

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
ÁREA DE ANÁLISES CLÍNICAS

ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR EM PACIENTES COM
CROMOBLASTOMICOSE

Viviane Mazo Fávero Gimenes

Tese para obtenção do grau de Doutor

Orientador: Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

São Paulo
2007

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

G491e Gimenes, Viviane Mazo Fávero
Estudo da resposta imune celular em pacientes com
cromoblastomicose / Viviane Mazo Fávero Gimenes. -- São
Paulo, 2007.
74p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Almeida, Sandro Rogério de

I. Cromoblastomicose : Medicina 2. Imunologia celular
I. T. II. Almeida, Sandro Rogério de, orientador.

616.969 CDD

Viviane Mazo Fávero Gimenes

ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR EM PACIENTES COM
CROMOBLASTOMICOSE

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida
Orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, 29 nov. de 2007.

AGRADECIMENTOS

A DEUS O MEU TUDO

Ao meu grande amor, Paulo Cezar e aos meus filhos, Isadora e Guilherme, pela paciência e carinho.

Aos meus pais, Luiz e Veronica, por tudo o que sou e pela eterna admiração e confiança que sempre depositaram em mim.

Aos meus irmãos Márcio Luiz e Fernando Henrique e suas respectivas esposas Meire e Josiane, pelo carinho e admiração.

Minha adorável irmã Dra. Valérie e seu esposo Dr. Renato, pela força, amor e carinho que sempre me dedicaram.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Sandro Rogério de Almeida, pelo exemplo de dedicação, conhecimentos, sugestões, ensinamentos, paciência, orientação e pelo apoio e crédito a mim concedidos tornaram possível à realização do presente trabalho.

À Prof. Dra. Arlete Emily Cury, pela aprendizagem, dedicação, apoio e atenção.

Ao Prof. Dr. Paulo Suyoshi Minami cujos os ensinamentos, apoio, amizade e carinho á carreira acadêmica.

À equipe da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da USP, principalmente ao Dr. José Eduardo Costa Martins, ao Dr. Paulo Ricardo Criado e ao Ricardo Spina, pela valiosa colaboração nos trabalhos, apoio e amizade.

À equipe do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Maranhão, principalmente a Dra. Conceição de Maria Pedroso e Silva, ao Dr. Daniel Vagner de Castro Lima dos Santos, Sirley G. Marques e a Azizedite Guedes Gonçalves.

À Karen Spadari do Laboratório de Micologia e Parasitologia Clínicas da FCF-USP a minha eterna gratidão pela colaboração, aprendizado, amizade, paciência a mim concedido.

À Sônia Regina Buratto do Laboratório de Micologia e Parasitologia Clínicas da FCF-USP, pela valiosa colaboração na execução dos trabalhos, aprendizado, amizade e carinho por mim concedido durante todos estes anos de trabalho.

Aos amigos que formam a equipe de pesquisadores do departamento de Micologia e Parasitologia da FCF-USP, Rosana, Eliver, Glória, Vanessa, Gisele, pelo espírito de coleguismo e trabalho em equipe.

À amiga Tânia Sueli de Andrade, pela aprendizagem, dedicação e a minha iniciação no mundo maravilhoso dos fungos.

Às secretárias Ana, Edna, Dora, Sueli, Elaine e ao Jorge, pela orientação, paciência e amizade.

Às funcionárias do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP, Dorlei, Cláudia, Carmem e Rose que de alguma forma colaboraram para realização deste trabalho.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da Fundação de Pesquisa (**FAPESP**) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**).

SUMÁRIO

I	Abreviaturas	01
II	Resumo	02
III	Abstract	03
IV	Introdução	05
	1. Aspectos históricos e sinonímias	06
	2. Epidemiologia	07
	3. Etiologia	09
	4. Manifestações clínicas	11
	5. Diagnóstico diferencial	12
	6. Diagnóstico laboratorial	12
	Exame direto	12
	Cultura	13
	7. Resposta imune	14
	8. Tratamento	18
V	Objetivos	22
VI	Material e Métodos	23
	Casuística	23
	Tipos de lesões de cromoblastomicose	24
	Critérios de gravidade em cromoblastomicose	25
	1. Material biológico	25
	1.1. Obtenção de células mononucleares e de monócitos com Ficoll-Hypaque	26
	1.2. Produção de antígeno	26
	1.3. Resposta proliferativa a antígenos específicos	27
	1.4. Fenotipagens de linfócitos em pacientes com cromoblastomicose	27
	1.5. Produção de citocinas	28
	1.6. Expressão de moléculas de superfície de monócitos	29
VII	Resultados	30
	1. Relação dos pacientes	30
	Tabela 1. Relação de doentes com características clínicas	31
	2. Resposta proliferativa a antígeno específico	32
	3. Dosagem de citocinas	33
	4. Análise do perfil de linfócitos em pacientes com cromoblastomicose	35
	5. Resposta proliferativa a antígeno específico durante terapia antifúngica	36
	6. Dosagem de citocinas	37
	7. Expressão de moléculas da superfície de monócitos	39
	8. Dosagem de citocinas	41
VIII	Discussão	43
IX	Conclusão	56
X	Anexos	58
XI	Referências bibliográficas	59

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

APCs: células apresentadoras de antígeno

ASD: ágar Sabouraud dextrose

BHI: "brain heart infusion"

BSA: albumina de soro bovino

DMSO: dimetilssulfóxido

ELISA: ensaio para detecção e quantificação de anticorpos "Enzyme-linked immunosorbent assay"

FITC: isotiocianato de fluoresceína

IFN- γ : interferon-gama

IL: interleucinas

LPS: lipopolissacarídeo

MIF: média de intensidade de fluorescência

OPD: o-fenilenodiamina

PBS: solução salina tamponada com fosfato

PCM: Paracoccidiodomicose

RPMI: meio de cultura "Roswell Park Memorial Institute- 1640"

SBF: soro fetal bovino

Th: linfócito T auxiliar

TNF- α : fator α de necrose tumoral

YBNP: meio de cultura "yeast nitrogen base"

RESUMO

RESUMO

A cromoblastomicose é uma micose crônica que causa lesões granulomatosas e supurativas que atingem a pele e o tecido subcutâneo. Micose cosmopolita e frequentemente observada no Brasil. As lesões aumentam progressivamente e posteriormente podem desenvolver um processo crônico e que geralmente não respondem a uma terapia convencional. Entretanto o mecanismo de defesa da resposta imune adaptativa, principalmente das células T na cromoblastomicose ainda não está definido. Em nosso estudo avaliamos a produção de citocinas e a resposta linfoproliferativa de diferentes amostras de sangue de pacientes com cromoblastomicose e indivíduos saudáveis *in vitro* após estimulação com antígenos do fungo. Além disso, nos acompanhamos esses pacientes sob terapia antifúngica em diferentes períodos de tratamento. Este estudo mostrou que a forma grave da cromoblastomicose é caracterizada pelo aumento na produção de IL-10 e deficiência na proliferação das células T após estimulação com antígenos do fungo. Ao contrário, pacientes com a forma leve da doença foram capazes de secretar predominantemente IFN- γ , que é uma citocina importante para defesa do hospedeiro. Em adição eles secretaram menores quantidades de IL-10 e suas células T proliferaram eficientemente *in vitro* após estimulação do fungo. Os pacientes avaliados após 6 meses de terapia antifúngica as células T proliferaram e secretaram altos níveis de IFN- γ eficientemente após estimulação. Ao contrário, pacientes com 12 meses de tratamento ocorreu um aumento na produção de IL-10 uma diminuição nos níveis de linfoproliferação. Interessantemente, os monócitos obtidos desses pacientes durante a doença foram capazes expressar moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86) e também aumento nos níveis de HLA-DR após estimulação com LPS. Além disso, monócitos desses pacientes secretam altos níveis de IL-12 e TNF- α , sugerindo que a suscetibilidade desses pacientes não apresentam uma deficiência na apresentação de antígeno por monócitos. Em suma, em nossos resultados mostraram que alta secreção de IFN- γ e eficiente proliferação de células T de pacientes com cromoblastomicose está diretamente relacionada com a forma leve da doença, enquanto que a produção de IL-10 e diminuição na proliferação de células T caracterizam a forma grave da doença.

ABSTRACT

ABSTRACT

Chromoblastomycosis is a chronic granulomatous and suppurative disease that causes lesions mainly in skin and subcutaneous tissues. Although found worldwide, this mycosis is frequently observed in tropical countries such as Brazil. The skin lesions increase slowly and progressively in a chronic process that usually relapse even after canonical treatment. However, the mechanism of the host adaptive immune response, specially the role of T cells, in chromoblastomycosis is still unclear. In studies here, we evaluated the cytokine production and T cell response of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from different patients and healthy controls upon *in vitro* stimulation with fungal antigens. Moreover, we performed a follow-up study in patients undergoing long-term antifungal treatment. We collected PBMC samples from patients with an active form (either severe or mild skin lesions) of chromoblastomycosis and PBMC samples from healthy individuals. In PBMC from patients with a severe form of the disease we found a predominant production of IL-10 over IFN-gamma and a deficiency in T cell proliferation upon fungal antigen stimulation. In contrast, PBMC from patients in a mild form of the disease were able to secrete predominantly IFN-gamma, a cytokine important for host defense. In addition, they secreted low amounts of IL-10 and their T cells efficiently proliferated under *in vitro* stimulation with the fungal antigens. Surprisingly, the patients undergoing 6 months antifungal therapy PBMC from patients secreted higher amounts of IFN-gamma and their T cells proliferated efficiently upon stimulation. On the contrary, PBMC from patients after 12m of treatment showed an increase in IL-10 secretion followed by an inefficient T cell proliferation. Interestingly, monocytes obtained from patients during chronic phase of the disease were able to up-regulate their co-stimulatory molecules (CD80 and CD86) as well as their HLA-DR upon *in vitro* fungal stimulation. Moreover, monocytes from these patients secreted high amounts of pro-inflammatory cytokines IL-12 and TNF-alfa, suggesting that susceptibility of patients must be due to a immune deficiency other than a monocyte deactivation. Altogether, our data clearly show that a higher secretion of IFN-gamma and an

efficient T cell proliferation of PBMC from infected individuals can distinguish the mild from the severe form of the chromoblastomycosis.

INTRODUÇÃO

Introdução

A cromoblastomicose é uma micose subcutânea, de evolução lenta e de difícil tratamento (AL DOORY, 1972). É causada por fungos da família *Dematiaceae* que vivem naturalmente no solo ou em vegetais em decomposição. A aquisição da doença se dá geralmente por traumatismo por plantas ou objetos que veiculem um dos diversos agentes etiológicos. Após a penetração do fungo desenvolve-se um processo de infecção micótica com erupção de pápulas, verrugas ou nódulos que podem ulcerar (AL DOORY; 1972; MCGINNIS; 1983 LACAZ et al, 1998). A evolução é crônica e as manifestações clínicas são polimórficas. A localização é principalmente podal, mas pode haver comprometimento dos membros superiores.

Apresenta caráter endêmico e ocorre com mais freqüência entre a população rural de zonas tropicais e subtropicais, sendo considerada uma doença ocupacional (AL-DOORY, 1972). Em casos avançados determina deformidade e impotência funcional do membro acometido, com incapacitação permanente para o trabalho.

No organismo do hospedeiro, o fungo sofre transformação de filamentosos para estruturas globosas de paredes espessas e acastanhadas, que se multiplicam por septação, em meio a uma reação inflamatória purulenta e granulomatosa. Essas estruturas são conhecidas como células muriformes, corpos fumagóides ou corpúsculos de Medlar, e seu encontro é diagnóstico da doença. (CHANDLER et al, 1980; MEDLAR, 1915). Esses achados diferenciam a cromoblastomicose da feo-hifomicose e do eumicetoma, micoses causadas

também pelos mesmos agentes etiológicos (MCGINNIS ; PASSARELL; 1998). A cromoblastomicose não compromete o estado geral do paciente; por este motivo, a procura de serviço médico é tardia, dificultando o tratamento e aumentando as chances de freqüentes recidivas (CASTRO, 1992; ESTERRE et al, 1996; QUEIROZ-TELLES et al, 1992;). Em geral, o tratamento dessa micose constitui um desafio terapêutico, de modo que, embora diversos métodos e quimioterápicos sejam empregados em tentativas de cura ou controle da doença, a maioria fracassa.

Aspectos históricos e sinonímias

A primeira publicação sobre cromoblastomicose é atribuída a Max Rudolph (1914), que denominou “figueira” a doença causada por fungos negros em pacientes do estado de Minas Gerais (RUDOLPH apud, 1987). Entretanto, essa micose já havia sido observada, mas não publicada, por Alexandrino de Moraes Pedroso (1911), que a denominou “blastomicose negra” e detectou o agente etiológico a partir de biópsia de um paciente do estado de Goiás (apud CASTRO, 1998). As características do fungo nas lesões cutâneas foram depois descritas por Lane (1915) e Medlar (1915), que denominaram *Phialophora verrucosa*, o agente etiológico de uma dermatite verrucosa localizada em uma das nádegas de um jovem italiano, residente em Boston. Mais tarde, em 1920, Pedroso e Gomes publicaram quatro casos de “blastomicose negra” ocorridos no Brasil e, com base nos trabalhos de Lane e Medlar, referiram o agente isolado como *Phialophora verrucosa* (PEDROSO ; GOMES, 1920).

Outras denominações como dermatite verrucosa, formigueiro, cromoblastomicose, dermatite verrucosa blastomicótica, doenças de Pedroso, doença de Fonseca e Gomes foram também utilizadas para descrever essa micose. O termo cromoblastomicose foi introduzido por Terra em (1922) e, na atualidade, é considerado apropriado e indicado pela International Society for Human and Mycology (ODDS et al, 1992). Entretanto, a denominação cromomicose, criada por Moore e Almeida em (1935), tem sido aceita por diversos autores como a mais adequada para descrever a doença em questão.

Epidemiologia

Os fungos causadores de cromoblastomicose podem ser encontrados no solo de todo o mundo, mas as regiões tropicais e subtropicais apresentam maior frequência de casos. A doença tem caráter endêmico e ocorre principalmente entre a população de zonas rurais (AL-DORRY, 1972; BRYGOO; DESTOMBES, 1976; ESTERRE et al, 1996; OKEKE; GUGNANI, 1987; SILVA et al, 1999).

O Brasil, onde a doença já foi observada em todas as regiões, é um dos países com maior número de casos relatados, com elevado índice nas regiões Norte e Nordeste (CORRADO 1982; MCGINNIS, 1983; QUEIROZ-TELLES et al, 1992; SILVA et al, 1992;).

Na cidade de Monte Negro, em Rondônia, constatou-se uma altíssima incidência de uma doença de pele causada por fungos encontrados em restos

de animais e detritos da floresta e alguns casos foram confirmados como cromoblastomicose. Nessa localidade, a cromoblastomicose é diagnosticada, mas com frequência é confundida com leishmaniose tegumentar americana, que também é causadora de feridas na pele. Nessa cidade foram detectados dez ocorrências de doença com feridas na pele (entre 1997 e 2001) o que proporciona uma taxa anual de 1,6 casos da doença por 10 mil habitantes (PIVETA, 2002). Entretanto foram confirmados 49 casos novos de cromoblastomicose por *Fonsecaea pedrosoi* no estado do Pará (SALGADO et al, 2004), este Estado apresenta taxa de prevalência maior que a de Madagascar (SALGADO et al, 2005).

No período de junho de 1995 a agosto de 2004 foram relatados os aspectos epidemiológicos dos pacientes com cromoblastomicose atendidos no Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela (Piauí). Esse estudo caracterizou um perfil dos pacientes com cromoblastomicose diagnosticados neste instituto, sendo que essa doença desenvolve principalmente em homens da zona rural, com lesão em membro inferior, com mais de 10 anos de evolução, tratados principalmente com Anfotericina B (MARTINS et al, 2004).

