

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Interação de *Trichophyton rubrum* com macrófagos
peritoneais de camundongos

Marina Reis de Moura Campos

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

São Paulo
2004

Marina Reis de Moura Campos

Interação de *Trichophyton rubrum* com macrófagos
peritoneais de camundongos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida
orientador/presidente

Valderez Gambale

1º. examinador

Célia Regina Whitaker Carneiro

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
RESUMO	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Dermatófitos	1
1.1.1. <i>Trichophyton rubrum</i>	5
1.2. Imunologia das Dermatofitoses	6
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Crescimento e identificação do Fungo	17
3.2. Produção de exoantígeno de <i>T.rubrum</i>	17
3.3. Dosagem protéica	17
3.4. SDS-PAGE do exoantígeno	17
3.5. Conídios de <i>T.rubrum</i>	18
3.5.1. Meio de cultura utilizado	18
3.5.2. Obtenção de conídios de <i>T.rubrum</i>	18
3.6. Animais.....	18
3.7. Obtenção de macrófagos	19
3.8. Ensaio de fagocitose	19
3.8.1. Partículas de zymosan em presença de exoantígeno de <i>T.rubrum</i> ...	19
3.8.2. Conídios de <i>T.rubrum</i> em presença do exoantígeno	20
3.8.3. Conídios de <i>T.rubrum</i> na presença de manana.....	20
3.9. Expressão de moléculas de superfície de macrófagos	20
3.10. Dosagem de citocinas e liberação de óxido nítrico	21
3.10.1. TNF- α	22
3.10.1.1. Cultura de células L929.....	22
3.10.1.2. Produção de soro rico em TNF	22
3.10.1.3. Determinação da atividade do TNF através de ensaio de citotoxicidade sobre células L929	22
3.10.2. IL12 e IL-10	23

3.10.3.	Óxido nítrico	24
3.11.	Análise de viabilidade de conídios de <i>T.rubrum</i> após fagocitose por macrófagos	24
3.12.	Viabilidade de macrófagos.....	25
3.13.	Dosagem da enzima desidrogenase láctica	25
3.14.	Microscopia Eletrônica.....	26
3.15.	Análise estatística.....	26
3.16.	Fluxograma dos ensaios realizados.....	27
4.	RESULTADOS.....	28
4.1.	Obtenção da cepa	28
4.2.	Perfil protéico	28
4.3.	Ensaio de Fagocitose	29
4.3.1.	Partículas de zymosan em presença de exoantígeno de <i>T.rubrum</i> ...	29
4.3.2.	Conídios de <i>T.rubrum</i> em presença de exoantígeno deste fungo	30
4.3.3.	Conídios de <i>T.rubrum</i> em presença de manana.....	32
4.4.	Expressão de moléculas de superfície de macrófagos na presença de exoantígeno e conídios de <i>T.rubrum</i>	34
4.5.	Dosagem de citocinas e liberação de óxido nítrico	36
4.6.	Análise de viabilidade de conídios de <i>T.rubrum</i> fagocitados por macrófagos	37
4.7.	Viabilidade de macrófagos	39
4.7.1.	Microscopia óptica	39
4.7.2.	Densidade óptica	40
4.8.	Comparação da viabilidade de macrófagos após fagocitose de conídios de <i>T.rubrum</i> e sob a ação do seu exoantígeno.....	41
4.9.	Viabilidade de macrófagos após fagocitose de conídios de <i>T.rubrum</i> cultivados com anti-TNF- α ou anti-IL-10	43
4.10.	Dosagem da enzima desidrogenase láctica	44
4.11.	Microscopia Eletrônica.....	45
5.	DISCUSSÃO.....	46
6.	CONCLUSÕES.....	51
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

- APCs** - Células Apresentadoras de Antígeno
- BCG** - Bacilo de Calmette-Guérin
- BSA** - Albumina de soro bovino
- CD** - "Cluster of Differentiation"
- DO** - Densidade Óptica
- EDTA** – Ácido Etilenodiaminotetracético
- ELISA** - "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay"
- FITC** - Isotiocianato de Fluoresceína
- GM-CSF** - Fator de crescimento celular de monócitos e granulócitos
- HLA** - Antígeno leucocitário humano
- IFN- γ** - Interferon-gama
- IL** - Interleucina
- kDa** - KiloDalton
- LPS** - Lipopolissacarídeo
- MHC** - Complexo Principal de Histocompatibilidade
- MIF** - Média de Intensidade de Fluorescência
- MOC** - Microscópio Óptico Comum
- NO** - Óxido nítrico
- OPD** - Orthophenylenediamine
- PBS** - Solução Salina de Fosfato Tamponada
- PE** - Ficoeritrina
- RPMI** - meio de cultura "Roswell Park Memorial Institute - 1640"
- SFB** - Soro Fetal Bovino
- SDS-PAGE** - Eletroforese em gel de Poliacrilamida Dodecil Sulfato de Sódio
- SPF** - "specific pathogens free"
- TCR** - Receptor de Célula T
- Th** - Linfócitos T auxiliar
- TNF** - Fator de Necrose Tumoral
- UFC** - Unidades Formadoras de Colônias

RESUMO

Trichophyton rubrum, importante agente de dermatofitoses, é um fungo queratinofílico, capaz de parasitar tecidos como pele e unha. É o principal responsável pelas dermatofitoses crônicas e refratárias ao tratamento e como é uma espécie antropofílica encontra-se muito bem adaptado ao parasitismo humano. Por tratar-se de uma micose cutânea, torna-se necessário o estudo dos fenômenos que ocorrem durante o encontro deste fungo com uma das principais células do sistema imunológico que primeiramente reconhecem o antígeno. Assim sendo, o objetivo deste trabalho é estudar a interação de *T.rubrum* com macrófagos, para aumentar o conhecimento dos mecanismos envolvidos na resposta imunológica nesta importante patologia.

Para isso, foram realizados ensaios de fagocitose de conídios de *T.rubrum*, seguidos da análise da expressão de moléculas de superfície celular, dosagem de citocinas e viabilidade de macrófagos. Verificamos que o exoantígeno de *T.rubrum* provocou diminuição da fagocitose de conídios e partículas de zymosan pelos macrófagos. Entretanto, o exoantígeno não interferiu na expressão de moléculas de superfície celular e não foi capaz de estimular os macrófagos a secretar TNF- α , IL-12, IL-10 e óxido nítrico.

Já os conídios fagocitados por macrófagos, provocaram diminuição significativa na expressão de suas moléculas de superfície, tais como MHC classe II, CD80 e CD54. Após fagocitose de conídios, os macrófagos foram capazes de secretar uma grande quantidade de TNF- α e IL-10 e após 8 horas de cultivo, os conídios internalizados iniciaram processo de formação de hifa, provocando lise e a conseqüente morte destas células.

Por estes achados e pelos estudos prévios já realizados com o *T.rubrum*, pensamos que a persistência desta infecção fúngica possa estar relacionada com a ação inibitória do fungo sobre os macrófagos, levando à cronicidade observada nestas lesões.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dermatófitos

As dermatofitoses são infecções fúngicas dos tecidos queratinizados, como pele, pêlo e unha causadas por dermatófitos. Este grupo de fungos representa 45 espécies agrupadas em três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. Os agentes etiológicos mais frequentes dessas micoses no homem são *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans* e, mais raramente, *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum canis*. A distribuição geográfica das espécies de dermatófitos é muito variada; algumas, como o *Trichophyton rubrum*, são cosmopolitas, encontradas no mundo inteiro, enquanto outras são mais restritas¹.

