootee, L. (1994). Chloroquine induces human macrophage killing of *Histoplasma capsulatum* by limiting the availability of intracellular iron and is therapeutic in a murine model of histoplasmosis. *Journal of Clinical ...*, 93(4), 1422-9

Nimrichter, L., Barreto-Bergter, E., Mendonça-Filho, R. R., Kneipp, L. F., Mazzi, M. T., Salve, P., et al. (2004). Monoclonal antibody to glucosylceramide inhibits the growth of *Fonsecaea pedrosoi* and enhances the antifungal action of mouse macrophages. *Microbes Infection* , 6(7) 657-665

Nimrichter, L., Cerqueira, M. D., Leitão, E. A., Miranda, K., Nakayasu, E. S., Almeida, S. R., Almeida, I. C., et al. (2005) Structure, Cellular Distribution, Antigenicity, and

Biological Functions of Fonsecai Pedrosoi Ceramide Monohexosides. *Infection and Immunity*, v.73, n.12, p.7860-7868.

Nóbrega, Y., Lozano, F. V., Silva de Araújo, T., Carvalho, D. D. & Bocca, A. L. (2010) The Cell Wall Fraction from *Fonsecaea pedrosoi* Stimulates Production of Different Profiles of Cytokines and Nitric Oxide by Murine Peritoneal Cells in Vitro. *Mycopathologia*, 170:89-98.

Padhye, A. A., & Ajello, L. (1987). A case of chromoblastomycosis with special reference to the mycology of the isolated *Exophiala jeanselmei*. *Mykosen*, 30: 134.

Perez-Blanco, M., Hema'ndez Valles, R., Garcia-Humbria, L., & Yegres, F. (2006). Chromoblastomycosis in children and adolescents in the endemic area of the Falcon State, Venezuela. *Med Mycol*, 44: 467-471.

Pinto, M. R., Barreto-Berghter, E. & Taborda, C. P. (2008) Glycoconjugates and polysaccharides of fungal cell wall and activation of immune system. *Braz J Microbiol*. 39(2): 195–208

Pretelt, M. J. (1989). Cromomicosis. Aspectos epidemiológicos. Análisis de 82 casos estudiados en el Centro Dermatológico d Ladislao de la Pascua T de 1956-1988. *Dermatology Specialty Thesis, Universidad Nacional Autónoma de México*

Queiroz Filho, F. (1997). A cromoblastomicose no estado do Paraná: etiologia, epidemiologia, clínica e terapêutica com itraconazol. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30(4): 345-346

Queiroz-Telles, F., Esterre, P., Perez-Blanco, M., Vitales, R. G., Salgado, C. G., & Bonifaz, A. (2009). Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Medical Mycology*, 1-13

Queiroz-Telles, F., McGinnis, M. Salkin, I., & Graybill, J. (2003). Subcutaneous mycoses. *Infect Dis Clin North Am*, 17:59-85, vii

Rajendran, C., Ramesh, V., Misra, R. S., Kandhari, S., Upreti, H. B., & Datta, K. K. (1997). Chromoblastomycosis in India. *Int J Dermatol*, 36: 29-33.

Rappleye, C. A.; Eissenberg, L. G. & Goldman, W. Histoplasma capsulatum α -(1-3)-glucan blocks innate immune recognition by the β -glucan receptor (2007). *PNAs*, 104(4): 1366-1370

Rippon, J. W. (1988). Chromoblastomycosis. *Medical Mycology* , 276-298.

Romani, L. (2011). Immunity to fungal infections. *Nature Immunology* , 4: 1-12.

Rosen, T., & Overholt, M. (1996). Persistent viability of the Medlar body. 35(2), 96-8.

Rozental, S., Alviano, C., & Souza, W. (1994). The in vitro susceptibility of Fonsecaea Pedrosoi to activated macrophages. *Mycopathologia* , 126:85-91.

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

Sanjuan, M. a, Dillon, C. P., Tait, S. W. G., Moshich, S., Dorsey, F., Connell, S., ... Green, D. R. (2007). Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature*, 450(7173), 1253–7. doi:10.1038/nature06421

Santos, A. L., Palmeira, V. F., Rozental, S., Kneipp, L. F., Nimrichter, L., Alviano, D. S., et al. (2007). Biology and pathogenesis of Fonsecaea pedrosoi, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. *Federation of European Microbiological Societies* , 570-591

Schell, W. A., & Esterre, P. (2006). Chromoblastomycosis. In: Topley, & Wilson, *Mycology Reference Book*. 10th ed. London: Hodder Arnold.