A ocorrência de cromoblastomicose já foi também descrita em outros países, como: Madagascar, Venezuela, Republica Dominicana, Cuba, Colômbia Japão, China e Malasia (MARTINEZ ; TOVAR, 2007). Entretanto, no Japão o número de casos é considerado crescente (FUKUSHIRO, 1983) e Madagascar, cuja taxa anual é de 1,2 casos por 10 mil habitantes, é referido como o país com maior índice de cromoblastomicose (PIVETA, 2002).

A cromoblastomicose é principalmente encontrada em adultos com 30 a 50 anos de idade, do sexo masculino, de regiões rurais (AL-DOORY, 1972; CASTRO, 1998; MCGINNIS, 1983; SILVA et al, 1999). Não se conhece predileção racial e contágio inter-humano (MCGINNIS, 1983; SILVA et al, 1999). A doença resulta da implantação traumática transcutânea de diversas espécies de fungos da família *Dematiaceae*, através de soluções de continuidade, sobretudo nos membros inferiores, embora uma variedade de formas clínicas de cromoblastomicose e sítios anatômicos envolvidos tenham sido relatados (BRANDT: WARNOCK, 2003; LACAZ et al, 1991; MCGINNIS, 1983).

A cromoblastomicose apresenta um predomínio no sexo masculino. Este fato tem sido investigado com objetivo de verificar qual o efeito hormonal desenvolvido durante a infecção. Hernández-Hernández e colaboradores verificaram que a progesterona e a testosterona apresentam um efeito inibidor *in vitro* no desenvolvimento de *Fonsecaea pedrosoi*, *Cladosporium carrionii* e *Phialophora verrucosa* (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al, 1995).

Etiologia

Até o momento, cinco espécies de fungos estão envolvidas na etiologia da cromoblastomicose: *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compacta*, *Phialophora verrucosa*, *Cladophialophora (Cladosporium) carrionii* e *Rhinocladiella aquaspersa* (MCGINNIS, 1983; LACAZ et al, 1991; RIPPON, 1982). Outras espécies, descritas como agentes etiológicos em alguns casos incluem *Wangiella (Exophiala) dermatitides*, *Exophiala spinifera*, *Exophiala jeanselmei* e *Exophiala castelanii*

(BARBA-GÓMES et al, 1992; PADHYE et al, 1996; QUEIROZ-TELLES et al, 1996).

Independente do agente causador, essa micose é considerada bem definida e individualizada do ponto de vista clínico, anatomopatológico e micológico. Alguns casos de lesões cutâneas, com características de dermatite verrucosa, podem ser determinados por manifestações de feo-hifomicose, nocardiose e levedurose. Na ilha de Madagascar, as principais espécies encontradas são *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladophialophora (Cladosporium) carrionii* (ESTERRE et al, 1996). O último agente também é freqüentemente encontrado em Madagascar, Venezuela e na África do Sul (BRYGOO; DESTOMBES, 1976; MARTÍNEZ ; TOVAR, 2007; ZEPPEFELDT et al, 1994). *Fonsecaea compacta* é mais comum na Rússia, Porto Rico, Líbia e Cuba e *Fonsecaea pedrosoi* é comum na América Latina. (AL-DOORY, 1972; BRYGOO; DESTOMBES, 1976; BONIFAZ, et al, 2004; RIPPON, 1982). Cromoblastomicose, causada por *Phialophora verrucosa* foi observada nos Estados Unidos, Japão e China (BRYGOO; DESTOMBES, 1976; LANE, 1915; LI; WU, 1997).

Na Amazônia, nos últimos 55 anos, foram diagnosticados 325 casos de cromoblastomicose, tendo sido isolados *F. pedrosoi*, *P. verrucosa*, *C. carrionii* e raramente *Rhinocladiella aquaspersa* (SILVA et al, 1999). Esses agentes são cosmopolitas, mas dependendo do clima ou da região, uns são isolados mais freqüentemente que os outros (BRYGOO; DESTOMBES, 1976; LACAZ et al, 1991; ZEPPEFELD et al, 1994).

Manifestações clínicas

O diagnóstico clínico da cromoblastomicose pode ser difícil devido à diversidade das lesões. Estas apresentam evolução crônica e podem iniciar como pápulas, verrugas ou nódulos que gradualmente aumentam de tamanho e, mais tarde, podem ulcerar. Em casos crônicos observam-se lesões nodulares, em placas infiltrativas ou eritematosas, cicatriciais, mas as verruciformes e tumorais são mais comuns. Algumas ulcerações adquirem aspecto papilomatoso, semelhante à couve-flor. As lesões se limitam à pele e ao tecido subcutâneo e a disseminação pode ocorrer por contigüidade ou através dos vasos linfáticos superficiais. Elas podem apresentar dor, prurido e odor desagradável (AL-DORRY, 1972; LACAZ et al, 1991). Ocasionalmente as lesões são associadas a infecções bacterianas e processos inflamatórios (AJELLO : HAY, 1998).

Mais de um tipo clínico de lesão pode ser observado concomitantemente em um mesmo paciente. Uma característica marcante da cromoblastomicose é a presença de pequenos pontos negros nas lesões, que se trata do fenômeno de eliminação transepitelial do agente etiológico (GOETTE; ROBERTSON, 1984). Estes pontos negros ou "black dots" têm importância clínica, pois são locais ricos em parasitos, onde se consegue seguramente identificar o agente ao exame micológico direto. Essa simples demonstração do fungo no exame direto do material da lesão e em culturas estabelece o diagnóstico da doença em questão (RIPPON, 1982), porque, clinicamente, as lesões de cromoblastomicose podem se confundir com outras doenças dermatológicas infecciosas ou não (LACAZ et al, 1991; RIPPON, 1982).

A doença não compromete o estado geral do paciente, mas em ausência de cuidados terapêuticos ocorrem infecção bacteriana secundária e edema. As lesões acometem principalmente a região podal, pernas e nádegas e raramente mãos e braços. Existem relatos de lesões nas regiões auriculares, nasais e em outras partes do corpo (AL-DORRY, 1972; ARANGO et al, 1998; BITTENCOURT et al, 1994; BRUKS et al, 1995).

Diagnóstico diferencial

As lesões de cromoblastomicose apresentam polimorfismo clínico, o que justifica sua diferenciação de uma série de processos cutâneos de natureza infecciosa e não infecciosa. Entra as doenças infecciosas destacam-se as verrugas e papilomas de etiologia viral, a tuberculose cutânea, micobacterioses, hanseníase e a leishmaniose cutânea, assim como a sífilis terciária, entre outras. Entre as micoses subcutâneas, incluem-se a esporotricose, os micetomas, a lobomicose, a feo-hifomicose e a paracoccidioidomicose. Das causas não infecciosas, as neoplasias são os principais diagnósticos diferenciais de cromoblastomicose (LACAZ et al, 1991; RIPPON, 1982).

Diagnóstico laboratorial

Exame direto

O diagnóstico laboratorial é realizado a partir da remoção de pontos negros da lesão por raspagem com lâmina de bisturi ou por biópsia. O agente causador

pode ser identificado por exame direto da amostra clarificada com KOH. A observação de estruturas demáceas, globosas, septadas ou não, com freqüências aglomeradas, denominadas corpos fumagóides, corpos escleróticos ou células muriformes, no material biológico, confirma o diagnóstico da cromoblastomicose. Em ocasiões, observam-se hifas demáceas septadas, em amostras da epiderme (MCGINNIS, 1983).

Cultura

Os agentes causadores da cromoblastomicose formam colônias escuras, de aspecto aveludado e crescimento lento em meio de cultivo. Não são diferenciáveis em seu aspecto macroscópico (LACAZ et al, 1998; LARONE, 1989; LARONE, 1995; MCGINNIS; SCHELL, 1980).

A observação microscópica dos cultivos mostra que *Fonsecaea pedrosoi* é um fungo polimórfico com três tipos de esporulação. O tipo cladospório, com conidióforos eretos, escuros, a partir dos quais os conídios se desenvolvem por brotamento e permanecem unidos por disjuntores, formando cadeias ramificadas. O tipo rinocladiela mostra conidióforos simples, com várias células conidiogênicas, onde se originam conídios geralmente ovais, com distribuição lateral ou apical. O tipo fialófora apresenta célula conidiogênica denominada fiálide, em forma de ânfora ou frasco, que ocorre ao longo ou na porção terminal do micélio; os conídios, pequenos e ovais, podem se acumular na extremidade da fiálide (DIXON; POLAK-WYSS, 1991; LARONE, 1989; MCGINNINS, 1980; MCGINNIS; SCHELL, 1980; SCHELL et al, 1999).

Fonsecaea compacta apresenta hifas marrom-claro e esporulação predominante cladosporium. Os tipos rinocladiela e fialofora também estão presentes, mas em menor número (SCHELL et al, 1999). *Cladophialophora* (*Cladosporium*) spp mostram conidiação aerógena observando-se conídeos em cadeia, tipo cladospório (SCHELL et al, 1999). *Phialophora verrucosa* apresentam frutificação apenas do tipo fialófora (SCHELL et al, 1999). *Rhinocladiella* mostram frutificação apenas do tipo rinocladiela (SCHELL et al, 1999).

Resposta imune celular

O estudo da resposta imune em infecções fúngicas vem trazendo importante contribuição para o entendimento dessas patologias. Um importante exemplo é o estudo da Paracoccidioidomicose (PCM) uma micose sistêmica muito freqüente em nosso país. Vários autores mostraram que diferentes graus de depressão da resposta imune celular dos pacientes são associados com as diferentes formas clínicas da PCM (Mota et al., 1985; Franco et al., 1986). Estes dados sugerem que na PCM, como em outras micoses profundas, há uma correlação inversa entre a resposta imune celular do paciente e a gravidade da doença, mostrando que a imunidade celular representa um dos mecanismos mais importantes de defesa do hospedeiro contra o fungo.

Mota et al, 1985 sugeriram que quanto mais deprimida for a resposta imune celular do paciente mais grave será a forma clínica da doença.

diferenciem em células efectoras. As células dendríticas, macrófagos ou linfócitos B são células “profissionais” apresentadoras de antígenos capazes de fazer o processamento do antígeno e a apresentação de peptídeos a linfócitos T (UNANUE & ALLEN, 1987). Através de um estudo realizado em biópsia de pele de pacientes com cromoblastomicose utilizando técnicas de imunohistoquímica foram detectadas com mais incidências antígenos de *Fonsecaea pedrosoi* no citoplasma de macrófagos do que em células de Langerhans e dendrócitos. Entretanto, os dendrócitos não atuam só como células APCs, mas desempenham papel importante durante a inflamação, através da produção de citocinas que polarizam a resposta de células T (SOTTO et al, 2004).

A ativação de uma resposta imunológica é conseqüência de uma série de interações envolvendo diferentes tipos celulares. Estudo de clones de populações de células T sugerem que as células apresentadoras de antígenos (APCs) poderiam também determinar o tipo de resposta imune (FERREIRA, 2003).

Estudos imunohistoquímicos sugerem que a persistência do fungo está associada um infiltrado de neutrófilos, que é provavelmente o principal fator patológico para explicar reação granulomatosa na cromoblastomicose. Expressão do fator α de necrose tumoral (TNF- α) e aumento do fator β (TNF- β) tem sido observado pela imunohistoquímica. Avaliar a análise histopatológica da formação do granuloma e acometimento tecidual das células inflamatórias pode explicar a reação granulomatosa. Nos exames histopatológicos das lesões de cromoblastomicose, as reações tissulares cutâneas caracterizam-se por uma reação granulomatosa construída por macrófagos, células gigantes, linfócitos,

plasmócitos e neutrófilos, com presença de microabcessos, granulomas e fibroplasia (ESTERRE et al, 1992).

Em um estudo utilizando animais (hamsters) infectados por *Paracoccidioides brasiliensis*, verificou que, enquanto a imunidade celular está funcionando adequadamente, a reação histopatológica é predominantemente granulomatosa, mas à medida que ocorre depressão na resposta imunológica, refletindo a falência dos mecanismos de defesa do animal, os granulomas se afrouxam e os fungos passam a proliferar nas lesões (PERAÇOLI, 1978). No caso da cromoblastomicose é possível que ocorra uma alteração na regulação da resposta imune possibilitando a proliferação fúngica.

O desenvolvimento predominante de uma subpopulação de células T (Th1 ou Th2) durante uma infecção é extremamente importante. Certos patógenos são mais efetivamente controlados por uma resposta do tipo celular (Th1) e outros, mais efetivamente controlados por uma resposta do tipo humoral (Th2) (SHER et al. 1992). Em algumas doenças crônicas, a resposta celular de linfócitos T CD4⁺ inapropriada pode exacerbar a doença, levando a uma inabilidade do hospedeiro para erradicar o microrganismo.

Em relação a cromoblastomicose, escassos são os relatos sobre a resposta imunológica em pacientes. Acredita-se que a resposta imune celular é a mais importante durante a evolução da doença, porém poucos relatos foram publicados até o momento. Esterre et al 2000 estudando a resposta imune humoral de pacientes com cromoblastomicose de Madagascar mostraram uma elevada prevalência de anticorpos contra componentes de 18.5 kDa específicos para *F.*

pedrosoi e dois componentes de 23.5 e 33 kDa específicos para *C. carrionii*. Os autores também mostraram uma diminuição da queda dos níveis de anticorpos durante a terapia antifúngica nesses pacientes.

Vidal e colaboradores também identificaram uma fração antigênica imunodominante de 54 kDa de *Fonsecaea pedrosoi* que apresentou alta sensibilidade e especificidade em testes utilizando-se anticorpos de pacientes com cromoblastomicose (VIDAL et al, 2004).

É importante ressaltar que até o momento não há utilização de técnicas sorológicas para fins de diagnóstico nessa micose. Em relação a estudos imunológicos, há escassos relatos sob componentes antigênicos do fungo (IBRAHIM-GRANET et al, 1988; VILLALBA et al, 1988). Provavelmente, esse fato deve-se ao pouco conhecimento da imunquímica dos fungos e da resposta imunológica dos pacientes com cromoblastomicose.

Estudando a caracterização química parcial de agentes da cromoblastomicose em preparações antigênicas, alguns autores sugerem que esses antígenos poderão auxiliar nos estudos de sorologia de pacientes com cromoblastomicose (BARROS & REZENDE, 1999).

Os fungos causadores de cromoblastomicose apresentam pigmento marrom escuro, denominado melanina, em sua parede celular. Esse pigmento é um antioxidante natural, importante na sobrevivência e longevidade dos propágulos fúngicos, como também, pode conferir maior patogenicidade e virulência a essa classe de fungos (WHEELER ; BELL, 1987). Melanina também pode interferir ativação do complemento (ROSAS et al, 2002) e reduz a sensibilidade dos antifúngicos (VAN DUIN et al, 2002).

Tratamento

A cromoblastomicose constitui um desafio terapêutico enfrentado pelo médico e o paciente. Ao longo da história do conhecimento dessa micose, diversos foram os métodos e as substâncias empregados para tratamento e muitos os fracassos.

Nos estágios iniciais da doença, alguns autores indicam eletrocoagulação, curetagem e exérese das lesões, mas outros pesquisadores contestam o uso desses procedimentos considerando que ao invés de promover a cura causam uma disseminação da doença, com agravamento progressivo do quadro clínico e causando, muitas vezes, sérios prejuízos à saúde dos pacientes (CASTRO, 1998; LACAZ et al, 1991).