A infecção por dermatófitos afeta aproximadamente 40% da população mundial e representa 30% de todas as infecções micóticas cutâneas. Tinea ungueum são as mais frequentes das doenças das unhas, representando de 18 a 40% de todas as onicopatias².

O contágio pode ocorrer por contato direto com seres humanos, animais ou solo contaminado através de espécies antropofílicas, zoofílicas e geofílicas, respectivamente ou indiretamente por exposição a fômites contaminadas³. Esta distribuição dos dermatófitos está intimamente ligada ao seu habitat natural e determina não apenas os principais reservatórios das espécies, como também contribui para a compreensão das diferentes características clínicas das infecções dermatofíticas, como, por exemplo, o sítio cutâneo geralmente infectado, grau de infecção produzido e cronicidade das infecções⁴.

No homem, as espécies zoofílicas geralmente causam tinhas agudas, com lesões inflamatórias, bem delimitadas, de fácil tratamento e que conferem ao indivíduo um certo grau de resistência à reinfecção. Já as espécies antropofílicas, especializadas para a vida parasitária e perfeitamente adaptadas ao tecido queratinizado humano, tendem a produzir infecções menos inflamatórias e mais crônicas, sendo as responsáveis pela maioria dos casos de dermatofitose⁵. As lesões causadas por estas espécies apresentam

evolução lenta e os pacientes cronicamente infectados não respondem bem à terapia antifúngica^{6,7}. A maioria dos estudos mostra que 2/3 das espécies de dermatófitos associadas à doença em seres humanos são antropofílicas⁸.

Acredita-se que as estruturas fúngicas, responsáveis pelo contágio, especialmente em dermatófitos antropofílicos, sejam estruturas denominadas artroconídios, que são visualizados em cabelos e escamas epidérmicos infectados. Estas estruturas podem permanecer viáveis no meio ambiente durante anos⁹.

As dermatofitoses, na clínica médica, recebem o nome da localização topográfica da doença, conjugada à palavra tinha ou *tinea*. O termo tinha originou-se da expressão “tinea”, usada pelos romanos para descrever as infecções dermatofíticas, devido ao seu aspecto que lembrava o efeito das traças nas roupas de lã. Assim, as dermatofitoses são classificadas como: *tinea capitis*, *tinea corporis*, *tinea manuum*, *tinea barbae*, *tinea pedis*, *tinea unguium*, *tinea cruris* e outros⁴.

As tinhas dos pés (região plantar e interdígitos) e das unhas dos pés, estão entre as formas clínicas mais comuns em adultos de todo o mundo. Estas infecções são geralmente de evolução crônica, sendo o *T.rubrum* o agente etiológico mais freqüente, seguido do *T.mentagrophytes* var. *interdigitale*^{10,11,12}.

Além de lesões cutâneas superficiais, os dermatófitos, principalmente os do gênero *Trichophyton*, podem provocar processos profundos, atingindo a derme, a hipoderme e até órgãos profundos. Hoje em dia, com o emprego sistêmico ou local de corticóides em hospedeiros comprometidos, muitas dermatofitoses assumem características aberrantes com localizações até viscerais provocadas principalmente por *T.rubrum*, *T.violaceum* e *T.verrucosum*.

Uma das formas de acometimento profundo por dermatófito é o chamado granuloma tricofítico de Majocchi, uma foliculite e perifoliculite granulomatosa, com nódulos e placas infiltradas, quase sempre provocadas pelo *T.rubrum*. Esta forma de granuloma, descrita em 1883 por Majocchi, pode ser nodular, isolada ou difusa¹. Os pacientes acometidos, usualmente têm uma

doença de base. Blank descreveu, em pacientes com mecanismo de defesa celular diminuído ou alterado, infecção acompanhada pela formação de numerosos nódulos subcutâneos e abscessos. A biópsia demonstrou a invasão dos tecidos por hifas, sendo o microrganismo identificado como *T. rubrum*¹³.

Para diagnóstico microbiológico dos agentes causadores de dermatofitose, a obtenção da amostra é um passo essencial: deve ser colhida das bordas da lesão onde se encontra o fungo viável em quantidade suficiente. A partir daí, faz-se uma microscopia direta do material biológico após clareamento, utilizando normalmente hidróxido de potássio, o que significa grande auxílio ao dermatologista, observando a presença de hifas claras ramificadas septadas ou artrosporadas, sem, contudo, definir o agente etiológico. Para ser identificada a espécie, é necessário o isolamento do fungo através da realização da cultura, em ágar Sabouraud-dextrose adicionado ou não de cloranfenicol e cicloheximida como inibidores de contaminantes bacterianos e fúngicos respectivamente. Após 10–15 dias em média, ocorre o crescimento de colônias cotonosas características de bolor. A identificação de gêneros e espécies é feita pela análise macroscópica, como pigmentação de verso e reverso da colônia, e microscópica, como forma e disposição de conídios, o que é possível pelo microcultivo em lâmina após crescimento da colônia inicial¹⁴.

Números consideráveis de situações ou condições clínicas dos pacientes podem predispor ao desenvolvimento da dermatofitose aguda ou crônica, tais como os fatores cutâneos, calor, umidade, abrasão e composição lipídica da pele. O uso constante de sapatos fechados, as áreas de dobras do corpo, o atrito nestas áreas (interdígitos, regiões inguinal e submamárias) promovem as condições ideais de temperatura e hidratação para a instalação de uma infecção dermatofítica^{15, 16}.

Além destes fatores, patologias ou procedimentos terapêuticos, envolvidos na diminuição das funções imunológicas do indivíduo determinam os fatores sistêmicos. Assim, uma variedade de estudos indica maior suscetibilidade a esta infecção em indivíduos portadores de doenças como Diabetes Mellitus¹⁷, doença vascular periférica, síndrome de Cushing^{18,19},

terapia com corticosteróide²⁰, alterações hematológicas e predisposição genética.

O estudo desses fatores, juntamente com as características do fungo patogênico e aspectos imunológicos do paciente, tem permitido o melhor conhecimento dessa relação parasito-hospedeiro nas infecções dermatofíticas.

1.1.1. *Trichophyton rubrum*

T.rubrum é o principal agente causador de dermatofitoses. Sua identificação é realizada por meio da observação de características macroscópicas e microscópicas próprias deste fungo. Desenvolve-se em menos de 15 dias, a 25°C, em ágar Sabouraud, formando colônias cotonosas e brancas, tornando-se posteriormente aveludadas; o reverso da colônia apresenta pigmentação de avermelhada a rosa-púrpura.

Microscopicamente, apresentam hifas septadas com microconídios laterais em forma de gota de lágrima; macroconídios podem ser raros, abundantes ou ausentes e, quando presentes são longos, de parede fina com 3 a 8 células, formando-se diretamente no final das hifas. Na sua maioria são antropofílicos, ou seja, isoladas apenas do homem¹.

T.rubrum é o principal responsável pelas dermatofitoses crônicas e refratárias ao tratamento, que geralmente é realizado com antifúngicos de uso tópico. Muitas vezes um resultado inicial favorável cria a falsa impressão de cura e logo que a medicação é suspensa, ocorre a recaída²¹.

1.2. Imunologia das Dermatofitoses

Os primeiros estudos sobre a resposta imunológica na dermatofitose ocorreram na década de 20²². Na atualidade, após numerosos trabalhos, está claramente demonstrado que, apesar das dermatofitoses serem infecções cutâneas, seus agentes são capazes de induzir resposta imunológica tanto na infecção experimental como natural em animais e no homem²¹.