Silva, C. L., Fazioli, R. A. (1985) Role of the cell wall in the granulomatous response of mice to the agents of chromomycosis. *J. Med. Microbiol*, 20:299–305

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

Silva, J. P.; Silva, M. B.; Salgado, U. I.; Diniz, J. A. P.; Rozental, S.; Salgado, C. G. (2007) Phagocytosis of *Fonsecaea pedrosoi* conidia, but not sclerotic cells caused by Langerhans cells, inhibits CD40 and B7-2 expression. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 50: 104-111.

Silva, J., de Souza, W., & Rozental, S. (1998). Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil). *Mycopathologia* , 143: 171-175

Siqueira, Isaque Medeiros. *Avaliação do tratamento da cromoblastomicose experimental utilizando vacina de DNA (DNA- hsp65)*. 2010. Universidade de Brasília. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular). Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Distrito Federal.

Slesiona, S., Gressler, M., Mihlan, M., Zaehle, C., Schaller, M., Barz, D., ... Brock, M. (2012). Persistence versus escape: *Aspergillus terreus* and *Aspergillus fumigatus* employ different strategies during interactions with macrophages. *PloS One*, 7(2), e31223. doi:10.1371/journal.pone.0031223

Soares, R. M^a, Angluster, J., D'Souza, W. & Alviano C. S. Carbohydrate and lipid components of hyphae and conidia of human pathogen *Fonsecaea pedrosoi*. (1995) *Mycopathologia*. 132:71-77

Souza, M. G. T., Ghosn, E. E. & Almeida, S. R.. (2006) Absence of CD4 T Cells Impairs Host Defence of Mice Infected with *Fonsecai Pedrosoi*. *Scandinavian Journal of Immunology*, 64(6): 595-600.

Sousa, M. G, de Maria Pedrozo e Silva Azevedo C; Nascimento, R. C. , Ghosn, E. E.; Santiago, K. L., Noal, V.; et al. (2008). *Fonsecaea pedrosoi* infection induces differential modulation of coestimulatory molecules and cytokines in monocytes from patients with severe and mild forms of chromoblastomycosis. *Journal of Leukocyte Biology*, v.84, p.864-870,

Souza, M. D. G., Reid, D. M., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Ruland, J., Langhorne, J., ... Brown, G. D. (2011). Restoration of pattern recognition receptor costimulation to treat chromoblastomycosis, a chronic fungal infection of the skin. *Cell Host & Microbe*, 9(5), 436–43. doi:10.1016/j.chom.2011.04.005

Steinberg, B. E., Huynh, K. K., & Grinstein, S. (2007). Phagosomal acidification: measurement, manipulation and functional consequences. *Biochemical Society Transactions*, 35(Pt 5), 1083–7. doi:10.1042/BST0351083

Underhill, D. M., & Goodridge, H. S. (2012). Information processing during phagocytosis. *Nature Reviews. Immunology*, 12(7), 492–502. doi:10.1038/nri3244

Xi, L., Lu, C., Liu, H., Xie, Z., Fukushima, K., Takizawa, K., et al. (2009). Molecular diversity of *Fonsecaea* (*Chaetothyriales*) causing chromoblastomycosis in southern China. *Med Mycol*, 47:27-33

Xi, L., Lu, C., Sun, J., Liu, H., Zhang, J., et al. (2008). Chromoblastomycosis caused by a meristematic mutant of *Fonsecaea monophora*. *Med Mycolol*, 1-4.

Xie, Z., Zhang, J., Xi, L., Li, X., Wang, L., Lu, C., et al. (2009). A chronic chromoblastomycosis model by *Fonsecaea monophora* in Wistar rat. *Med Mycol* , 1-6

Xu, Y., Jagannath, C., Liu, X.-D., Sharafkhaneh, A., Kolodziejaska, K. E., & Eissa, N. T. (2007). Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity*, 27(1), 135–44. doi:10.1016/j.immuni.2007.05.022

Yamano, Suellen Sirleide Pereira. *Análise da interação in vitro entre Fonsecaea Pedrosoi e macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e Balb/c*. 2008 Universidade Federal do Pará. Dissertação (Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém

Yates, R. M., & Russell, D. G. (2005). Phagosome maturation proceeds independently of stimulation of toll-like receptors 2 and 4. *Immunity*, 23(4), 409–17. doi:10.1016/j.immuni.2005.09.007