Uma das primeiras tentativas para o tratamento foi à administração de iodeto de potássio, por via oral, e iodeto de sódio a 10 %, por via venosa, como terapêutica suplementar. Bons resultados foram obtidos por Bopp, em 1957, utilizando essas medicações associadas. Outras preparações a base de ouro, bismuto, arsênio, mercúrio ou azul de metileno foram também utilizados para tratar essa micose, com diversos graus de sucesso terapêutico (LACAZ et al, 1991).

Diversos esquemas terapêuticos foram utilizados no tratamento da cromoblastomicose, como: processos cirúrgicos, físicos e uso de diversos agentes antifúngicos (CASTRO, 1992), sendo as drogas itraconazol e terbinafina, associadas ou não à crioterapia mais utilizadas atualmente (BONIFAZ et al, 2004,; ESTERRE et al, 1996; CASTRO et al, 2003; UNGPAKORN; REANGCHAINAM, 2006). No entanto, muitos foram os casos de recidiva e poucos foram os relatos

de cura definitiva, não existindo ainda um padrão para o tratamento desta micose (BONIFAZ et al, 1997; QUEIROZ-TELLES et al, 1992).

Castro (1998), tratou por meio de criocirurgia com nitrogênio líquido, 22 pacientes com cromoblastomicose durante 11 anos, concluindo que este recurso terapêutico apresenta eficácia semelhante à maioria dos métodos normalmente empregados. Outras terapias também são descritas como o emprego de vitamina D2 associada com iodeto de sódio a 10%, eletrocoagulação e utilização de antifúngicos orais (BOPP, 1976; PIMENTEL, 1989).

No entanto, apesar de existirem vários métodos terapêuticos, os critérios utilizados para definir se um paciente está ou não curado são bastante conflitantes, podendo envolver aspectos imunológicos (CASTRO, 1998). Também abrangem problemas como dificuldade para obter amostra significativa, necessidade de tratamento e acompanhamento prolongados e a refratariedade da doença aos mais variados métodos terapêuticos, sendo pouco freqüente a cura total. Alguns autores preconizam que a palavra cura em cromoblastomicose possa ser aplicada após cinco anos do término do tratamento, sem que ocorram recidivas (BOLZINGER et al, 1991).

Por outro lado, Castro (1988) admite que o período de três anos de acompanhamento seja suficiente para considerar um paciente curado. A eficácia de um tratamento está simultaneamente ligada às condições físicas e imunológicas dos pacientes, ao tipo da infecção, grupo de risco e na escolha do tratamento a ser administrado (CASTRO, 1998).

Em 1987 foi relatada a obtenção de bons resultados clínicos em dois pacientes com cromblastomicose tratados com itraconazol, um azol de segunda geração (GARNER et al, 1987). Desde então, vários autores comprovaram a eficácia desse tratamento (BORELLI, 1987; KUMAR et al, 1991; YU, 1995), mas outros não obtiveram o mesmo sucesso (CASTRO, 1992; RESTREPO, 1994). Melhores resultados foram obtidos associando-se a administração de itraconazol com crioterapia, de tal modo que, em alguns casos, foram comprovadas cura clínica e micológica mediante acompanhamento prolongado (BONIFAZ et al, 1997; KULLAVANIJAYA; ROJANAVANICH, 1995; POIRRIEZ et al, 2000).

Outros azóis já foram também empregados no tratamento da cromblastomicose, mas sucesso terapêutico foi alcançado em poucos casos (DIAZ et al, 1992; FRANCO et al, 1992; POIRRIEZ, 2000; YU; GAO, 1994).

Os estudos com terbinafina, uma alilaminas, embora mais recentes e menos numerosos que os realizados com outros antimicóticos, mostraram bons resultados no tratamento dessa micose (BONIFAZ et al, 2004; ESTERRE et al, 1996; ESTERRE et al, 1997).

Pelo exposto, verifica-se que ainda não existe um tratamento padrão, mundialmente aceito para a cura ou, ao menos, para um controle eficaz da cromblastomicose. A falha do sucesso terapêutico pode estar relacionada tanto à resistência microbiológica quanto à resistência clínica ao quimioterápico em questão (BORELLE, 1987; RESTREPO et al, 1988). A demonstração da primeira pode ser relativamente simples, por meio de provas de sensibilidade *in vitro* ou da identificação do agente causador (MARCO et al, 1998), mas a comprovação da segunda é mais complexa, por que está associada a baixos níveis de droga

circulante e ou tecidual, condições físicas e sociais do hospedeiro, interações medicamentosas e o estado imunológico do paciente (ESPINELL-INGROFF et al, 2000; GUPTA et al, 2002).

Uma das características da doença é a baixa resposta ao tratamento medicamentoso, principalmente quando as lesões se encontram em fase avançada. No entanto, alguns pacientes não evoluem satisfatoriamente com regressão das lesões, fato que pode ser creditado pela má absorção da droga no sítio lesional ou por incompetência do sistema imunológico em ajudar a combater os fungos em questão.

Portanto, tendo em vista a importância dessa micose em nosso país e considerando-se a necessidade de amplos estudos para tentar controlar ou solucionar as dificuldades clínicas relacionadas ao tratamento da cromoblastomicose, nosso trabalho investigou o comportamento da resposta imune celular em pacientes sob terapia antifúngica com o intuito de contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na progressão e cura dessa patologia e correlacionar com terapia antifúngica.

OBJETIVOS

Objetivos:

Os objetivos deste trabalho foram:

- Análise da resposta linfoproliferativa de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com cromoblastomicose frente ao antígeno de *Fonsecaea pedrosoi* e a produção de citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10 para verificar o tipo de resposta imunológica induzida (Th1 e Th2).
- Analisar a expressão das moléculas de superfície (CD80, CD86 e HLA-DR), bem como a síntese de citocinas por monócitos de pacientes com cromoblastomicose.
- Análise de resposta imune celular em pacientes sob terapia antifúngica.

MATERIAL MÉTODOS

Material e Métodos

Casuística:

Foram estudados 29 indivíduos com cromoblastomicose ativa, todos lavradores ou ex-lavradores, com idade variando de 33 a 92 anos moradores da Baixada Maranhense, localizada na mesorregião norte, na Amazônia Legal maranhense, região com altíssima incidência da doença (Silva et al, 1992). Como controle foram utilizados 15 indivíduos sadios, que não pertenciam à região endêmica.

Foram estudados 13 indivíduos com cromoblastomicose atendidos no Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os pacientes foram acompanhados durante um ano de terapia com itraconazol (100mg a 300mg/ dia) ou terbinafina (250mg/dia) associados ou não a criocirurgia. Indivíduos controles (10) (sem cromoblastomicose) foram avaliados.

Totalizando um grupo com 42 indivíduos com cromoblastomicose ativa e 25 indivíduos controles sem cromoblastomicose.

A escolha dos pacientes teve como critério o diagnóstico da doença pelo achado do fungo em exame direto ou histopatológico assim como sua identificação por cultura. O fungo *F. pedrosoi* foi isolado de todos os pacientes com cromoblastomicose. Nesta relação foram incluídos alguns pacientes virgens e outros pacientes em que o tratamento estava em andamento.

Os pacientes foram divididos segundo os fatores descritos nas Tabelas 2 e 3 foi possível classificar os pacientes em relação ao tipo de lesão que

apresentavam. Essa classificação foi utilizada para agrupar os pacientes segundo a gravidade da doença.

Tabela 2. Tipos de lesões de cromoblastomicose

<p>Nodular</p> <p>Moderadamente elevadas, de consistência fibroelástica. Superfície eritematosa ou violácea, com aspecto descamativo ou verruciforme.</p>
<p>Tumoral</p> <p>Resultam de vários nódulos coalescidos, formando massas tumorais papilomatosas, às vezes lobuladas, semelhantes à couve-flor. Nas extremidades dos membros tendem a ser mais proeminente. Superfície recoberta por restos epidérmicos, crostas e partículas córneas.</p>
<p>Verruciforme</p> <p>São pouco úmidas. A hiperkeratose é o aspecto predominante. Frequentemente são encontradas nas bordas do pé.</p>
<p>Cicatricial</p> <p>Lesões planas, de crescimento centrífugo, deixando áreas centrais de epiderme com cicatrização atrófica ou esclerosante. Tendem a cobrir áreas extensas do tegumento. Apresentam contornos de forma anular, aciforme ou serpentina, com bordas hiperkeratóticas.</p>
<p>Placa</p> <p>Vegetante Lesões elevadas, de consistência endurecida, com bordos nítidos e contorno polimórfico. Apresentam geralmente hiperkeratose superficial e são recobertas por restos celulares</p>
<p>Infiltrativa</p> <p>São infreqüentes, pouco elevadas, formando áreas uniformemente infiltradas com ampla variação de tamanho e forma. Geralmente encontradas nas porções superiores dos membros. Caracterizam-se pela coloração eritematosa ou violácea. Sua superfície é descamativa e, às vezes, apresenta exacerbação das linhas de clivagem da epiderme.</p>

CARRION, 1950, modificado por QUEIROZ TELLES, 1996

Tabela 3. Critérios de gravidade em cromoblastomicose

Forma leve

Lesão única.

Tipo placa ou nodular com menos de 5 cm de diâmetro.

Forma moderada

Lesão única ou múltipla.

Tipo placa, nodular ou verruciforme.

Quando múltipla, presença de um ou de vários tipos de lesões.

Localizam-se em uma ou duas regiões cutâneas adjacentes, medindo menos que 15 cm de diâmetro.

Forma grave

Qualquer tipo de lesão única ou múltipla, adjacentes ou não recobrimdo extensas áreas do tegumento.

Quando múltipla, presença de um ou de vários tipos de lesão.

QUEIROZ TELLES et al., 1992, modificado por QUEIROZ TELLES, 1996.

1. Material biológico:

Raspado de lesão: as amostras foram obtidas e clarificadas com hidróxido de potássio a 10% para a realização do exame direto e para o cultivo em meio ágar Sabouraud (Oxoid) com cloranfenicol e/ou em meio de ágar *Mycose/* (BBL) com cloranfenicol para identificação da cepa isolada.

Cepas: após o crescimento de colônias demácias nos meios de cultura, as cepas foram identificadas como descrito na literatura (Lacaz et al, 1991; Lacaz et al, 1998; McGinnis, 1980), no Laboratório de Micologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêutica da Universidade de São Paulo.

1.1 Obtenção de células mononucleares e de monócitos com Ficoll-Hypaque

Células mononucleares do sangue periférico foram obtidas após coleta de 50ml de sangue através de punção venosa e posteriormente os leucócitos foram separados em Ficoll-Hypaque (Bio Sciences). Após separação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS (Solução Salina de Fosfato Tamponada) (pH 7,2) e utilizadas nos ensaios de linfoproliferação, dosagem de citocinas e citometria.

Para obter-se os monócitos, as células mononucleares, após separação por Ficoll-Hypaque, foram mantidas "in vitro" por 48 horas para aderência e posteriormente utilizadas nos ensaios de dosagens de citocinas e análise das moléculas de superfície.

1.2. Produção de antígeno

Para a produção do antígeno de cromoblastomicose, utilizamos a cepa padrão de *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 26428. O fungo foi cultivado em Ágar Sabouraud por 30 dias a 25°C, e posteriormente foi transferido para recipiente contendo 250 mL de meio líquido Sabouraud (Vetec) e incubado por 21 dias a 30°C sob agitação (Mesa agitadora orbital - Tecnal) constante. Após esse período as células fúngicas foram mortas com timerosal (0,2g/L, Synth) e separadas do fluido por filtração em papel de filtro. O filtrado foi concentrado 10 vezes e dialisado contra água destilada, por 48 horas, obtendo-se assim o antígeno específico.

1.3 Resposta proliferativa a antígenos específicos

Células mononucleares foram incubadas em meio RPMI (Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino, à concentração de 2×10^6 células/mL em placas de cultura, juntamente com antígeno específico, em diferentes concentrações (10 a 200 µg/ml). Após 5 dias, as culturas foram incubadas com timidina- ^3H (1 µCi/orifício, Amersham Biosciences) e 18 horas depois as células foram coletadas em um coletor automático (cell harvester) e a radioatividade incorporada foi analisada em contador de partículas beta. Esses dois últimos procedimentos foram realizados no Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB 4) da Universidade de São Paulo.

1.4 Fenotipagens de linfócitos em pacientes com cromoblastomicose

Células mononucleares do sangue periférico após separação com Ficoll-Hypaque, foram fenotipadas e a quantidade de linfócitos T CD4, CD8 assim como de linfócitos B foram realizados por citometria de fluxo utilizando-se anticorpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD19 (Caltag, Bulingame, Califónia) marcados com fluoresceína.

A análise por citometria de fluxo foi realizada utilizando-se o aparelho (Facscalibur) do Instituto Butantã. Foram analisados 10.000 eventos. Após aquisição de dados, estes foram analisados utilizando o programa Cell Quest.

1.5 Produção de citocinas

Células mononucleares (2×10^6 /mL) foram cultivadas em placas de 24 orifícios na presença ou não do antígeno de *F. pedrosoi*. Após 72 horas de cultura, o sobrenadante foi coletado e estocado a -70°C até o uso. As citocinas (IL-4, IL-10, IFN- γ e TNF- α) foram dosadas por ELISA de captura, utilizando-se anticorpos monoclonais (R&D) contra as citocinas.

Monócitos de sangue periférico após 48 horas de aderência (2×10^6 /mL) foram cultivados em placas de 24 orifícios na presença ou não de LPS (10ng/mL). Após 72 horas os sobrenadantes foram coletados e as citocinas (IL-10, IL-12 e TNF- α) dosadas pela técnica de ELISA de captura.

As condições adotadas no ensaio de ELISA foram as seguintes:

- Sensibilização de placas de microdiluição de 96 poços com anticorpo primário diluído em PBS, de um dia para outro a 4°C ;
- Bloqueio de sítios livres do plástico com PBS contendo 1% de BSA, por 1 hora a temperatura ambiente;
- Incubação dos sobrenadantes de cultura e da curva padrão de citocinas recombinantes diluídas em PBS contendo 1% de BSA, por 2 horas a temperatura ambiente. Lavagem dos poços com PBS – Tween 20 a 0,05%;
- Adição dos anticorpos secundários conjugados a biotina, diluídos em PBS e incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Lavagem dos poços;
- Incubação com conjugado estreptoavidina-peroxidase por 30 minutos a temperatura ambiente. Lavagem dos poços;

- Revelação com orto-fenilenodiamina 1mg/ml diluída em tampão fosfato 0,4M citrato de sódio 0,4M pH 5,3, por 15-30 minutos;
- Bloqueio da reação com H₂SO₄ 4N e leitura das densidades ópticas (DO) em leitor automático, com comprimento de onda de 492nm.

As concentrações de cada citocina nos sobrenadantes foram calculadas com base na equação da reta de regressão linear da curva padrão obtida com citocinas recombinantes murinas.

1.6 Expressão de moléculas de superfície de monócitos

Células mononucleares após separação por Ficoll-Hypaque foram mantidas "in vitro" por 48 horas para aderência dos monócitos em placa de petri. Posteriormente, as células foram marcadas com anticorpo anti-CD80, anti-CD86 e anti-HLA-DR (BD Biosciences Pharmingen, USA), acoplados com fluoresceína, e a média de intensidade de fluorescência (MIF) foi determinada pela análise dos resultados obtidos através de citometria de fluxo, realizada como no item 1.4.

RESULTADOS

Resultados

Relação dos pacientes

Conforme dados apresentados na Tabela 1, foi possível observar o predomínio da doença em indivíduos do sexo masculino (36 sexo masculino e 6 sexo feminino) com idade variando de 33 a 92 anos. Todos os indivíduos apresentaram tempo de evolução da doença bastante prolongado, variando de 2 até 30 anos. Ao exame direto, todas as amostras obtidas dos pacientes foram positivas para células muriformes. Com base na macromorfologia e na micromorfologia das colônias isoladas foram identificadas como amostras de *Fonsecaea pedrosoi*.