Devido à multiplicidade de fatores na infecção dermatológica humana, muitos pontos permanecem obscuros em relação às respostas do hospedeiro frente ao dermatófito. Há ainda muito por esclarecer, no que se refere à importância da resposta imunológica mediada por células na erradicação da dermatofitose. Igualmente, a resposta humoral, embora pareça ter importância secundária, não tem sido adequadamente estudada²¹.

O mecanismo de defesa cutânea ocorre graças a uma forte inter-relação entre o sistema imune e a pele. A pele, por meio da formação de uma barreira natural, torna-se relativamente não vulnerável, impedindo a agressão da grande maioria dos agentes patogênicos e, o sistema imune promove o reconhecimento e a resposta a esses agentes²³. A idéia de uma relação especial entre a pele e o sistema imune é muito antigo. Toews e colaboradores estudaram as células de Langerhans e formularam a hipótese de que sua função seria a de células apresentadoras de antígenos²⁴.

Sabe-se hoje que outras células do sistema imune se associam, entre si, para promover a imunoproteção da pele, assim como os queratinócitos, macrófagos fixos na pele (células de Langerhans), linfócitos e células endoteliais especializadas. Destas, as células de Langerhans são as principais células com capacidade de processar e apresentar os antígenos da pele, além de serem extremamente importantes na indução da resposta mediada por células nas dermatofitoses²⁵.

Utilizando técnicas imunohistoquímicas, verificou-se nas áreas micóticas aumento no número de células de Langerhans tanto na epiderme como na derme, no infiltrado celular nas dermatofitoses causadas por *T.rubrum* e *M.canis*²⁶. Estas células foram capazes de apresentar antígenos de dermatófitos aos linfócitos T desencadeando uma resposta linfoproliferativa,

sugerindo com este estudo a possibilidade dos antígenos presentes no extrato córneo serem apresentados às células T presentes na epiderme²⁷.

A existência da resposta imunológica na infecção humana por dermatófitos é inegável, porém, os inúmeros trabalhos que tratam deste assunto, na grande maioria das vezes, não permitem uma comparação entre si. Esta dificuldade origina-se da inexistência de antígenos padronizados extraídos de dermatófitos, que pudessem ser reproduzidos e utilizados pelos investigadores das diferentes partes do mundo, permitindo tal comparação. O antígeno de dermatófito mais utilizado em estudos imunológicos é a tricofitina, um antígeno bruto²³. A primeira tentativa de produzir uma tricofitina purificada ocorreu em 1960 por Cruickshank e colaboradores. O objetivo era o de permitir melhor entendimento da "reação a tricofitina", tanto em cobaias sensibilizadas como em humanos²⁸. Assim sendo, praticamente um século se passou desde a obtenção da tricofitina²⁹, e muitos aspectos relacionados com a imunologia das dermatofitoses estão ainda por serem esclarecidos.

Deste modo, a primeira tentativa de bloquear a infecção dermatofítica ocorre por meio da descamação epidérmica e também, por meio de fatores inibitórios não específicos presentes no soro, relacionados a transferrina insaturada, que inibe o desenvolvimento desta micose por se ligar ao ferro necessário para a invasão e crescimento de dermatófitos no tecido cutâneo, conferindo a chamada imunidade nutricional³⁰. Na vigência da infecção, ocorre a resposta inflamatória ou resposta imune inata do hospedeiro e posteriormente a imunidade mediada por células e a imunidade humoral²³.

Os mecanismos protetores contra fungos dermatófitos são mediados principalmente por células. Pacientes que apresentam esta imunidade prejudicada, freqüentemente desenvolvem infecções fúngicas extensas e recorrentes na pele, no couro cabeludo, unhas e mucosas^{31, 32, 33}.

Experimentos com animais também evidenciaram a imunidade mediada por células como principal mecanismo de defesa imunológica do hospedeiro contra fungos. Hipersensibilidade do tipo tardia é uma forma de imunidade mediada por células onde a célula efetora é o macrófago ativado, esta ativação pode ocorrer pelo próprio contato com o antígeno, como também pela ação de

citocinas liberadas por linfócitos T sensibilizados, incluindo IFN- γ que converte monócitos em macrófagos. O reconhecimento e a resposta a antígenos ocorrem apenas quando estes são processados e apresentados aos receptores presentes nos linfócitos T, na forma de peptídeos antigênicos ligados ao complexo principal de histocompatibilidade, encontrados em células conhecidas como apresentadoras de antígenos. O macrófago ativado é responsável pela fase efetora da resposta, podendo eliminar o antígeno através do processo de fagocitose e formação de substâncias tóxicas ao antígeno.

Hanifin e colaboradores verificaram por meio de testes intradérmicos usando tricofitina, que apesar da diminuição específica da resposta imune mediada por células, a imunidade celular para outros antígenos pode estar normal, sugerindo que o "defeito" imune seja seletivo³⁴. Antígenos tais como os derivados de *Mycobacterium tuberculosis* estão comumente associados com o desenvolvimento de uma resposta tipo tardia e raramente causa uma reação imediata. A capacidade de fungos do gênero *Trichophyton* sp em provocar as duas respostas imunes distintas é, portanto, única³⁵.

Pensamos que a resposta inflamatória induzida pela reação mediada por células aumenta a atividade proliferativa de queratinócitos causando a eliminação do fungo da pele. Dermatofitose experimental realizada em animais confirmou a presença de infiltrado mononuclear e células inflamatórias perivasculares na derme de indivíduos infectados³⁶. Dois achados confirmam o papel protetor da resposta mediada por células a *Trichophyton* sp. Primeiro, a associação de reação de hipersensibilidade tipo tardia em testes de pele com lesões inflamatórias altamente agudas e segundo, a resistência à reinfeção. Muitos estudos comprovam a ocorrência de reações tardias em testes cutâneos de indivíduos com dermatofitose aguda³⁷.

Infecções podem resultar em lesões caracterizadas por baixo grau de inflamação ou com reações inflamatórias evidentes. Testes cutâneos de hipersensibilidade imediata, presença de anticorpos IgG e IgE específicos contra *T.rubrum* e falha na eliminação da infecção estão associados com dermatofitoses crônicas. Por outro lado, testes cutâneos de hipersensibilidade do tipo tardio estão associados a lesões agudas, altamente inflamados, com

baixos títulos de anticorpos, tendência à cura espontânea e resistência à reinfecção³⁵.

A apresentação dos antígenos aos linfócitos T na resposta imune específica mediada por células pode ser realizada por macrófagos, células dendríticas, células epidérmicas, incluindo células de *Langerhans* e possivelmente queratinócitos. Células dendríticas capturam antígenos em tecidos periféricos e migram para órgãos linfóides secundários onde adquirem a capacidade de estimular células T "naive". Por esta razão, as células dendríticas desenvolvem um papel crítico na indução de resposta de células T. Queratinócitos produzem uma variedade de citocinas incluindo IL1, GM-CSF e TNF- α que influenciam a maturação de células dendríticas³⁸.

Anticorpos são relativamente ineficientes em controlar e eliminar uma dermatofitose e por isso, a imunidade celular é crucial nesta infecção. Portanto, pacientes com deficiências imunológicas que envolvam este tipo de resposta e que já estejam infectados por dermatófitos se tornam mais susceptíveis à instalação do fungo na derme. Smith e colaboradores analisaram três pacientes com leucemia aguda e erupção cutânea pré-existente e verificaram que após terem sido submetidos à intensa quimioterapia e conseqüente supressão do sistema imunológico, houve progressão da doença cutânea com invasão da derme pelo *T.rubrum*. Assim, uma pancitopenia sistêmica associada com intensa imunossupressão pode aumentar o risco de invasão direta na derme por dermatófitos. Estes pacientes foram tratados com Anfotericina B, via oral, que foi ineficiente na eliminação do fungo³⁹.