Os pacientes referentes ao número 1 ao 29, denominamos de grupo 1, que são os indivíduos atendidos no Maranhão. Pacientes dos números 30 ao 42 foram atendidos no Hospital das Clínicas e foram acompanhados de modo seriado. Em nosso estudo, o paciente com maior tempo de tratamento (número-34), em torno de cinco anos não pode ser considerado curado, em vista da doença recidivante. Esse grupo foi denominado de grupo 2.

Levando-se em consideração os fatores descritos nas Tabelas 2 e 3 foi possível classificar os pacientes em relação à gravidade da doença. Essa classificação foi utilizada para agrupar os pacientes segundo a gravidade da doença.

Tabela 1: RELAÇÃO DE DOENTES COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Pacientes	idade	sexo	Tempo de doença	Gravidade da doença	Tipo de lesão
1	63	M	6 anos	Moderada	Nodulares, papulares e infiltrativas
2	92	F	30 anos	Grave	Tumoral, vegetante
3	54	M	27 anos	Grave	Lesão em placa infiltrativa
4	60	M	20 anos	Grave	Placa vegetante e tumorais
5	70	M	30 anos	Grave	Placa infiltrativa e tumorais
6	76	M	25 anos	Moderada	Placa infiltrativa
7	56	M	8 anos	Moderada	Placa infiltrativa
8	53	M	10 anos	Moderada	Placa infiltrativa
9	69	M	25 anos	Moderada	Placa vegetante
10	71	M	15 anos	Grave	Placa vegetante
11	33	M	6 anos	Moderada	Placa infiltrativa, nódulos e pápulas
12	74	M	10 anos	Moderada	Pápulas, vegetações e cicatricial
13	71	F	2 anos	Moderada	Pápulas e placa infiltrativa
14	66	F	20 anos	Leve	Placa infiltrativa
15	56	M	10 anos	Leve	Placa infiltrativa
16	52	M	6 anos	Moderada	Placa infiltrativa
17	65	M	30 anos	Grave	Polimorfismo lesional
18	66	M	10 anos	Leve	Placa vegetante
19	51	M	20 anos	Grave	Nodulares, nódulos e placa vegetante
20	65	M	20 anos	Leve	Placa vegetante
21	70	F	5 anos	leve	Placa vegetante
22	68	M	25 anos	Moderada	Placa infiltrativa
23	72	M	15 anos	Moderada	Vegetações e placa infiltrativa
24	40	M	3 anos	Leve	Placa vegetante
25	65	M	7 anos	Moderada	Placa infiltrativa
26	66	F	5 anos	Grave	Placa infiltrativa
27	33	M	3 anos	Moderada	Placa vegetante e infiltrativa
28	49	M	4 anos	Grave	Placa vegetante
29	65	M	20 anos	Grave	Placa infiltrativa
30	51	M	3 anos	Moderada	Lesão cicatricial, placa verrugosa.
31	77	M	22 anos	Grave	Tumoral, vegetante.
32	56	M	20 anos	Grave	Tumoral, vegetante.
33	40	M	20 anos	Grave	Placa vegetante e tumorais
34	78	M	20 anos	Grave	Vegetante e tumorais
35	51	M	4 anos	Moderada	Placa infiltrativa e vegetante
36	38	F	7 anos	Moderada	Placa verrugosa
37	36	M	20 anos	Grave	Placa infiltrativa e tumorais
38	28	M	2 anos	Moderada	Lesão nodular
39	52	M	3 anos	Moderada	Lesão nodular
40	57	M	14 anos	Grave	Lesão vegetante
41	52	M	3 anos	Leve	Lesão cicatricial
42	60	M	2 anos	Moderada	Lesão nodular

Resposta proliferativa a antígeno específico:

A análise da resposta linfoproliferativa para antígenos específicos de cromoblastomicose mostrou que células de pacientes com a forma leve da doença apresentaram maiores níveis de proliferação quando comparados com células de pacientes com as formas moderada ou grave da doença (Figura 1). Foi possível também nesses ensaios padronizar a concentração de antígeno a ser utilizado, que foi de 40 $\mu\text{g/ml}$ (dados não mostrados). Esses resultados mostraram que pacientes com a forma grave da doença poderiam apresentar uma inibição antígeno-específica da resposta de células T, contribuindo para aumentar a gravidade da doença.

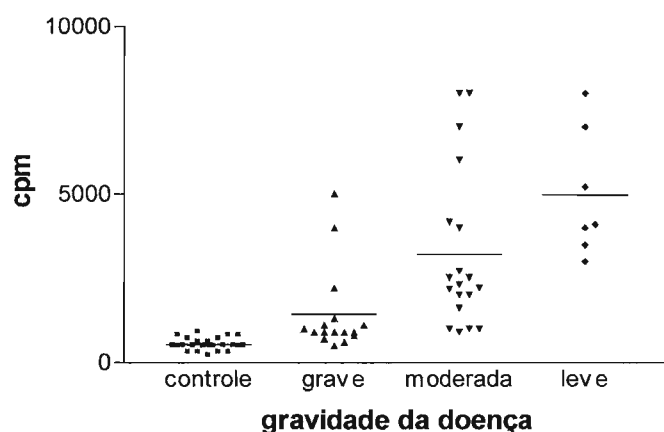


Figura 1: Proliferação de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com diferentes formas de gravidade da cromoblastomicose estimuladas com 40 $\mu\text{g/ml}$ do antígeno específico, quando comparada com indivíduos normais (controle).

Dosagem de citocinas

Para avaliar se os padrões de citocinas secretado por células de pacientes poderiam estar contribuindo para a depressão da resposta proliferativa, foi estudada a produção de IL-4, IL-10, IFN- γ e TNF- α , a partir do sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes estimulados com o antígeno de *F. pedrosoi*. Observamos que em pacientes com a forma grave foi detectada a presença de elevados níveis de IL-10 (Figura 2) juntamente com baixa produção de IFN- γ (Figura 3). Por outro lado, em pacientes com as formas leve da doença observamos aumento da síntese de IFN- γ mostrando uma resposta típica Th1. A forma moderada mostrou ser um padrão misto, ou de transição, que foi possível observar a produção de IL-10 juntamente com uma diminuição da produção de IFN- γ . A produção de TNF- α não foi estatisticamente diferente entre as formas leve, moderada e grave (Figura 4).

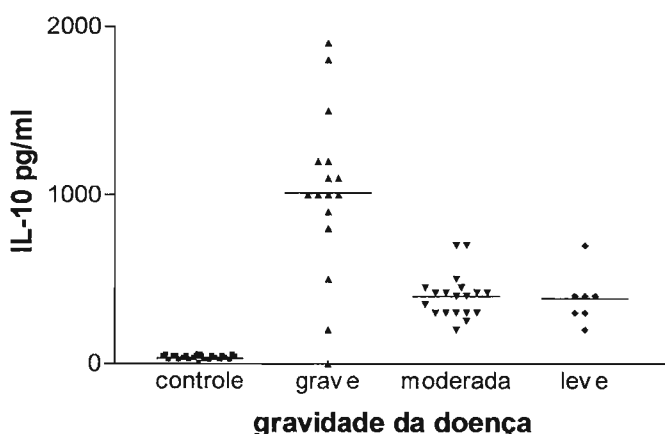


Figura 2: Produção de IL-10 por células mononucleares de sangue periférico de pacientes com diferentes formas de gravidade da cromoblastomicose estimuladas com 40 $\mu\text{g/ml}$ do antígeno específico, quando comparada com indivíduos normais (controle).

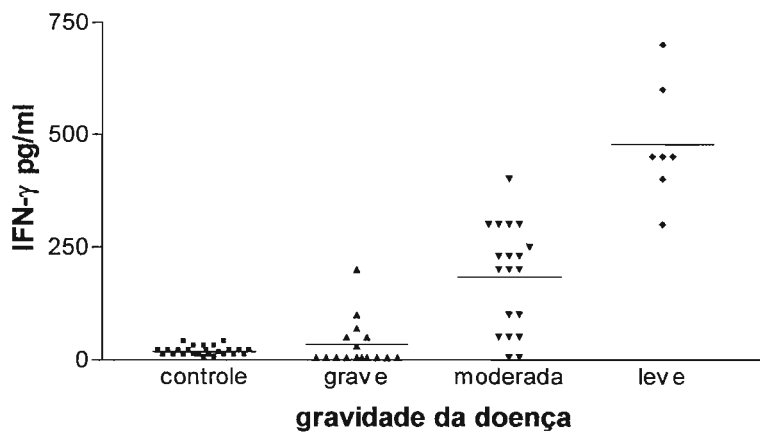


Figura 3: Produção de IFN- γ por células mononucleares de sangue periférico de pacientes com diferentes formas de gravidade da cromoblastomicose estimuladas com 40 $\mu\text{g/ml}$ do antígeno específico, quando comparada com indivíduos normais (controle).

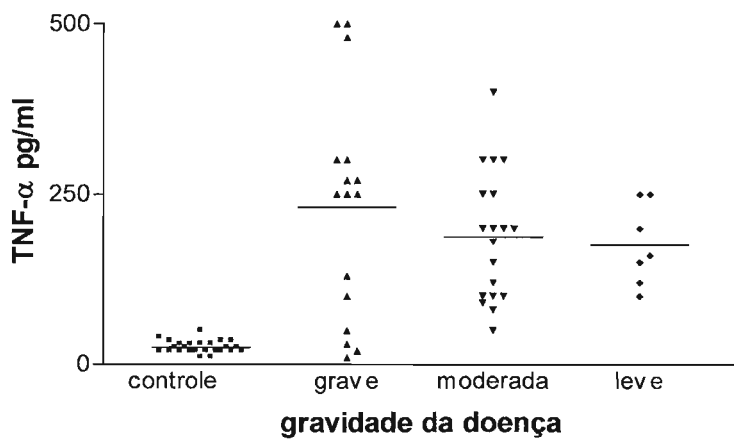


Figura 4: Produção de TNF- α por células mononucleares de sangue periférico de pacientes com diferentes formas de gravidade da cromoblastomicose estimuladas com 40 $\mu\text{g/ml}$ do antígeno específico, quando comparada com indivíduos normais (controle).

Análise do perfil de linfócitos em pacientes com cromoblastomicose

As porcentagens de linfócitos no sangue periférico dos pacientes com cromoblastomicose, não foram diferentes quando a severidade da doença foi analisada (Tabela 4). Apesar de observarmos uma diminuição na porcentagem de linfócitos em pacientes com a forma grave da doença esse decréscimo não foi significativo quando comparados com outras formas da doença ou indivíduos controles. Essa análise foi realizada somente nos pacientes do número 1 ao 29 que são os pacientes que pertencem ao Maranhão (grupo 1).

Tabela 4: Porcentagem de sub-populações de linfócitos de sangue periférico de pacientes com diferentes formas de gravidade da cromoblastomicose

Gravidade da Doença				
marcador	Leve (n=6)	Moderada(n=13)	Grave (n=10)	Controle (n=15)
CD3 ⁺	72±2.1	68±5.1	60±6.1	74±9.7
CD4 ⁺	50±3.3	48±6.3	45±7.0	51±8.8
CD8 ⁺	26±2.8	24±4.1	22±6.8	27±11.6
CD19 ⁺	11±3.7	10±2.8	12±1.9	12±5.5

Próximos resultados foram analisados com pacientes que foram acompanhados durante a terapia antifúngica, grupo 2.

Resposta proliferativa a antígeno específico durante terapia antifúngica:

A análise da resposta linfoproliferativa para antígeno específico de cromoblastomicose mostrou que células mononucleares de pacientes após 6 meses de terapia (itraconazol, terbinafina associadas ou não criocirurgia) apresentaram aumento da proliferação quando comparados com células dos pacientes no início da terapia. Entretanto esses níveis apresentavam-se bastante diminuídos após 12 meses de terapia (Figura 5). Utilizamos a fitohemaglutinina como controle positivo para nossos ensaios de linfoproliferação (Figura 6).

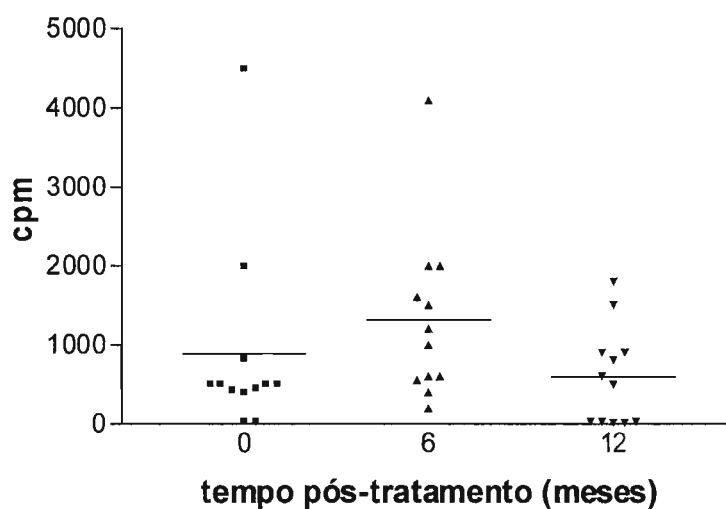


Figura 5: Proliferação de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com cromoblastomicose em diferentes períodos de tratamento estimuladas com 40 µg/ml do antígeno específico.

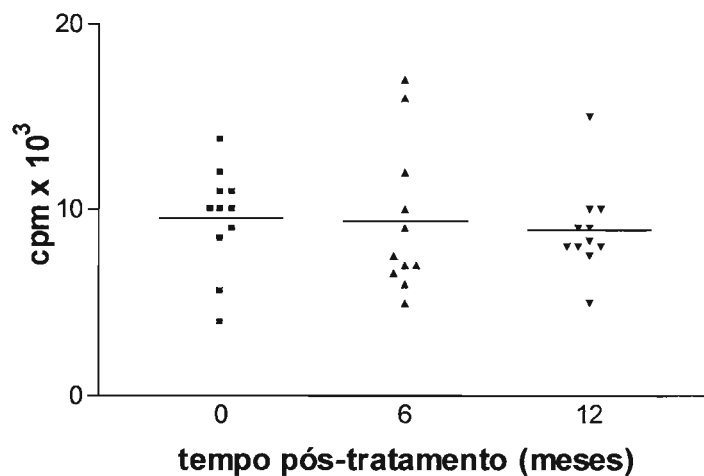


Figura 6: Proliferação de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com cromoblastomicose em diferentes períodos de tratamento estimuladas a fitohemaglutinina (Phy).

Dosagem de citocinas:

Observamos que em pacientes após 6 meses de terapia foi detectada a presença de elevados níveis na produção de IFN- γ (Figura 7) mostrando uma resposta típica Th1. Por outro lado, após 12 meses observamos uma diminuição na produção de IFN- γ juntamente com o aumento na produção de IL-10 (Figura 8). Em nossos ensaios não foi possível detectar IL-4 (Dados não mostrados). A produção de TNF- α não sofreu variação nos níveis de produção nos diferentes períodos de tratamento (Figura 9).

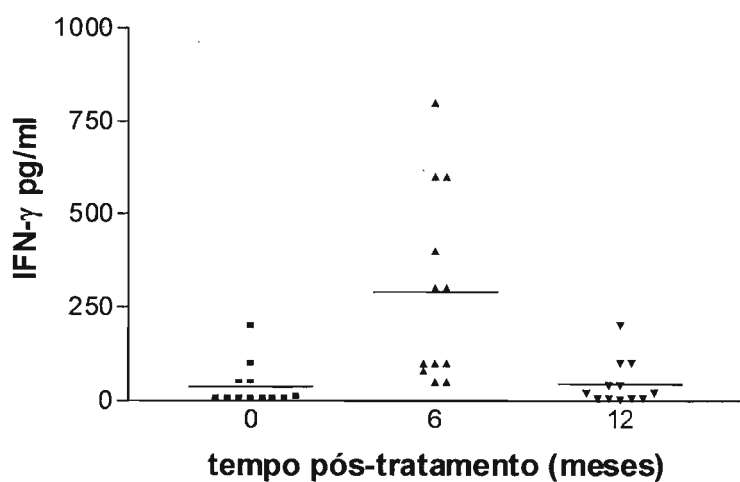


Figura 7: Produção de IFN- γ por células mononucleares de sangue periférico de pacientes com cromoblastomicose em diferentes períodos de tratamento estimuladas com 40 $\mu\text{g/ml}$ do antígeno específico.

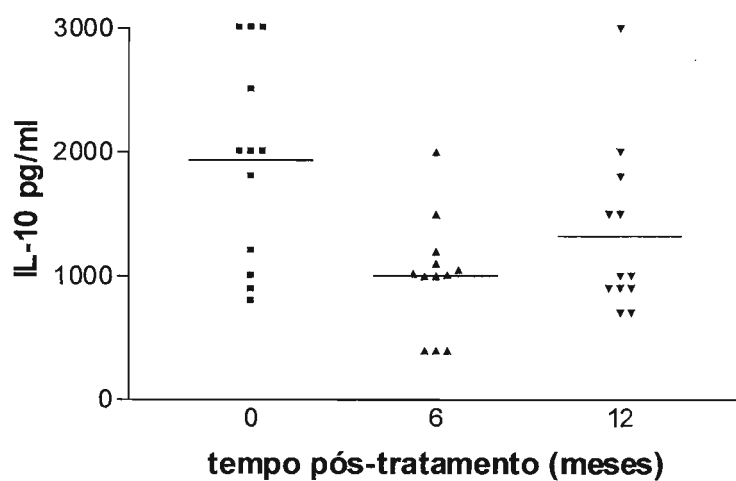


Figura 8: Produção de IL-10 por células mononucleares de sangue periférico de pacientes com cromoblastomicose em diferentes períodos de tratamento estimuladas com 40 $\mu\text{g/ml}$ do antígeno específico.

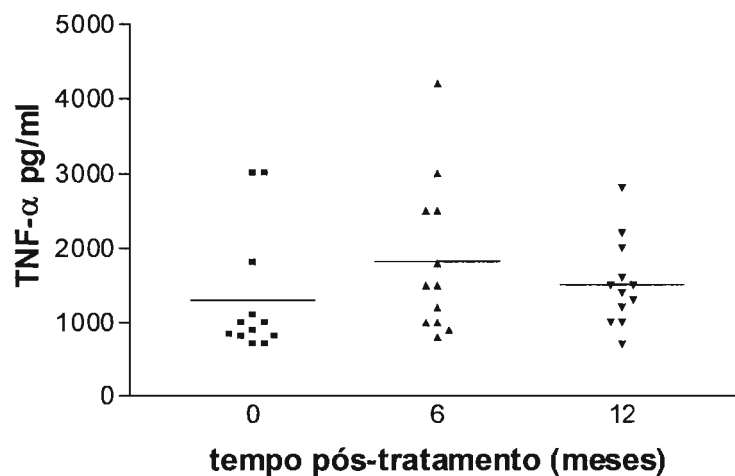


Figura 9: Produção de TNF- α por células mononucleares de sangue periférico de pacientes com cromoblastomicose em diferentes períodos de tratamento estimuladas com 40 μ g/ml do antígeno específico.

Expressão de moléculas da superfície de monócitos:

Para analisarmos a expressão das principais moléculas de superfície, os monócitos foram cultivados por 48 horas, sendo a expressão de HLA-DR, CD80 e CD86 analisadas por citometria de fluxo. A análise dos resultados demonstra que a expressão das moléculas foi significativamente maior em monócitos de pacientes quando comparadas com os controles (indivíduos normais), como mostram as figuras 10, 11 e 12.

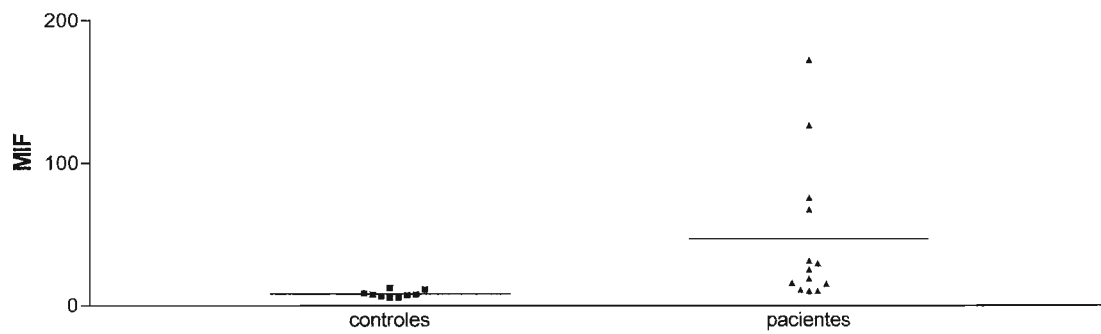


Figura 10: Expressão de HLA-DR por monócitos de pacientes com cromoblastomicose e de indivíduos normais (controle).

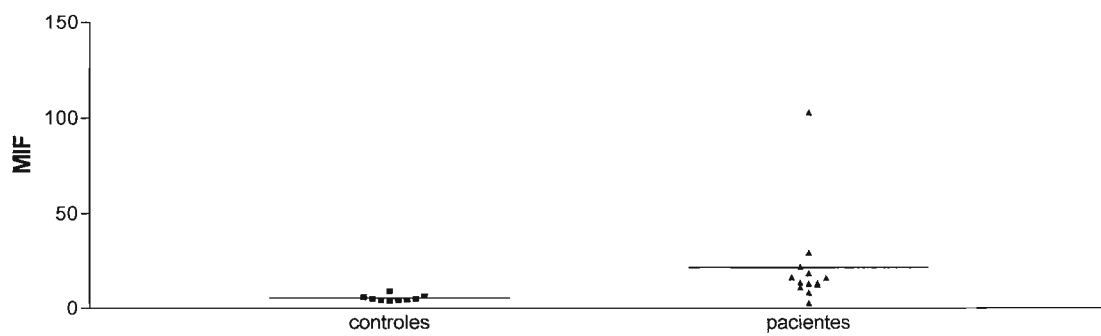


Figura 11: Expressão de moléculas coestimulatórias (CD80) por monócitos de pacientes com cromoblastomicose e de indivíduos normais (controle).

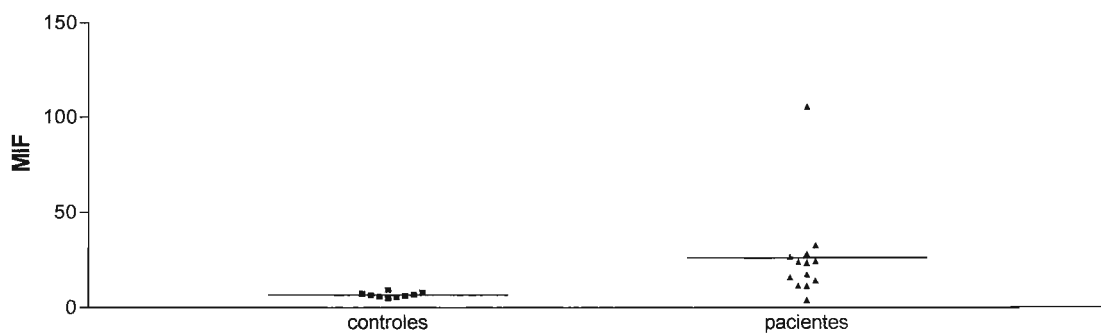


Figura 12: Expressão de moléculas coestimulatórias (CD86) por monócitos de pacientes com cromoblastomicose e de indivíduos normais (controle).

Dosagem de citocinas

Para avaliar se o padrão de citocinas secretado por monócitos de pacientes poderiam estar contribuindo para depressão da resposta imune, observamos que em monócitos de pacientes foi detectada a presença de elevados níveis de IL-12 (figura 13) e de TNF- α (figura 15) quando estimuladas com LPS. Por outro lado, não ocorreu a produção significativa de IL-10 (figura 14).

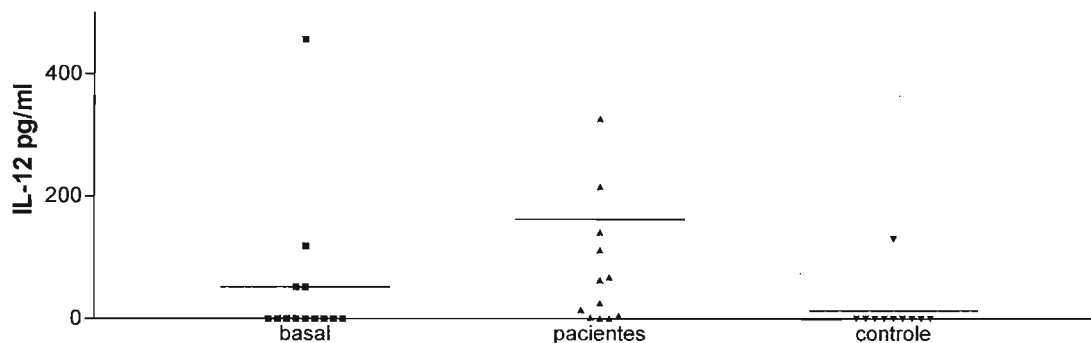


Figura 13: Produção de IL-12 por monócitos de pacientes com cromoblastomicose e de indivíduos normais (controle) estimuladas por LPS. Nível basal = Monócito de pacientes sem estímulo de LPS.

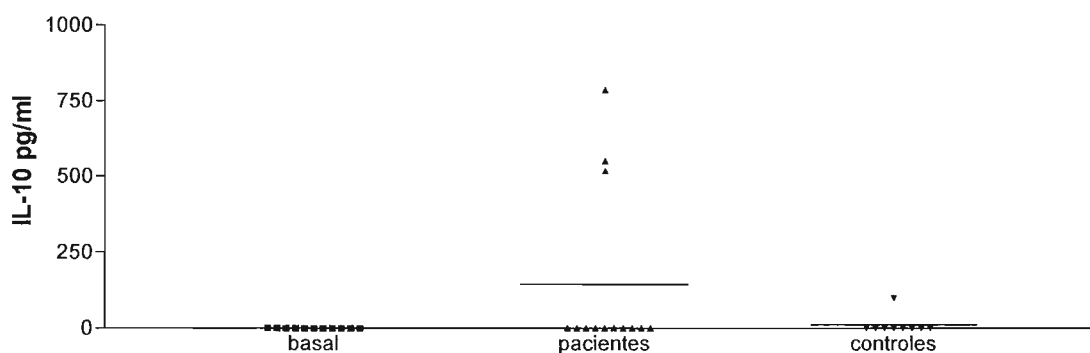


Figura 14: Produção de IL-10 por monócitos de pacientes com cromoblastomicose e de indivíduos normais (controle) estimuladas por LPS. Nível basal = Monócito de pacientes sem estímulo de LPS.

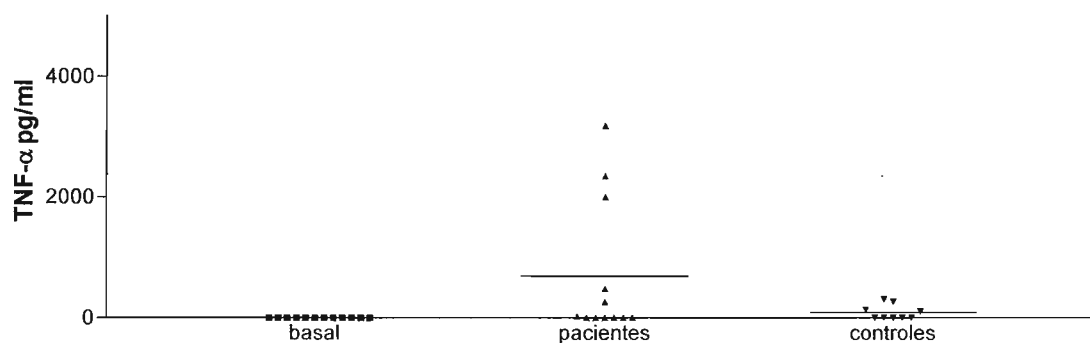


Figura 15: Produção de TNF- α por monócitos de pacientes com cromoblastomicose e de indivíduos normais (controle) estimuladas por LPS. Nível basal = Monócito de pacientes sem estímulo de LPS.

DISCUSSÃO

Discussão

De modo geral, os pacientes que sofrem de cromoblastomicose apresentam algumas características em comum. Assim, entre indivíduos estudados de ambos os grupos do Maranhão ou os pacientes atendidos em São Paulo predominaram os indivíduos do sexo masculino, o que está de acordo com a literatura (CASTRO, 1998), sendo 34 pacientes do sexo masculino e 6 manifestações em indivíduos do sexo feminino (tabela 1). Também em concordância com esta, a maioria dos pacientes pesquisados referiu ocupação voltada à agricultura, com constante contato com plantas e solo.

Na tabela 1 mostramos que na maioria dos pacientes com acompanhamento clínico e micológico, a doença se manifestou entre 3^a e 4^a décadas de vida. Não se sabe se este fato estaria relacionado à inoculação tardia do agente, decorrente do exercício das atividades ocupacionais rurais na vida adulta, ou se a inoculação seria precoce e o tempo de desenvolvimento da doença longo.

Em quase todos os pacientes a localização das lesões era mais freqüente nos membros inferiores, confirmando a prevalência podal dessa micose (Martins et al, 2004). Entretanto entre os pacientes do Maranhão (grupo 1) destacou-se um dos pacientes que apresentava lesão de grande extensão facial e de tronco e entre os pacientes de São Paulo (grupo 2), um paciente apresentava lesões por quase todo o corpo, sendo na face, perna esquerda, nádegas, pé, mão e tronco.

A presença de células muriformes, com ou sem a presença de hifas demacias, observadas ao exame direto das amostras dos pacientes, é comum em

casos positivos da doença em questão (HARADA, 1983, MCGINNINS, 1983). Quanto à identificação das cepas isoladas, verificou-se compatibilidade com os resultados de autores que relataram elevada freqüência de *Fonsecaea pedrosoi* em casos de cromoblastomicose (AL DORRY, 1972; BONIFAZ, et al, 2004; CASTRO, 1998; QUEIROZ-TELLES et al, 1997; SILVA et al, 1992). Em São Paulo e no Maranhão, para todos os casos diagnosticados, o agente etiológico foi *Fonsecaea pedrosoi*. Estudos realizados anteriormente comprovam que o agente mais identificado também foi *F. pedrosoi* (GIMENES, 2003). O mesmo ocorreu com 71 pacientes apresentando cromoblastomicose no estado do Paraná, entre 1985 e 1996, 94,3% dos casos o agente identificado também foi de *Fonsecaea pedrosoi* (DE HOOG et al, 2000).

A resposta imune compreende todos os mecanismos de que o hospedeiro lança para reconhecer ou identificar aquilo que lhe é estranho, reagindo para poder neutralizá-lo ou eliminá-lo, com ou sem prejuízo de seus próprios tecidos (SINGER, 1972). A imunidade celular é constituída pelos mecanismos de defesa mediados principalmente pelos linfócitos T. Estas células ao interagirem com os antígenos transformam-se em linfoblastos, dando origem a células efetoras e células de memória (LACAZ et al, 2002).