É possível que indivíduos atópicos tenham maior predisposição a desenvolverem dermatofitoses crônicas. De acordo com Hay, aproximadamente um quarto dos indivíduos com dermatofitose crônica são atópicos⁴⁰. A exposição a antígenos de dermatófitos leva ao aumento na taxa de anticorpos da classe IgE, que pode resultar na sensibilização das vias aéreas superiores e asma, talvez por isso alguns trabalhos correlacionem dermatofitose com sintomas alérgicos⁴¹. Acredita-se que a presença destes anticorpos IgE seja um dos fatores envolvidos na supressão da resposta imune celular⁴².

Poucos trabalhos têm esclarecido os mecanismos de regulação da resposta imune para infecções tricofticas. Esses estudos foram possíveis com o uso de antígenos purificados, como relatado por Moser e colaboradores, onde somente uma fração glicopeptídica de fungos do Gênero *Trichophyton* provocava reação de hipersensibilidade do tipo tardio⁴³, enquanto Barker e colaboradores, sugeriram que um carboidrato era associado com hipersensibilidade imediata⁴⁴. No início dos anos 90, foi identificado um antígeno de 30-kDa de *Trichophyton tonsurans* denominado de Tri t 1 que estava associado com hipersensibilidade imediata⁴⁵. Mais recentemente, verificou-se a existência de uma glicoproteína de 83-kDa extraída de *T. tonsurans* chamada proteína IV capaz de desenvolver reações tanto de hipersensibilidade imediata como tardia⁴⁶.

Mais tarde, identificou-se uma molécula de 29-kDa obtida de *T. rubrum*, denominada Tri r 2 com as mesmas propriedades de induzir tanto hipersensibilidade do tipo imediata como tardia, sendo a resposta mediada por linfócitos T com diferentes repertórios. Verificou-se também, que um epítipo imunodominante da região amino-terminal presente na Tri r 2, peptídeo P5, foi capaz de estimular fortemente a proliferação de células T em resposta de hipersensibilidade tardia, o que não ocorre em resposta de hipersensibilidade imediata, associada com dermatofitoses crônicas. Sugere-se, portanto que o peptídeo P5, sendo capaz de estimular uma resposta aguda, apresente-se como um epítipo protetor, fato relevante para um futuro desenvolvimento de vacinas contra dermatofitoses⁴⁷.

A regulação da resposta imune pode ter envolvimento de subpopulações de linfócitos T auxiliar (Th1 ou Th2), nas infecções causadas por dermatófitos. Dependendo do tipo de citocina predominante, IFN- γ ou IL-4, produzida e secretada pelos linfócitos T auxiliar, após reconhecimento do antígeno, poderá levar a resposta associada com a hipersensibilidade do tipo tardio (DTH), com o desenvolvimento de uma imunidade protetora para agentes patogênicos intracelulares e fungos ou induzir a estimulação de células B com posterior produção de anticorpos que parece fornecer pouca proteção contra esses patógenos⁴⁸.

Em camundongos, dois fenótipos distintos de populações de linfócitos TCD4 são descritos na regulação de anticorpos e na resposta mediada por células⁴⁹. Linfócitos T com fenótipo Th1 produzem IFN- γ induzindo, desta forma, uma resposta imune mediada por células contra dermatófitos, enquanto IL-4 produzida por linfócitos com fenótipo Th2 servem como fator de crescimento para linfócitos B induzindo a mudança de classe de imunoglobulina para IgG e IgE. Estudos *in vitro* demonstram que a presença de IL-4 durante a apresentação de antígenos induz a uma resposta com padrão Th2 e a presença de IL-12 e de IFN- γ , com níveis baixos de IL-4, induzem a diferenciação das células para fenótipos Th1.

Surpreendentemente, os achados de Woodfolk e colaboradores foram contraditórios a esta teoria de produção de citocinas segundo perfil Th1/Th2 em resposta à reação tardia e imediata respectivamente. Demonstrou-se que o peptídeo P5, presente na molécula Tri r 2 de *T.rubrum*, foi capaz de induzir a produção de IL-5 por células T derivadas de reações de hipersensibilidade tardia. Além disso, verificou-se que eosinófilos foram os principais componentes do infiltrado celular no local da infecção, sugerindo uma possível associação com a intensa produção de IL-5⁵⁰.

Um dos principais constituintes da parede celular do *T.rubrum* denomina-se manana, um componente glicoprotéico rico em manose. Queratinócitos epidérmicos humanos são capazes de se ligar e internalizar este componente, ademais, a manana liga-se seletivamente a monócitos, causando um efeito inibitório *in vitro* na função imune mediada por células^{51, 52}.

Nos experimentos de linfoproliferação utilizando mitógenos como a lectina e imunógenos específicos na presença de manana do *T.rubrum*, observou-se redução da linfoproliferação²¹; porém a inibição não ocorre se os linfócitos forem co-estimulados com IL-2, sugerindo, desta forma, que a manana do *T.rubrum* agiria no estágio anterior à ligação da IL-2 ao seu receptor. Testando mananas de *T.rubrum* e *M.canis* concluiu-se que a primeira apresentou maior atividade imuno-inibitória, explicando um dos fatores que permitem ao *T.rubrum* persistir como infecção crônica⁵³.

Pode-se observar, portanto, que a manana de *T.rubrum* é um componente importante na imunossupressão da resposta mediada por células, mas como o processo de imunoinibição parece ocorrer durante o mecanismo de apresentação de antígenos⁵⁴, estudar a interação de componentes do fungo com células apresentadoras de antígeno é de grande importância para tentar esclarecer esse processo.

Algumas enzimas como queratinases, elastases, collagenases e lipases, liberadas pelos dermatófitos durante a infecção são consideradas importantes fatores de virulência do fungo. Verificou-se que algumas espécies de *Trichophyton* sp possuem atividade lítica, causando lise de eritrócitos e de células fagocíticas, sugerindo que este seja um importante fator agindo no balanço entre a imunidade celular do hospedeiro e a habilidade do fungo em diminuir a resposta imune, já que a ação hemolítica provocada por numerosas bactérias é considerada um dos fatores de virulência mais importantes e a perda desta atividade resulta em diminuição na severidade do microrganismo⁵⁵.

Poucos estudos imunogenéticos foram realizados a fim de se verificar uma possível associação de genes do sistema HLA com as dermatofitoses crônica e, até o presente, nenhuma associação significativa foi encontrada⁵⁶. Sadahiro, em 1998, estudou os antígenos leucocitários humanos e dermatofitose crônica causada por *T.rubrum*, em pés e unhas de caucasianos detectando valores significativos para uma possível associação da molécula HLA-B14 (MHC Classe I) com a resistência a essa doença⁵⁷. Os indivíduos que expressam este antígeno devem ser mais resistentes em contrair dermatofitose crônica pelo *T.rubrum*. Uma hipótese para explicar este fato é que, o HLA em questão, deve desempenhar eficientemente sua função durante o processo de ligação ao peptídeo fúngico e apresentar a melhor região do antígeno aos linfócitos T, levando a uma resposta imune celular protetora. Essas observações sugerem que nesta população, o sistema HLA deve exercer papel importante na resposta imune de células T para antígenos fúngicos, o HLA-B14 controlando possivelmente a resistência à dermatofitose crônica por *Trichophyton rubrum* e o HLA-DQB1*06 para a susceptibilidade¹.