Várias evidências em infecções fúngicas em humanos e modelos animais indicam que a imunidade celular é crucial para a defesa do hospedeiro. A resposta imune celular em pacientes com cromoblastomicose foi pouco estudada até o momento. Portanto, nesse estudo a resposta linfoproliferativa e produção de

citocinas induzidos por antígenos de *F. pedrosoi* foram investigados em diferentes formas clínicas da doença.

Foi observado primeiramente que, a resposta imune celular está relacionada com a gravidade da doença (figura 1). Pacientes com a forma grave não induziram linfoproliferação (figura 1). Esses pacientes geralmente apresentam um prognóstico ruim, pois apresentam uma infecção disseminada de longa duração e na maioria das vezes não respondem a terapia. Ao contrário, pacientes com a forma mais benigna da doença (forma leve) apresentaram resposta proliferativa quando comparado com as formas moderada ou grave. Este grupo de indivíduos, na sua maioria, apresenta poucas lesões ou foram considerados curados (Tabela 1).

Pacientes com dermatofitose crônica podem apresentar, com frequência, defeitos na resposta imunológica mediada por células, bem como diminuição dos linfócitos T (BALOGH et al, 1981).

No presente estudo, mostramos que linfócitos de pacientes com a forma grave da cromoblastomicose quando estimulados com antígenos de *F. pedrosoi* secretaram preferencialmente IL-10 e TNF- α (figuras 2 e 4 respectivamente). No entanto, não observamos produção de IL-4, citocina importante em induzir diferenciação para Th2. Uma possibilidade para explicar esse fato foi que pequenas quantidades secretadas não foram detectadas pela metodologia empregada (ELISA). Por outro lado, linfócitos de pacientes com a forma leve produziram elevados níveis de IFN- γ (figura 3). Esses dados sugerem que elevados níveis IFN- γ juntamente com baixos níveis de IL-10 poderiam ser

importantes no controle da cromoblastomicose. Estes dados coincidem com trabalhos publicados anteriormente. Sendo assim, podemos concordar com outros autores e considerar que o tipo de citocina que predomina na cromoblastomicose pode depender da forma clínica da doença (D ÁVILA et al, 2002 ; KURITA, 1979; GIMENES et al, 2005).

Estudo com pacientes com paracoccidioidomicose apresentando diferentes formas clínicas mostraram uma associação entre a ativação de células do tipo Th1 em pacientes com forma leve ou curados, e resposta Th2 com formas graves da doença. Pacientes com infecção disseminada apresentaram uma diminuição da produção de IFN- γ , não responderam a testes de hipersensibilidade do tipo tardia e apresentaram elevados níveis de citocinas como IL-4 e IL-5 (CLEMONS & STEVENS, 2001).

Alguns autores observaram que a reação imune mediada por células nas lesões cutâneas de cromoblastomicose apresenta uma correlação com diferentes formas clínicas da doença. As formações de placas verrucosas estavam relacionadas com a formação de granuloma supurativo onde se observou a presença de várias células fúngicas viáveis na lesão cutânea, entretanto, as formações de placa atrófica estavam relacionadas com granuloma tuberculoide onde apresentam poucas células fúngicas nas lesões cutâneas. Esses resultados sugerem que os pacientes que apresentam lesões verrucosas têm uma resposta imunológica do tipo Th-2 e pacientes com lesões eritematosas atroficas têm uma resposta do tipo Th-1 (D'AVILA et al, 2003).

No modelo de leishmaniose alguns autores acreditam que o mecanismo imunológico da resposta imune celular seja influenciado quando ao aspecto, intensidade e quantidade das lesões. Resolução das lesões cutâneas está associada também com a modulação da resposta celular, enquanto uma alteração da resposta imune parecer ser uma responsabilidade da severidade das lesões nas mucosas (CARVALHO et al, 1985; COUTINHO et al, 1996).

Estudo em modelo experimental tem demonstrado que a resposta imune celular no desenvolvimento da cromoblastomicose que os granulomas, se expandem juntamente com a proliferação fúngica, suprimindo a resposta imune celular (ALVIANO et al, 2004).

Sabemos que os mecanismos de defesa influenciam na manifestação e na gravidade das infecções fúngicas; entretanto, as formas clínicas da doença dependem da resposta imune do hospedeiro (MARR et al, 2002; PUCETTI et al, 1995). Os mecanismos de proteção do hospedeiro contra os fungos são numerosos e estão presentes na evolução da doença

Segundo Yarzabal et al (1980), a resposta imunológica dos pacientes infectados pelo *P.brasiliensis* pode seguir dois rumos distintos; um caracterizado pela positividade aos testes cutâneos com paracoccidioidina, imunidade mediada por células preservada, e outro com testes cutâneos negativos a paracoccidioidina e depressão na imunidade celular. Os autores consideravam a ocorrência de duas formas polares distintas na paracoccidioidomicose: um pólo anérgico e ou um pólo hiperérgico (Lacaz et al, 2002). Sendo assim, de forma mais simplificada podemos caracterizar a cromoblastomicose a ocorrência de duas formas polares

através de alguns dados analisados. O pólo anérgico é caracterizado por pacientes com lesões disseminadas, com imunidade celular comprometida e lesões necrotizantes com riquezas de parasitos nas lesões. O pólo hiperérgico poderia ser caracterizado por pacientes com lesões localizadas ou generalizadas, mas com preservação do estado geral do paciente, imunidade celular preservada, pobreza ou ausência dos parasitas nas lesões. E os quadros clínicos intermediários, estão na dependência do hospedeiro e do parasito.

Nos avaliamos os pacientes do Maranhão (GRUPO 1) e pudemos observar que a maioria desses pacientes que apresentaram a forma grave da doença é caracterizada por diferentes tipos de lesões (tumoral, nodulares e necrotizantes), sendo essas disseminadas, pela maior produção IL-10 e TNF- α . Esses mediadores associados aos baixos níveis de proliferação e produção de IFN- γ . Como consequência esses pacientes não apresentavam uma resposta terapêutica satisfatória, provavelmente devida a uma imunidade celular comprometida. Por outro lado, os pacientes com a forma leve da doença são caracterizados pela produção de elevados níveis de IFN- γ paralelamente com a proliferação de linfócitos e baixos níveis de IL-10 demonstraram uma resposta terapêutica mais favorável.

As porcentagens de linfócitos no sangue periférico dos pacientes com cromoblastomicose, não foram diferentes quando a gravidade da doença analisada na tabela 4. Observamos uma diminuição na porcentagem de linfócitos T CD4 e T CD8 em pacientes com a forma grave da doença, porém esse

decréscimo não foi significativo quando comparados com outras formas da doença e indivíduos controles.

Nossos resultados mostraram que imunidade celular representa um mecanismo importante de defesa do hospedeiro contra o fungo. Mota et al (1985) sugerem que quanto mais deprimida for a resposta imune celular do paciente mais grave será a forma clínica da doença. Entretanto, um dos nossos objetivos foi caracterizar a resposta imune celular em pacientes submetidos a diferentes períodos de tratamento.

Sendo assim, acompanhamos os pacientes atendidos no Hospital das Clínicas de São Paulo (GRUPO 2) para avaliarmos a resposta imune durante o tratamento. Observamos que os pacientes com cromoblastomicose sofreram uma modificação na resposta imune celular. Estes pacientes produziram uma baixa proliferação de linfócitos após um ano de terapia quando comparadas com níveis de proliferação após 6 meses de terapia (figura 5). Esses pacientes geralmente apresentam um prognóstico ruim, foi observado na grande maioria deles uma infecção disseminada de longa duração e na maioria das vezes não responderam a terapia. Essa inversão também ocorreu na produção de citocinas, inicialmente, uma produção significativa de IFN- γ (figura 7). Entretanto, após um ano de tratamento observamos uma diminuição na produção de IFN- γ acompanhado de um aumento de IL-10 (figura 8).

Provavelmente esse aumento na produção de IL-10 estaria contribuindo na inibição da resposta imune. A IL-10 é uma citocina com grande capacidade antiinflamatória e supressora da resposta imune. Assim, a capacidade do

hospedeiro em erradicar o microrganismo está diretamente interligada com a resposta imune celular e não com a terapia antifúngica administrada. Esse fato poderia justificar o fracasso de diversos métodos e quimioterápicos que são empregados em tentativas de cura ou controle da doença, consideramos que o paciente com uma imunidade inapropriada não responde nenhuma a terapia.

Assumindo que a resposta imune efetora é determinada pela ativação de sub classes de linfócitos TCD4 (Th1/Th2), a identificação dessas sub-classes secretando diferentes padrões de citocinas poderia auxiliar no entendimento da regulação da resposta imune na cromblastomicose.

O tipo de citocina que predomina na cromblastomicose depende da forma clínica da doença. As células T de pacientes com a forma grave da doença produzem mais IL-10 e TNF- α , enquanto que a produção de IFN- γ é verificada nos pacientes com a forma leve da doença (D'AVILA et al, 2002; KURITA, 1979). Especula-se que uma produção elevada de IL-10 encontrada principalmente na forma grave da cromblastomicose pode atuar também como um fator agravante inibindo a produção de oxido nítrico por macrófagos, reduzindo assim o controle de proliferação fúngica no organismo. O oxido nítrico resulta da indução da enzima NO-sintase (iNOs), que produz poderosos fatores antifúngicos, e este efeito tem sido demonstrado contra diferentes fungos como: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* e *Histoplasma capsulatum* (SOTTO et al, 2004; PHILIPPE et al, 2003).

A expansão ou acúmulo de IL-10 pode produzir uma regulação nas células T que está associado com um número de infecções crônicas, incluindo hepatite C,

HIV e *Leishmania* (MEGE et al, 2006). Pacientes com leishmania visceral tem apresentado elevados níveis de IL-10 no soro e também elevada expressão de IL-10 no tecido lesional, onde provavelmente a atividade imunossupressora da citocina pode promover a replicação do parasita como a disseminação da doença (NYLÉN ; SACKS, 2007).

Resultados semelhantes também foram verificados em culturas de células de pacientes com HIV, sendo que a produção de IFN- γ foi severamente prejudicada e os níveis de IL-10 foram elevados. Eles também consideram que os níveis elevados de IL-10 secretados por pacientes jovens com AIDS contribuem consideravelmente no controle e replicação do HIV e a inibição de TNF- α não reduz a produção de IFN- γ (ANDRADE et al, 2007).

Outro achado importante dos nossos resultados foi que pacientes com cromoblastomicose em tratamento não conseguem manter elevados os níveis de IFN- γ , o que poderia apresentar um papel determinante para reativação, justificando o surgimento das recidivas tão freqüentes. Em um estudo da patogênese da doença de Chagas experimental, os resultados sugerem que a deficiência de IFN- γ seria o principal determinante para reativação pelo *Trypanosoma cruzi* em hospedeiros imunossuprimidos (RIBEIRO, 2001).

A interação de patógeno com um fagócito induz a produção de citocina. As endotoxinas como LPS, lipossacarídeo bacteriano, estimula a produção de interleucinas como IL-1 e TNF- α por parte dos macrófagos e promovem a expressão de moléculas de superfície (HERNÁNDEZ-URZÚA et al, 2001). O LPS

é considerado um estimulador potente na ativação de monócitos e macrófagos (MOREIRA et al, 2002).

Nossos resultados mostraram uma baixa indução de ativação de linfócitos de pacientes com cromoblastomicose. Sendo assim, fomos avaliar se esse baixo índice de proliferação observado poderia estar relacionado com um funcionamento deficitário de células apresentadoras de antígeno (APCs). Para esclarecer essa hipótese, purificamos monócitos de pacientes e analisamos a expressão de HLA-DR, moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86) e produção de citocinas (IL-12, IL-10 e TNF- α). Nossos resultados mostraram que monócitos de pacientes com cromoblastomicose expressaram níveis mais elevados de HLA-DR e moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86), quando comparados com indivíduos controles (figura 10,11 e 12). Estes resultados podem indicar que os monócitos estão mais ativados, por provavelmente, terem contato com o fungo durante a infecção crônica, que é característica da cromoblastomicose. O mesmo resultado ocorreu quando citocinas foram analisadas, ou seja, monócitos de pacientes produziram níveis elevados de IL-12 e TNF- α quando tratados com um estímulo inflamatório como o LPS (figura 13 e 15). Esses resultados podem indicar que os monócitos dos pacientes estão ativados independente da evolução da doença. Portanto, a deficiência em induzir linfoproliferação observada nos pacientes pode não estar relacionada com um funcionamento deficitário dos monócitos.

Alguns trabalhos relatam que monócitos são capazes de produzir IL-12. Esta citocina tem sido considerada uma peça chave para iniciar uma imunidade

mediada por células e rapidamente induzir a síntese de IFN- γ por linfócitos ativados. O IFN- γ produzida ativa os macrófagos, aumentando a fagocitose, a produção do superóxido nítrico e contribuindo na apresentação do antígeno para os linfócitos. A IL-12 induz a diferenciação de linfócitos Th-1 e promove um aumento na proliferação desses antígenos específicos diferenciando em linfócitos, onde o IFN- γ inibe a expressão de células Th-2 (AHUJA et al, 1998). Os monócitos e as citocinas são elementos importantes para serem utilizadas na estimulação da resposta imune celular do paciente de cromoblastomicose.

Vários estudos têm demonstrado que diferentes manifestações clínicas estão associadas com o distinto complexo parasita e o hospedeiro e uma afinidade diretamente envolvendo o sistema imune (VITELLI-AVELAR et al, 2005). O reconhecimento e ingestão do patógeno e/ou seus contribuintes são acompanhados pela ativação /maturação de células apresentadoras de antígenos, como aumento das moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86), levando na maioria das vezes, uma eficiente resposta imune do hospedeiro, com ativação de células T. No entanto alguns patógenos têm a capacidade de afetar as funções biológicas destas células através da inibição de suas moléculas de superfície, bem como da inibição da síntese de citocinas na ativação de linfócitos do tipo Th1 (FERREIRA, 2003).

Na criptococose vários são os fatores que interferem em sua patogenia, tais como, a produção de ácidos de polissacarídeos da cápsula do fungo, de manitol, de melanina e de fosfolipase no cérebro, onde são abundantes as catecolaminas, sendo a síntese da melanina feita com facilidade (RODRIGUES et al, 1999). É

possível também que a composição da parede celular do fungo *Fonsecaea pedrosoi*, desempenhe papel importante na modulação da resposta imune, principalmente a melanina que facilmente detectada na parede celular (ALVIANO et al, 1991). Os autores sugerem que a melanina da *Fonsecaea pedrosoi* é uma estrutura imunológica ativa que atua na resposta humoral e celular como uma resposta protetora durante a infecção pela *Fonsecaea pedrosoi* (ALVIANO et al, 2004).

Em nossos ensaios não avaliamos a melanina, mas acreditamos que ela também atue na modulação da imunidade celular. Melanina pode atuar como fator de virulência que aumenta a resistência das células fúngicas ao ataque das células efectoras através da redução da fagocitose, proteção ao fungo contra as enzimas hidrolíticas produzidas pelos macrófagos (JACOBSON, 2000) e contra derivados de nitrogênio e oxigênio (ROZENTAL et al, 1994; REISS & NICKERSSON, 1974). A melanina sintética é capaz de impedir *in vitro* a produção de citocinas pró-inflamatória em monócitos de sangue humano (SILVA & FAZIOLI, 1985). A presença de melanina tem um efeito inibitório na fagocitose clássica e protege a *Fonsecaea pedrosoi* contra a destruição das células imune do hospedeiro *in vitro* (ESTERRE ; JAHEVITRA, 2000).

Autores consideram que uma das características da cromoblastomicose é a baixa resposta ao tratamento medicamentoso, principalmente quando as lesões se encontram em fase avançada. O uso do itraconazol demonstrou eficácia semelhante nas formas leves e moderadas, mesmo quando utilizado por períodos prolongados. No entanto, alguns pacientes não evoluem satisfatoriamente com a regressão das lesões, fato que eles consideraram ter ocorrido pela má absorção

da droga no sítio lesional ou por incompetência do sistema imunológico em ajudar a combater os fungos em questão (SANTOS et al, 2004).

A atuação do mecanismo da resposta imune celular apresenta bastante indefinida, mas podem ser um caminho promissor principalmente para esta doença que apresenta muitas dificuldades no tratamento.

Acreditamos que estudos futuros são necessários para determinar os fatores extrínsecos e intrínsecos desta doença. Que através de estudos relacionados com a resposta imune celular possam surgir novas estratégias terapêuticas que possam auxiliar no controle dessa doença e até mesmo a sua cura.

De acordo com nossos resultados e os descritos na literatura, acreditamos que uma terapia específica isolada com antifúngicos não é uma forma eficaz do controle da doença, principalmente devido ao surgimento de recidivas freqüentes. Nós propomos que a imunoterapia pode ser uma ferramenta para auxiliar no tratamento dos pacientes com cromoblastomicose, principalmente aqueles que não respondem a uma terapia convencional administrada atualmente.

CONCLUSÃO

Conclusão:**Em relação a linfoproliferação:**

- A gravidade da doença é dependente da resposta imune celular: baixos níveis de proliferação caracterizam uma forma grave e altos níveis de proliferação caracterizam uma forma leve de cromblastomicose.

Em relação ao padrão de citocinas:

Nos pacientes avaliados:

- Forma grave da cromblastomicose é caracterizada pela produção de IL-10.
- Forma leve da cromblastomicose é caracterizada pela produção de elevados níveis de IFN- γ e baixos níveis de IL-10.

Em relação aos monócitos:

- Os monócitos dos pacientes estão ativados e expressam níveis elevados de moléculas co-estimulatórias, HLA-DR e de secreção de IL-12 e TNF- α , quando estimulados por LPS.

Em relação ao tratamento:

- As células mononucleares dos pacientes após 6 meses de terapia proliferaram e foi detectada a presença de elevados níveis de produção de IFN- γ . Porém, após 12 meses de tratamento ocorreu uma diminuição na produção de IFN- γ e nos níveis de linfoproliferação juntamente com

aumento na produção de IL-10, conseqüentemente uma piora no quadro do paciente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências bibliográficas:

AL-DORRY, Y. *Chromomycosis*. Missoula.: Mountain Press, 1972, 203p.

ALVIANO, C. S.; FARBIARZ, S. R. ; SOUZA, R. W.; ANGLUSTER, J.; TRAVASSOS, L. R. Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melan. *J. Gent. Microbiol.*, Colchester, 137: 837-844, 1991.

ALVIANO, D.S.; FRANZEN, A.J.; TRAVASSOS, HOLANDINO, C.; ROZENTAL, S.; EJZEMBERG, R.; ALVIANO, C.S.; RODRIGUES, M. L. Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of phagocytes. *Infec. Immunity*, 229-237, 2004.

AHUJA, S.S; MUMMIDI, S.; MALECH, H.L; AHUJA, S.K. Human dendritic cell (DC)-based anti-infective therapy: engineering DCs to secret functional IFN-gamma and IL-12. *J. Immunol*, 16:868-876, 1998.

ARANGO, M.; JARAMILO, C.; CORTÉS, A; RESTREPO, A. Auricular chromoblastomycosis caused by *Rhinocladiella aquaspersa*. *Med. Mycol., Plymouth.*, v.32, p. 43-45, 1998.

BARBA-GÓMEZ. J. F.; MAYORGA, J.; MCGINNIS, M.R.; GONZÁLES-MENDOZA, A. Chromoblastomycosis caused by *Exophiala spinifera*. *J. Am. Acad. Dermatol.* 26:367-70. 1992.

BALOGH, É; et al. Serum IgE level and T-cell count in chronic dermatophytosis. *Mykosen*, 24:84-89, 1981.

BARROS, T. F.; RESENDE, M. A. Partial chemical characterization of antigenic preparations of chromoblastomycosis agents. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v.41, n.6, 1-11, 1999.

BRANDT, M. E.; WARNOCK, D. W. Epidemiology, clinical manifestations, and therapy infection caused by dematiaceous fungi. *J. Chemother.*, 15:36-47, 2003.

BITTENCOURT, A.L.; LONDERO, A.T.; ANDRADE, J.F. Chromoblastomicose auricular. Relato de um caso. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.36, n.4, p.381-384, 1994.

BONIFAZ, A.; PAREDES-SOLIS, V.; SAUL, A. Treating chromoblastomycosis with systemic antifungals. *Expert Opin Pharmacother*, 5:247-254, 2004.

BONIFAZ, A.; MARTINEZ-SOTO, CARRASCO-GERARD, E., PENICHE, J. Treatment of chromoblastomycosis with itraconazole, cryosurgery, and combination of both. *Int. J. Dermatol.* 36:542-547, 1997.

BORELLI, D. A clinical trial of itraconazol in the treatment of deep mycoses and leishmaniasis. *Rev. Infect. Dis. Chicago*, v.9, supl.1, p.57-63, 1987.

BOPP, C. Cura da cromoblastomicose por novo método de tratamento. *Méd Cut .A*, v.4, p.285-292, 1976.

BOLZINGER, T.; PRADINAUD, R.; SAINTE-MARIE, D.; DUPONT, B. Traitement de quatre cas de chromomycoses à *Fonsecaea pedrosi* par l'association 5-fluorocytosine itraconazole. *Nouv. Dermat.*, v.10:462-466, 1991.

BRYGOO, E. R.; DESTOMBES, P. Épidémiologie de la chromoblastomycose humaine. *Bull. Inst. Pasteur, Paris*, v.74, p.219-243, 1976.

BRUKS, J.B.; WAKABONGO, M.; MCGINNINS, M.R. Chromoblastomycosis. A fungal infection primarily observed in the lower extremity. *J. Am. Podiatr. Med Assoc.*, v.85, n.5, p.260-264, 1995.

CARVALHO, E. M.; JOHNSON, W. D.; BARRETO, E.; MARSDEN, P. D.; COSTA, J. L. M.; REED, S.; ROCHA, H. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J. Immunol.*, 135: 4144-4148, 1985.

CASTRO, L.G; PIMENTEL, E.R.; LACAZ, C.S. Treatment of chromoblastomycosis by cryosurgery with liquid nitrogen: 15 year's experience. *Int. J. Dermatol.*,42:408-412, 2003.

CASTRO, L. G. M. Tratamento da cromoblastomycose pela criocirurgia com nitrogênio líquido. São Paulo, 1998. 78p. (Tese de doutorado - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo).

CASTRO, L.G.M. Chromomycosis: A therapeutic challenge. *Clin. Infect. Dis.*, Chicago, v.15, p.553-554, 1992.

CHANDLER, F. W.; KAPLAN, W.; AJELLO, L. *A colour atlas and textbook of the histopathology of mycotic diseases*. London, Wolfe Med, p.47-49, 1980.

CLEMONS, K; STEVENS, D A. Overview of host defense mechanisms in systemic mycosis and the basis for immunotherapy. *Semin. Respir. Infect.*, 16:60-66, 2001.

CORRADO, M.L.; KRAMER, M.; CUMMINGS, M.; ENG, R.H. Susceptibility of dematiaceous fungi to amphotericin B, miconazole, ketoconazole, flucytosine and rifampin alone and in combination. *Sabouraudia*, v.20, p.109-113, 1982.

COUTINHO, J. R.; OLIVEIRA, M. P.; DA-CRUZ, A. M.; DE LUCA, P. M.; MENDONÇA, S. C. F.; BERTHO, A. L.; SOONG, L.; MCMAHON-PRATT, D. T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. *Exp. Parasitol.* 84: 144-155, 1996.

D'AVILA, S. C.; PAGLIARI, C.; DUARTE, M. I. The cell-mediated immune reaction in the cutaneous lesion of chromoblastomycosis and their correlation with different clinical forms of the disease. *Mycopathologia*, 156(2): 51-60, 2003

DE HOOG, G. S.; QUEIROZ-TELLES, F.; HASSE, G.; et al. Black fungi: clinical and pathogenic approaches. *Med. Mycol* 38: suppl.1; 243-250, 2000.

DIAZ, M.; NEGRONI, R.; MOMTERO-GEI, F.; CASTRO, L.G..M.; SAMPAIO, S. A.; BORELLI, D.; RESTREPO, A.; FRANCO, L.BRAN, J.L.; ARATHOON, E.G.; et al. A Pan- American 5-year study of fluconazol therapy for deep mycoses in the immunocompetent host. Pan- American Study Group. *Clin. Infect. Dis*, Chicago. v.14, supl.-1, p.68-76, 1992.

DIXON, D. M.; POLAK-WYSS, A. The medically important dematiaceous fungi and their identification. *Mycoses*, Berlin, v.34, p.1-18, 1991.

ESPINEL-INGROFF, A.; WARNOCK, D. W.; VASQUEZ, J. A & ARTHINGTON-SAGGS. In vitro antifungal susceptibility methods and clinical implications of antifungal resistance. *Medical Mycology*, v.38, supp.1, p.293-304, 2000.

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

ESTERRE, P.; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A; RAHARISOLO, C. Histoire naturelle de chromoblastomycosis à Madagascar et dans l'océan indien. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Paris*, v.90, p.312-317, 1997.

ESTERRE,P.; INZAN C.K.; RAMARCEL, E.R.; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A.; RATSIOHARANA, M.; PECARRERE, J.L.; ROIG, P. Treatment of chromomycosis with terbinafina: preliminary results of an open pilot study. *Br. J. Dermatol.*, Oxford. v. 134, suppl.46, p.33-36, 1996b.

ESTERRE, P.; ANDRIANTSIMAVANDY, A.; RAMARCEL, E.R.; PECARRE, J.L. Forty years of chromoblastomycosis in Madagascar : a review. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 55: n.1, p.45-47, 1996.

ESTERRE, P.; PGUERRET, S.; SAINTE-MARIE, D.; PRADINAUD, R.; GRIMAUD, J.A. Cell-matrix patterns in the cutaneous lesion of chromomycosis. *Pathol. Res. Pract.*, v.188: 894-900, 1992.

FRANCO, L.; GOMEZ, I.; RESTREPO. Saperconazole in the treatment of systemic and subcutaneous mycoses. *Int. J. Dermatol. Philadelphia*, v.31, p.725-729, 1992.

FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.*, 25: 5-18, 1986.

FERREIRA, K.S. Modulação da ativação de células dendríticas por *Paracoccidioides brasiliensis*. São Paulo.2003.86p (Tese Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêutica da Universidade de São Paulo).

FUKUSHIRO, R. Chromomycosis in Japan. *Int J. Dermatol.*, v. 22, p. 221-229, 1983.

GARNER, A.; ARATHOON, E.; STEVENS, D. A. Initial experience in therapy for progressive mycoses with itraconazol, the first clinically studied triazole. *Rev. Infect. Dis.*, Chicago, v.22, supl.2, p.161-165, 1987.

GIMENES, V.M.F.; SOUSA, M.G.; FERREIRA, K.S; MARQUES, S.G.; GONÇALVES, A.G.; SANTOS, D.V.C.L.; PEDROSO E SILVA, CM. ALMEIDA. Cytokine and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis, *Microbes. Infec.* 7: 708-713, 2005.

GIMENES, V.M.F. Avaliação da sensibilidade in vitro de agentes causadores de cromoblastomiose frente a diferentes antifúngicos, isolados e associados. São Paulo, 2003 (Tese de Mestrado-Faculdade de Ciências Farmacêutica da Universidade de São Paulo).

GOETTE, D.; ROBERTSON, D. Transepithelial elimination in chromomycosis. *Arch. Dermatol*, v. 120, p. 400-401, 1984.

GUPTA, A. K.; TABORDA, P. R.; SANZOVO, A.D. Alternate week and combination itraconazole and terbinafine therapy for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Brazil. *Med. Mycol.*, 40: 529-534, 2002.

HARADA, S.; KUSUNOKI, T. Scanning electron microscopic observation of the parasitic forms of *Fonsecaea pedrosoi* in human skin lesion. *Mycopathologia*. The Hague, v.82, p33-37, 1983.

HERNANDEZ-URZUA, M.A; ALVARADO-NAVARRO, A. Interleucinas e imunidade innata. *Rev. Biomed.*, 12(4):272-280, 2001.

IBRAHIM-GRANET, O.; DE BIEVRE, C.; JENDOUBI, M. Immunochemical characterisation of antigens and growth inhibition of *Fonsecaea pedrosoi* by species-specific IgG. *J. Med. Microbiol.*, 26 (3): 217-222, 1988.

KURITA, N. Cell-mediated immune response in mice infected with *Fonsecaea pedrosoi*. *Mycopathologia*, 68: 98-12, 1979.

KULLAVANIJAYA, P.; ROJANAVANICH, V. Sucessful treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi* by the combination of itraconazol and cryotherapy. *In. J.Dermatol.*, Philadelphia, v.34, n.11, p.804-807, 1995.

KUMAR, B. KAUR, I.; CHAKRABARTI, A. SHARMA, V. K. Treatment of deep mycoses with itraconazol. *Mycopathologia*. The Hague, v.115, p.169-174, 1991.

JACOBSON, E. J. Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin. Microbiol. Rev*, 13: 708-717, 2000.

LACAZ, C .S. Imunidade humoral e celular nas micoses. *In: Lacaz , C. S.; Porto, E.; Martins J.E.C, Heins-Vaccari, E.M.; Melo, N.T. Tratado de Micologia Médica*. São Paulo: Savier: 830-863, 2002.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. *Guia para identificação: fungos, actinomicetos, algas de interesse médico*. São Paulo: Savier, p.232-237, 1998.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. Cromomicose. *In: Micologia médica, fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. São Paulo: Savier., 8.ed, p.376-386, 1991.

LANE, C.G. A cutaneous lesion caused by a new fungus *Phialophora verrucosa*. *J. Cutan. Dis*, v.33, p.840-848, 1915.

LARONE, D.H. The identification of dematiaceous fungi. *Clin. Microbiol. News*. Washington, v.11, n.19, p.145-152, 1989.

LARONE, D.H. *Medically important fungi- A guide identification*. Whashington: American Society for Microbiology, ASM Press, 3 ed., p.121-128, 1995.

LI, C.; WU, S. Chromoblastomycosis in China. *In: 13° CONG. INT. SOC. HUM. MYCOL. - ISHAM*, Parma, abstr. p.116, 1997.

MARCO, F.; PFALLER, M. A.; MESSER, A. S.; JONES, R. N. Antifungal activity of new triazoles, voriconazole (UK-109,496) compared with three other antifungals agents tested against clinical isolates of filamentous fungi. *Méd. Mycol.*, 36: 433-461, 1998.

MARTINS, L. M. S.; SALMITO, M. A.; MOBIN, M.; LEAL, M. J. S. ; SOUSA, C. D. B.; ALMEIDA NETO, W. S. Cromomicose: epidemiologia, clínica e terapêutica em pacientes de hospital-escola. *In: IV Congresso Brasileiro De Micologia*. Ouro Preto, 2004. Abstr. P.108.