A fagocitose, como um mecanismo de defesa imune inata, foi primeiramente demonstrada por Eli Metchnikov no final do século XIX e desde então, vem sendo estudada como um modelo clássico de interação entre sistema imune e microrganismos; grandes trabalhos estão sendo realizados para entender as conseqüências desta interação⁵⁸. A eliminação de patógenos é realizada principalmente por células denominadas fagócitos, especializados na captura, no englobamento e na degradação de microrganismos. Os macrófagos, residentes nos tecidos e os neutrófilos, que circulam no sangue e penetram nos tecidos somente quando eles estão infectados, são as células centrais da imunidade inata⁵⁹.

Os macrófagos estão presentes no tecido conjuntivo de vários órgãos, como baço, linfonodos, fígado e em cavidades corporais, como a peritoneal e pleural. Estão presentes também nas vias aéreas, no cérebro e nos ossos. Origina-se de promonócitos da medula óssea, os quais dão origem aos monócitos do sangue, que ao migrarem para os tecidos, transformam-se em macrófagos. São as células de ligação da imunidade inata com a imunidade adaptativa por terem a capacidade de fagocitar, processar e apresentar os antígenos aos linfócitos. A ação dessas células inicia-se com a fagocitose, que depende de contato físico entre a membrana do fagócito e a do microrganismo⁶⁰.

Assim, essas células fagocíticas ficam dispostas estrategicamente em todos os sítios onde os microrganismos possam entrar no hospedeiro. A ligação direta e conseqüente fagocitose dos microrganismos ocorre através de receptores presentes nos macrófagos⁵⁸. Dentre eles, o receptor manose é uma lectina que liga os resíduos terminais da manose e da fucose das glicoproteínas e dos glicolipídios, que são algumas das moléculas encontradas na parede celular de certos microrganismos. Outro importante receptor encontrado na membrana dos macrófagos é para as porções Fc dos anticorpos IgG, especialmente da IgG₁ e da IgG₃, que ao revestirem a parede do microrganismo passam a ser chamados de opsoninas, com função não apenas de promover, mas aumentar a eficiência de fagocitose⁶¹.

A fagocitose de fungos ocorre geralmente após terem sido opsonizados. A ativação de complemento resulta na acumulação de neutrófilos, portanto, o importante papel das opsoninas na fagocitose de células fúngicas, tais como blastoconídios de *Candida albicans* e conídios de *Aspergillus fumigatus* são indiscutíveis. Entretanto, muitas áreas do organismo, como pulmão, fluido cérebro-espinhal e pele são pobres em complemento, e devido a muitos microrganismos interagirem com células fagocíticas em locais ausentes de soro, torna-se necessária a existência de outros mecanismos, não-opsônicos, para a ocorrência de fagocitose.

Os poucos estudos realizados entre interação de células de dermatófitos e fagócitos humanos, baseia-se em sistemas dependentes de complemento. A fagocitose máxima de artroconídios de *T.mentagrophytes* ocorre em presença de complemento e anticorpos específicos. Esses achados sugerem que o reconhecimento direto e específico de moléculas presentes na superfície de artroconídios por estruturas complementares na superfície dos fagócitos existe como um mecanismo alternativo de fagocitose. O uso de proteinase e quitinase reduziram os níveis de fagocitose de artroconídios não opsonizados, sugerindo que componentes externos presentes na parede celular de artroconídios sejam responsáveis pela ligação e fagocitose na ausência de opsoninas⁶².

Macrófagos alveolares murinos foram capazes de fagocitar e matar conídios de *Aspergillus fumigatus*. O englobamento de conídios *in vitro* ocorreu após duas horas da infecção e 90% de conídios foram internalizados com uma média de três conídios por macrófago. O primeiro estágio de germinação do conídio não foi afetado, entretanto, seis horas após fagocitados, os macrófagos foram capazes de matá-los. Em contraste a estudos prévios, demonstrou-se que metabólitos tóxicos do oxigênio são componentes essenciais para a eliminação de conídios de *A.fumigatus*. A inibição de NADPH oxidase, pela utilização de corticoesteróides é o principal fator relacionado com a redução da morte intracelular de conídios por macrófagos, não alterando o processo de fagocitose. Ao contrário, a enzima óxido nítrico sintase não age na morte de conídios. Os mecanismos pelos quais os metabólitos tóxicos de oxigênio matam os conídios não estão claramente estabelecidos.

Por esses dados, concluiu-se que macrófagos alveolares desenvolvem um papel essencial na eliminação de conídios de *A.fumigatus* do pulmão e que o prejuízo na produção de metabólitos tóxicos de oxigênio por corticoesteróides é responsável pelo desenvolvimento de aspergilose invasiva em camundongos imunocomprometidos⁶³.

Células fagocíticas como os macrófagos alveolares e as mononucleares circulantes mostraram ter uma intensa atividade antifúngica contra *Penicillium marneffe*. A ativação destas células fagocíticas com M-CSF aumentou sua capacidade de eliminar conídios do fungo, por meio da explosão respiratória da célula⁶⁴.

Em 1987, verificou-se que neutrófilos estimulados com concanavalina A, possuíram atividade citotóxica sobre conídios de *T.rubrum* que haviam sido fagocitados por estas células. Estes resultados foram verificados quando a suspensão semeada em meio Sabouraud-dextrose ágar, contendo conídios liberados por células lisadas não apresentaram crescimento de colônias deste fungo⁶⁵.

Esclarecimentos sobre o mecanismo imunológico das diversas respostas imunes para fungos do Gênero *Trichophyton* têm uma importante aplicação não apenas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas alternativas para o tratamento de infecções fúngicas crônicas, mas também para outras doenças crônicas causadas por uma grande variedade de patógenos³⁵. Portanto, o principal objetivo deste trabalho é estudar a interação de *T.rubrum* com macrófagos para melhorar o entendimento desta importante patologia.

2. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da interação de macrófagos peritoneais residentes de camundongos com conídios de *T.rubrum* e seus exoantígenos, utilizando os seguintes parâmetros:

- fagocitose de conídios de *T.rubrum* e zymosan com ênfase para o receptor de manose;
- determinação da expressão de moléculas de superfície como CD80, CD86, MHC-classe II e CD54;
- quantificação da secreção das citocinas TNF- α , IL-12 e IL-10;
- produção de NO;
- verificação da viabilidade de conídios fagocitados por macrófagos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Crescimento e identificação do Fungo

Foram utilizadas cepas de *T.rubrum* obtidas de pacientes do Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. Após análise de seus históricos, as cepas foram consideradas adequadas para utilização no estudo, já que os pacientes não faziam uso de medicamento, o que dificultaria o processo de crescimento do fungo *in vitro*. Outro importante fator, considerado na escolha da cepa, foi a cronicidade da infecção, uma vez que os pacientes apresentavam a lesão há mais de três anos.

3.2. Produção de exoantígeno de *T.rubrum*

A obtenção do exoantígeno foi possível através da raspagem da colônia com alça de platina em "L" e transferência das células fúngicas para 50mL de Sabouraud-dextrose caldo (Merck – Alemanha) em Erlenmeyer de 250mL. Este inóculo foi cultivado por 7 dias sob agitação constante, a 25°C. Após este período, as células foram separadas do fluido por filtração em papel de filtro e posteriormente o filtrado foi passado por filtro de 0,22µm (Costar - Estados Unidos) e armazenado a -20°C em freezer.

3.3. Dosagem protéica

A determinação protéica foi realizada segundo método proposto por Bradford⁶⁶, que utiliza "Coomassie Brilliant Blue" G-250 (Sigma - Estados Unidos) como reativo e albumina bovina 1,0 mg/mL (Sigma - Estados Unidos) como padrão.