MARR, K. A.; PATTERSON, T.; DENNING, D. Aspergillosis. Pathogenesis, clinical, manifestations, and therapy. *Infec. Dis. Clin. Noth. AM*, 16: 875-894, 2002.

MCGINNIS, M. R.; PASSARELL, L. In vitro evaluation of terbinafina and itraconazol against dematiaceous fungi. *Med. Mycol.*, Plymouth, v.36, p.243-246, 1998.

MCGINNIS, M.R. Chomoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis, and mycology, *J. Am. Acad. Dermatol*, St. Louis, v.8. p. 1-16, 1983.

MCGINNIS, M.R. *Laboratory Handbook of medical mycology*. New York: Academic Press, 661p, 1980.

MCGINNIS, M.R.; PASSARELL, L.; SUTTON, D.A.; FOTHERGILL, A.W.; COOPER JR.; C.R.; RINALDI, M.G.; *In vitro* activity of voriconazole against selected fungi. *Med. Mycol.*, Plymouth, v.36, p.239-242, 1998.

MCGINNIS, M.R.; SCHELL, W.A. The genus *Fonsecaea* and its relationship to the genera *Cladosporium*, *Phialophora*, *Ramichloridium*, and *Rhinoctadiella*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE MYCOSES. *Superficial cutaneous subcutaneous infections*. Caracas, 1980. Pan Am. Health Organ. Sci. Publ, 1980. n.396, p.215-234.

MEDLAR, E. M. Acute infection caused by a new fungus *Phialophora verrucosa* with a study of the fungus. *J. Med. Res.*, v.32, p.507-522, 1915.

MEDOFF, F.; KOBAYASHI, G. A. The polyenes. In: SPELLER, D.; ed. *Ant. Chemotherapy*, New York: Wiley, 1980, p.3-33.

MOTA, N.G.S., IWASSO, M. T. R., PERAÇOLI, M. T. S., AUDI, R. C., MENDES, R. P., MARCONDES, J., MARQUES, S. A; DILLON, N. L. & FRANCO, M. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79:765-772, 1985.

MOREIRA, M.R.; OLIVEIRA, C.A. Study of the activation and spreading process of macrophages induced by different procedures: the effects of cytochalasin B. // www.propp.ufu.br/revista_eletronica/edicao2002/.

MOORE, M.; ALMEIDA, F. Etiologic agents of chromomycosis (chromoblastomycosis of Terra, Torres, Fonseca and Leão, 1992) of North and South America. *Rev. Biol. Hyg*, v.6, 94-97, 1935.

ODDS, F. C.; ARAI, T.; DISALVO, A. F.; EVANS, E. G.V.; HAY, R. J.; RANDAHAWA, H. S.; RINALDI, M. G.; WALSH, T. J. Nomenclatura of fungal disease: a report and recommendations from a sub-committee of the International Society fo Human and animal Mycology (ISHAM). *J.Med. Vet. Mycol.*; Dorchester, v.30, p. 1-10, 1992.

OKEKE, C.N; GUGNANI, H.C. *In vitro* sensitivy of environmental isolates of pathogenic dematiaceous fungi to azole compounds and a pheylpropyl-morpholine derivative. *Mycopathologia*. The Hague, v.99, p. 175-181, 1987.

PADHYE, A. A.; HAMPTON, A. A.; HAMPTON, M.T.; HUTTON, N. W.; PREVOST-SMITH, E.; DAVAS, M.S. Chomoblastomycosis caused by *Exophiala spinifera*. *Clin. Infect. Dis*. Chicago. v.22, p. 331-335, 1996.

PEDROSO, A.; GOMES, J.M. Sobre quatro casos de dermatite verrucosa produzida pela *Phialophora verucosa* . *Ann. Paulistas de Medicina e Cirurgia*, São Paulo, v.11. p.53-61, 1920.

PERAÇOLI, M.T.S. Paracoccidioidomicose experimental do hamster. Estudo da imunidade celular e humoral, correlação com a morfologia das lesões de inoculação e disseminação. São Paulo, 1978. (Tese de Mestrado. Escola Paulista de Medicina).

PIVETA, M. Dá malaria ás doenças emergentes. *Ciência Medicina*. Pesquisa Fapesp, n73, p.31-39, 2002.

PIMENTEL, E. R.; CASTRO, L. G.; CUCE, L. C.; SAMPAIO, S. A. Treatment of chromomycosi by cryos eleven cases. *J. Dermatol. Surg. Oncol.*,15(1):72-77, 1989.

PHILIPPE, B.; IBRAIM-GRANET, O.; PREVOST, M.C.; GOUGEROT-POCIDALO, M.A.; SANCHEZ PEREZ, M.; VAN DE MEEREN, A.; LATGE, J.P. Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infect. Immun.*71: 3034-3042, 2003.

POIRRIEZ, J; BREUILLARD, F.; FRANCOIS, N.; FRUIT, J.; SENDID, B. GROSS, S.; DEI-CAS, E. A case chormomycosis treated by a combination of crytherapy, shing, oral 5-fluorocytosine, and oral amphotericina B. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, v.63, p'.61-63, 2000.

PUCCETTI, P.; ROMANI, L.; BISTONI, F. A th1-th2-like switch in candidiasis: new perspectives for therapy. *Trends. Microbiol.*, 3: 237-240, 1995.

QUEIROZ-TELLES, F. A cromoblastomicose no Estado do Paraná: etiologia, epidemiologia, clínica e terapêutuca com itraconazol. *Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.*, Brasília, v.30, n.4, p.345-346, 1997.

QUEIROZ-TELLES, F.; WANKE, B. W.; MONTEIRO, P. C. F.; BORDIGNON, G. F.; RAMOS, L. R.; LONDERO, A. T. Chromoblastomycosis caused by different species of *Exophiala*. In: XXXII CONGRESSO DA SBMT,1996. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*: 29, supl 1, p.117.

QUEIROZ-TELLES, F.; WANKE, B. W.; MONTEIRO, P. C. F.; BORDIGNON, G. F.; RAMOS, L. R.; LONDERO, A. T. Chomoblastomicose caused by different

species of *Exophiala*. In: XXXII CONGRESSO DA SBMT, 1996a. *Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.*, v.29. supl 1. p. 117.

QUEIROZ-TELLES, F.; PURIM, K.S. FILLUS, J. N. BORDIGNON, G. F.; LAMEIRA, R. P.; CUSTEM, J. V. CAUWENBERGH, G. Itraconazole in the treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*. *Int. J. Dermatol.*, Philadelphia, v.31, p. 805-812, 1992.

RESTREPO, A. Treatment of tropical mycosis. *J. Am. Acad. Dermatol.*, St. Louis, v.31, supl. 3Pt2, p. 91-102, 1994.

RESTREPO, A; GONZÁLEZ, A.; GOMEZ, I; et al. Treatment of chromoblastomycosis with itraconazole. *Ann. Ny. Acad. Sci.*, 544:504-516, 1988.

REISS, E.; NICKERSSON, W. Control of dimorphism in *Phialophora verrucosa*. *Sabouraudia*, 12: 202-213, 1974.

RIBEIRO, V. M. L. Envolvimento de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão celular na patogênese da doença de Chagas experimental. *Am J. Pathol*, 159: 1723-1733, 2001.

RIBEIRO DE JESUS, A.; ALMEIDA, R.P.; LESSA, R.P. BACELLAR, O; CARVALHO, E.M. Citokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz.J. Méd. Biol. Res*, 31: 143-148, 1998.

RICHARDSON, M.D.; WARNOCK, D.W. Fungal infection: diagnosis and management. Oxford: Blackwell, 1993, p.17-42.

RIPPON, J.W. The subcutaneous mycoses- Chromoblastomycosis. In: Rippon, J. W. *Medical Mycology . The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1982, p.276-296.

RYGOO, E.R.; DESTOMBES, P. Épidémiologie de la chromoblastomycose humaine. *Bull. Inst. Pasteur.*, Paris, v.74, p.219-243, 1976.

RODRIGUES, M.L; et.al. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*: virulence factors and immunological mechanisms. *Microbe and Infections*, 1: 293-301, 1999.

ROSAS, A. L.; MACGILL, R.S.; NOSANCHUK, J. D.; KOZEL, T. R.; CASADEVALL, A. Activation of the alternative complement pathway by fungal melanins. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*, 9: 144-148, 2002.

ROZENTAL, S.; ALVIANO, C.S.; SOUZA, W. The in vitro susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* to activated macrophages. *Mycopathologia*, 126: 85-91, 1994.

RUDOLPH, M. Über die Brasilianische "Figuera" (Vorläufige Mitteilung). *Arch. Schiffs-Tropenhyg.*, v.18, p.498-499, 1914. Apud: CASTRO, R.M.; CASTRO, L.G.M. On the priority of Description of chromomycosis. *Mycosen*. Berlin. V.30, n.9. p.397-403, 1987.

SANTOS, D. W. C. L.; COSTA, J. L. C.; MARQUES, S.G.; SILVA, R. R.; RESENDE, M. A.; GONÇALVES, A. G; ALMEIDA, S. R.; AZEVEDO, C. M. P. Cromoblastomycose: resposta terapêutica ao itraconazol. In: IV Congresso Brasileiro De Micologia. Ouro Preto, 2004. Abstr. P.108.

SALGADO, C. G.; SILVA, J. P.; SILVA, M. B.; COSTA, P. F.; PEREIRA, S. S. M.; SALGADO, U.I. Cromoblastomycose por *Fonsecaea pedrosoi*: aspectos clínicos

de 49 casos do Estado do Pará..In: IV Congresso Brasileiro De Micologia. Ouro Preto, 2004. Abstr. P.107

SALGADO, C. G.; SILVA, J. P.; SILVA, M. B.; COSTA, P. F.; SALGADO, U. I. Cutaneous diffuse chromoblastomycosis. *Infection Dis*, 5:528, 2005.

SHELL, W. A.; PASARELL, L.; SALKIN, I.F.; MCGIINIS, M. R. *Bipolares, Exophiala, Scedosporium, Sporothix*, and other dematiaceous fungi. In Murray, P. R; Baron, E. J; PFALLER, M. A; Tenover, F. C and Yoken, R. H. (eds), *Manual of Clinical Microbiology*, 7. ed. Washington: American Society of Microbiology, AMS Press, 1999, p.1295-1313.

SHER, A ; COFFMAN, R L. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *An. Rev. Immunol.*, 10:385-398, 1992.

SPELLER, D. C. E.; WARNOCK, D.W. Sensitivity and resistance to antifungals. *J. Antimicrob. Chemother.*, London, v.15: 514-517, 1985.

SILVA, A. C. M.; NETO, A. S.; GALVÃO, C. E.; MARQUES, S.; SALDANHA, A. C.; SILVA, C. C. M.; FISCHMAN, O.; SILVA, R. R.; COSTA, J. M. L. Cromoblastomicose produzida por *Fonsecaea pedrosoi* no estado do Maranhão. I - Aspectos clínicos, epidemiológicos e evolutivos. *Rev. Societ. Bras. Med. Trop.* 25: 37-44, 1992.

SILVA, C. L.; FAZILLOI, R.A. Role of the fungal cell wall in the granulomatous response of mice to the agents of chromomycosis. *J. Med. Microbiol*, 20: 299-305, 1985.

SILVA, J.P.; SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Chromoblastomycosis: A retrospective study of 325 cases on Amazonic region (Brasil). *Mycopathologia*. The Hague, v. 143, p.171-175, 1999.

SINGER, L.M. Immunology of bacterial and fungal infections. *Mt. Sinai J Med*, 44: 60-72, 1972.

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

TERRA, F.; TORRES, M.; FONSECA FILHO, O.; ARÊA LEÃO, A.E. Novo topo dermatite verrucosa; micose por *Acrotheca* com associação de leishmaniose. *Brasil Médico*, v. 36, p. 363-368, 1922. Apud: AL-DOORY, Y. Chromomycosis. Missoula: Mountain Press, 1972, 203p.

UNGPAKORN, R.; REANGCHAINAM, S. Pulse itraconazole 400mg daily in the treatment of chromoblastomycosis. *Clinical Exp. Dermatology*, 31: 245-247, 2006.

UNANUE, E. R.; ALLEN, P.M. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science*, 236:551-557, 1987.

VANDEN BOSSCHE, H. Mechanisms of antifungal resistance. *Revista Iberoamericana de Micología*, Bilbao, v.14, p.44-9, 1997.

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J.D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibility to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrob. Agents. Chemother*, 46: 3394-3400, 2002.

VITELLI-AVELAR, D. M.; SATHLER-AVELAR, R.; DIAS, J. C. P.; PASCOAL, V. P. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; LAGE, P.S.; ELÓI-SANTOS, S. M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56-

natural killer T cells and CD4 +CD25 high regulatory T lymphocytes. *Scandinavian J. Immunol*,62: 297-308, 2005.

VIDAL, M. S. M.; CASTRO, L. G. M.; CAVALCANTE, S. C. ; LACAZ, C.S. Highly specific and sensitive, immunoblot-detected 54 kDa antigen from *Fonsecaea pedrosoi*. *Medical Mycology*, 42: 511-515, 2004.

VILLALBA, E.; YEGRES, J.F. Detection of circulating antibodies in patients affected by chromoblastomycosis by *Cladosporium carrionii* using double immunodiffusion. *Mycopathologia*, 102 (1): 17-19, 1988.

ZEPPENFELDT, G.; RICHARD-YEGRES, YEGRES, F.; HERNÁNDEZ. R. *Cladosporium carrionii*: hongo dimófico en caractáceas de la zona endémica para la cromomicosis en venezuela. *Rev.Iberoam. Micol.*, v. 11, p.61-63, 1994.

YARZÁBAL, L A. Demonstration and quantification of IgE antibodies against *P. brasiliensis* in paracoccidioidomycosis. *Int. Arch.Allergy*, 63:346-351, 1980.

YOSHIDA, T.; JONO, K.; ONOGI, K. Modified Agar dilution susceptibility testing method fo determinig *in vitro* activities of antifungal agents, including azole compounds. *Antimicrob. Agents. Chemother*, Washington, v.41, p. 1349-1351, 1997.

YU, R. Sucessful trestment of chomoblastomycoisi with itraconazole. *Mycoses Berlin*, v.38, p. 79-83, 1995.

YU, R. Y.; GAO, L. Chomoblastomycosis successufully treated with fluconazole. *Int. J. Dermatol*, v. 33, p. 716-719, 1994.

WHEELER, M. H; BELL, A. A. Melanin and their importance in pathogenic fungi.
In; MCGINNIS, M. R. ed. *Current topics in medical mycology*, v.2. New York:
Spindler-Verlag, 1987, p.338-387.

ANEXOS



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 054/2004

São Paulo, 02 de junho de 2004.

Ilmo(a). Sr(a).
Viviane Mazo Fávero Gimenes

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 31 de maio p.p., **APROVOU** o projeto "Estudo da resposta imune celular em pacientes com cromoblastomicose" (Protocolo nº 251), apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 196/96 da CONEP, projetos realizados em mais de uma instituição necessitam de aprovação dos CEPs das entidades, portanto, solicitamos que seja anexada cópia do CEP do HCFMUSP, quando oportuno.

Lembramos, ainda, que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Profª. Drª. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP,

Orientador: Prof. Sandro Rogério de Almeida
FBC

APROVAÇÃO


A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 12.07.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 614/06 , intitulado: "Estudo da resposta imune celular em pacientes com cromoblastomicos" apresentado pelo Departamento de **Dermatoologia**, inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Prof.Dr. José Eduardo Costa Martins**

Pesquisador(a) Executante : **Viviane Mazo Fávero Gimenes**

CAPPesq, 12 de julho de 2006.


PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO

NÃO FOI AUTORIZADA A INCLUSÃO DOS
ARTIGOS NESTE ARQUIVO