3.4. SDS-PAGE do exoantígeno

O perfil de proteínas presentes no exoantígeno foi avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamina com dodecilsulfato de sódio (SDS-

PAGE)⁶⁷. O gel foi corado por impregnação pela prata, de acordo com Ansorge⁶⁸.

3.5. Conídios de *T.rubrum*

3.5.1. Meio de cultura utilizado

O meio líquido denominado caldo-Batata foi preparado utilizando batata, 5g de glicose (Merck – Alemanha) e 500mL de água destilada. A batata foi descascada, cortada em pedaços pequenos e misturada a 50mL de água. Esta mistura foi fervida até cozimento total da batata, por aproximadamente 30 minutos. Foram acrescentados 450mL de água e filtrado em papel de filtro. Em seguida, acrescentou-se a glicose, o meio foi autoclavado e mantido em geladeira.

3.5.2. Obtenção de conídios de *T.rubrum*

Por analogia à técnica de microcultivo, que utiliza o ágar Batata, pobre em nutrientes, para se conseguir um número maior de conídios do fungo, foi utilizado o mesmo meio sem o ágar, com a mesma finalidade, obtendo-se desta forma, grande número de conídios viáveis de *T.rubrum*.

Após crescimento do fungo, a colônia foi raspada com alça de platina em "L" e colocada em 50mL de caldo-Batata em Erlenmeyer de 250mL. Este inóculo foi cultivado sob agitação constante por 4 dias, deixado em repouso por aproximadamente 30 minutos para que as hifas sedimentassem com espontaneidade e o sobrenadante, contendo os conídios foi recolhido com pipeta de bulbo. O número de conídios foi contado em câmara de Neubauer e ajustado de acordo com cada ensaio.

3.6. Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem A/J, de 6 a 8 semanas de idade, obtidos no Biotério de Camundongos isogênicos do

Departamento de Imunologia do ICB-USP e criados em condições SPF ("specific pathogens free").

3.7. Obtenção de macrófagos

Os macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos normais A/J através de lavagem com 3mL de meio de cultura RPMI 1640 (Sigma - Estados Unidos) contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab - Campinas, Brasil). Esta suspensão foi incubada com 1mL do meio de cultura mantida por 1 hora em estufa a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ para que os macrófagos aderissem à placa. As células não aderidas foram desprezadas e o meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino foi acrescentado à placa. As células foram mantidas por um período de 24 horas, em estufa a 37°C em 5% de CO₂, para que os macrófagos espriassem.

3.8. Ensaio de fagocitose

3.8.1. Partículas de zymosan em presença de exoantígeno de *T.rubrum*

Os macrófagos foram cultivados sobre lamínulas em placa de 24 poços por 24 horas a 37°C em 5% de CO₂. O número de células foi ajustado em câmara de Neubauer em 10⁶ macrófagos por poço. Foram adicionadas concentrações crescentes do exoantígeno de *T.rubrum* (5, 10, 15 e 20µg) e mantidos por 30 minutos. Foram acrescentadas partículas de zymosan (10µg/mL) em todos os poços. A placa foi incubada por 4 horas em estufa a 37°C em 5% de CO₂ e posteriormente, as lamínulas foram lavadas com PBS para remoção de partículas não fagocitadas e coradas com Giemsa (NEWPROV - Brasil). As lamínulas foram mantidas por 5 segundos em cada um dos corantes. Após a coloração, as lamínulas foram fixadas com Entellan (Merck - Alemanha) e posteriormente, analisadas em microscópio óptico comum (200x e 1000x).

O índice de fagocitose (IF) foi calculado multiplicando-se a porcentagem de macrófagos que fagocitaram pelo número médio de partículas internalizadas por estas células⁶⁹.

3.8.2. Conídios de *T.rubrum* em presença do exoantígeno

Concentrações crescentes de exoantígeno de *T.rubrum* (5, 10 e 15µg) foram adicionados aos poços contendo macrófagos cultivados em placa, como descrito e mantidos por 30 minutos. Conídios foram acrescentados aos poços, na proporção de 1 conídio para cada macrófago e incubados por 4 horas em estufa a 37°C em 5% de CO₂. As lamínulas foram lavadas, coradas e analisadas, como já descrito.

3.8.3. Conídios de *T.rubrum* na presença de manana

Para o teste de inibição de fagocitose por manana (Sigma - Estados Unidos), macrófagos foram cultivados, como descrito anteriormente, e incubados durante 30 minutos com diferentes concentrações de manana (25, 50 e 100µg/mL). Após este período, foram acrescentados à cultura os conídios na proporção de 1 conídio para cada macrófago e incubados durante 4 horas em estufa a 37°C em 5% de CO₂. As lamínulas foram lavadas, coradas e analisadas.

3.9. Expressão de moléculas de superfície de macrófagos

Macrófagos foram incubados em placas de Petri, com LPS (300 ng/mL) como controle positivo, conídio do fungo numa relação de 1 conídio para cada macrófago e 15µg de exoantígeno. Essas culturas foram incubadas por um período de 8 horas e, posteriormente, analisadas quanto à expressão das moléculas de MHC classe II, CD80, CD86 e CD54 por determinação da média de intensidade de fluorescência.

As moléculas de superfície celular analisadas foram: MHC classe II, CD80, CD86 e CD54, utilizando-se para isso os anticorpos anti-camundongo I-A^k (11-5.2) (0,2µg/mL), anti-camundongo CD54 (3E2) (0,2µg/mL), anti-camundongo CD80 (16-10A1) (0,2µg/mL), marcados com PE e anti-

camundongo CD86 (GL1) (0,5µg/mL), marcado com FITC, todos da PHARMIGEN. Foram utilizados isotipos controle para cada anticorpo utilizado.

O número de macrófagos foi ajustado em câmara de Neubauer em 10^6 células. Em seguida, esta quantidade de células foi transferida para duas placas de Petri, que foram incubadas respectivamente com 10^6 conídios de *T.rubrum* e 15µg de exoantígeno do fungo. As placas foram mantidas em estufa a 37°C em 5% de CO₂ por 8 horas. Após este período, foram separadas alíquotas de cada placa e adicionados os anticorpos para marcação (α-MHC classe II, α-CD80, α-CD86 e α-CD-54). As células marcadas foram incubadas no gelo por 30 minutos e, em seguida, fixadas com solução contendo 2% de glicose, 1% de formaldeído, em PBS. As amostras permaneceram assim até análise, quando as células marcadas foram lavadas com PBS e, posteriormente, foi analisada a média de intensidade de fluorescência (MIF) por citometria de fluxo. Como controle negativo, foram utilizadas células não estimuladas e como controle positivo as células foram estimuladas com LPS (300 ng/mL) (Sigma - Estados Unidos).

Para análise por citometria de fluxo, foi utilizado o aparelho FacScalibur (Becton & Dickison - Canadá). Os dados foram analisados utilizando-se o programa "Cell Quest".

3.10. Dosagem de citocinas e liberação de óxido nítrico

A produção das citocinas TNF-α, IL-12 e IL-10 e a liberação de óxido nítrico foram determinados a partir do sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem A/J, obtidos como descrito anteriormente, cultivados com conídios de *T.rubrum* ou seu exoantígeno. As placas de cultura foram mantidas por 8 horas em estufa a 37°C em 5% de CO₂. Após serem recolhidos, os sobrenadantes foram armazenados a -70°C, até o uso.

3.10.1. TNF- α

3.10.1.1. Cultura de células L929

As células foram cultivadas em garrafas plásticas com meio de cultura RPMI 1640, suplementado com estreptomicina, 0.07mM, penicilina G, 100 U/ml, L-glutamina, 0.2M, L-asparagina, 0.2M, Ácido Fólico, 0.001M, Ácido Pirúvico, 0.1M e soro fetal bovino, 5% (Sigma - Estados Unidos). A cultura foi mantida em estufa a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Quando as células formaram uma camada contínua na superfície da garrafa plástica, normalmente depois de 3 dias, elas foram retiradas por tratamento com uma solução de PBS-glicosado (Glicose, 2.77mM), tripsina 0.4mg/mL e EDTA 537mM por 15 minutos à temperatura de 37°C, ressuspensas em meio sem soro, centrifugadas à 1000 rpm por 10 minutos e então utilizadas para o ensaio de citotoxicidade.

3.10.1.2. Produção de soro rico em TNF

Camundongos BALB/c foram inoculados intra venoso com Bacilo de Calmette-Guérin - 2.5×10^7 bacilos/animal (Onco BCG oral cepa *M.bovis*, fornecido pelo Instituto Butantan S.P.). Após 15 dias os animais foram desafiados com 25µg de LPS (*Salmonella abortus equi*, Sigma). Após 90 minutos da inoculação do LPS, o sangue dos animais foi colhido, mantido 1 hora à temperatura ambiente, e incubado, durante a noite, a 4°C. O soro foi obtido por centrifugação à 1500 rpm por 5 minutos. As amostras de soro foram, então, aliquotadas e estocadas a -20°C até o momento do uso.

3.10.1.3. Determinação da atividade do TNF através de ensaio de citotoxicidade sobre células L929

A detecção da atividade de TNF foi realizada por um ensaio de citotoxicidade *in vitro* sobre células L929.

Em placa plástica de 96 poços de fundo chato (Costar - Estados Unidos) foram colocados 100µL/poço de meio RPMI com 5% de soro contendo 3.5×10^4

células L929. A placa foi incubada por 20 horas a 37°C em 5% de CO₂ até a formação de monocamada homogênea. Após esse período, diluições seriadas das amostras de soro, a serem tituladas, foram adicionadas à placa em um volume de 100µL, em meio contendo actinomicina D (concentração final de 2µg/mL) (Sigma - Estados Unidos). As placas foram reincubadas e 20 horas após, a porcentagem de lise foi determinada. Como controle negativo foram utilizadas células incubadas apenas em meio com soro. Como controle positivo foram utilizadas diluições de TNF recombinante ou de soro de camundongo rico em TNF.

As células remanescentes na placa (células viáveis) foram fixadas e coradas com uma solução de ácido acético a 30% e cristal violeta a 0.5% (10µL/poço). Após 15 minutos, as placas foram lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente. O cristal violeta remanescente nas células foi solubilizado em 100µL de metanol e a quantificação da absorbância foi feita no leitor de ELISA (Tittertek Multiskan), utilizando o comprimento de onda 620nm⁷⁰.

A porcentagem de lise foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ de lise} = [1 - (A \text{ amostra} / A \text{ controle})] \times 100$$

onde A amostra = absorbância obtida em uma determinada diluição da amostra titulada e A controle = absorbância obtida no controle.

O título de TNF em U/mL foi definido como a recíproca da diluição onde se observa 50% de lise celular.

3.10.2. IL12 e IL-10

A técnica utilizada nos ensaios foi ELISA de captura, fazendo uso de anticorpos monoclonais, para detecção das citocinas, nas concentrações recomendadas pelo fabricante (R&D System).

Para realizar o procedimento, placas de microtitulação de 96 poços (Costar - Estados Unidos) foram sensibilizadas com anticorpo primário diluído em PBS e mantidas em temperatura ambiente de um dia para o outro. Foram adicionados às placas, PBS contendo 1% de BSA para promover o bloqueio de sítios livres do plástico e mantidos por 1 hora à temperatura ambiente. As citocinas recombinantes, utilizadas para realizar a curva padrão, foram diluídas

em PBS contendo 1% de BSA e incubados por 2 horas em temperatura ambiente.

Os sobrenadantes de cultura foram também incubados em poços por este mesmo período, quando então todos os poços foram lavados com PBS - Tween 20 a 0,05%. Foram adicionados os anticorpos secundários conjugados a biotina, diluídos em PBS e incubados por 2 horas em temperatura ambiente. Os poços foram lavados. As placas foram incubadas com conjugado estreptoavidina-peroxidase por 30 minutos em temperatura ambiente e os poços lavados. A revelação foi realizada com o-fenilenodiamina 1mg/mL, diluída em tampão fosfato 0,4M citrato de sódio 0,4M pH 5,3, por 15-30 minutos. Houve bloqueio da reação com H₂SO₄ 4N e leitura das densidades ópticas (DO) em leitor automático, em comprimento de onda de 492nm. As concentrações de cada citocina foram calculadas com base na equação da reta de regressão linear, da curva padrão obtida com citocinas recombinantes murinas.

3.10.3. Óxido nítrico

A produção de NO foi determinada indiretamente pela concentração de nitritos nos sobrenadantes das culturas. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA (Titertek-Multiscan), com filtro de 550nm, contra branco constituído por meio de cultura e reagente de Griess v/v. Os resultados foram expressos em μM , com base em uma curva padrão feita com concentrações conhecidas de nitrato de sódio em meio de cultura (5, 10, 30 e 60 μM de NO₂⁻).

3.11. Análise de viabilidade de conídios de *T.rubrum* após fagocitose por macrófagos

Macrófagos foram obtidos e cultivados, como descrito anteriormente, em placas de Petri estéreis, de um dia para outro. Foram adicionadas às culturas, conídios de *T.rubrum* em uma proporção de 1 conídio para cada macrófago e incubadas em estufa, a 37°C em 5% de CO₂ por períodos de 6, 8, 10 e 12

horas. Após estes períodos, os sobrenadantes foram desprezados e as placas foram lavadas 3 vezes com PBS estéril para remoção de conídios não fagocitados. Em seguida, foi adicionado a cada placa, 1mL de água destilada para lisar as células e promover a liberação de conídios que haviam sido internalizados. O conteúdo foi coletado com "cell scraper" e 100µL desta suspensão foram semeados em Sabouraud-dextrose ágar e mantido a 25°C por 7 dias, para verificar unidades formadoras de colônias do fungo.

3.12. Viabilidade de macrófagos

Macrófagos foram obtidos como descrito anteriormente e cultivados em placas de 96 poços (Costar - Estados Unidos) de um dia para outro. Conídios foram acrescentados em uma relação de 1 conídio para cada célula. A citotoxicidade do fungo sobre macrófagos foi determinada pela contagem do número de macrófagos remanescentes na placa após incubação com conídios do fungo por períodos de 6, 8, 10 e 12 horas e pela análise colorimétrica. Após estes períodos, os poços foram lavados com PBS e as células aderentes (células viáveis) foram fixadas e coradas com uma solução de ácido acético a 30% e cristal violeta a 0,5% (10µL/poço) por 15 minutos, quando as placas foram lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente. O número de células fixas na placa foi contado em 3 campos distintos, em um aumento de 200x em microscópio óptico comum.

Para o ensaio colorimétrico, o cristal violeta remanescente nas células foi solubilizado em 100µL de metanol e a quantificação da absorbância foi feita no leitor de ELISA (Tittertek Multiskan), utilizando o comprimento de onda 620 nm⁷⁰.

3.13. Dosagem da enzima desidrogenase láctica

Após 8 horas, o sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados com conídios ou exoantígeno de *T.rubrum* foram recolhidos para dosagem da DHL. O reagente utilizado (Labtest Diagnóstica – Brasil) é composto de tampão pH 7,5, piruvato de sódio 1,2 mmol/L, NADP 300µmol/L e azida sódica 15

mmol/L. A enzima foi dosada no equipamento “Cobas Mira Plus” (Roche – Estados Unidos) em comprimento de onda de 340 nm.

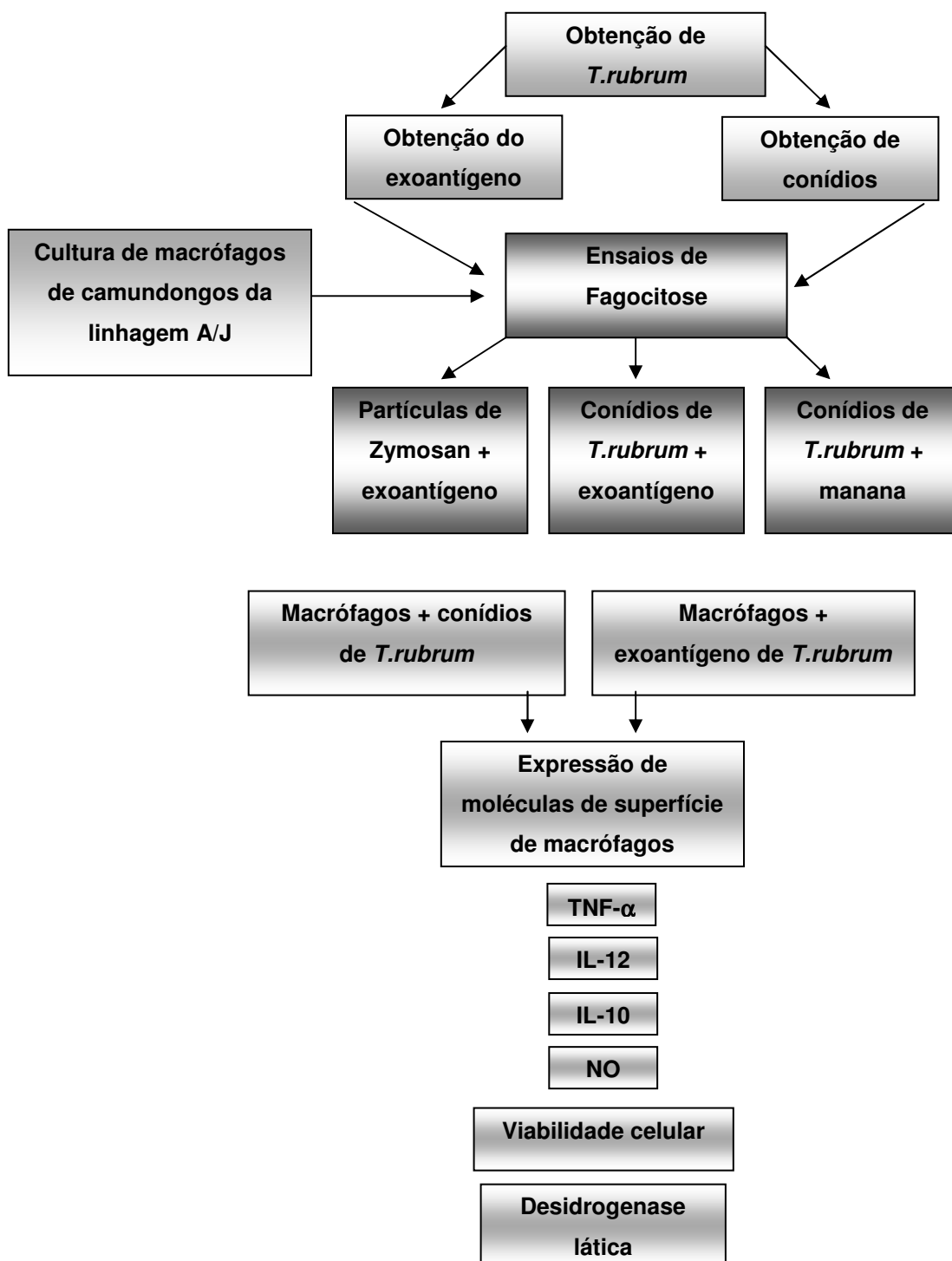
3.14. Microscopia Eletrônica

Os macrófagos foram obtidos como descrito anteriormente e incubados com conídios de *T.rubrum* em uma relação de 1 conídio para cada célula. As placas foram incubadas por 6, 8, 10 e 12 horas. Após este período, as células foram fixadas de um dia para outro em 2,5% de glutaraldeído a 0,1M, tampão de sódio (pH 7,2) a 4°C. Em seguida, a suspensão foi lavada por 3 vezes em PBS e fixada em 2% de osmium por 2 horas. As amostras foram, então, desidratadas em etanol (25-100%) e cobertas com ouro (12nm). As células puderam ser visualizadas no microscópio eletrônico GOL X-100 em um aumento de 5000x.

3.15. Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados pelo método One-Way ANOVA e múltiplas comparações pelo teste de Tukey. O nível de significância admitido foi de $p < 0,05$, em todas as amostras realizadas.

3.16. Fluxograma dos ensaios realizados



4. RESULTADOS

4.1. Obtenção da cepa

Foram utilizadas, no estudo, diferentes cepas de *T.rubrum*, previamente identificadas com as provas micológicas de acordo com o esquema abaixo.

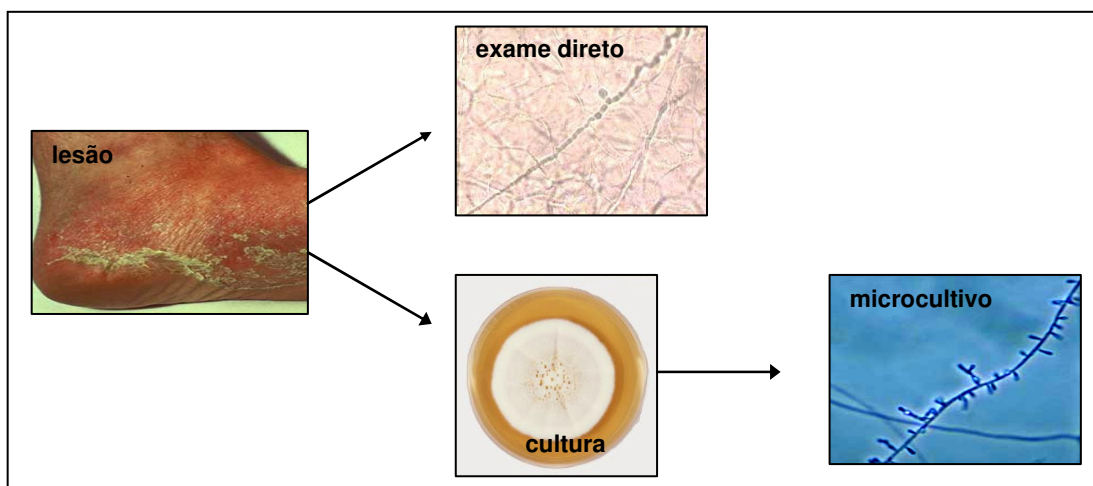


Figura 1 – Esquema prático para identificação de *T.rubrum*.

4.2. Perfil protéico

Através do perfil protéico do exoantígeno de *T.rubrum*, foi verificada a presença de aproximadamente 20 bandas, que variam de 14 a 90kDa.

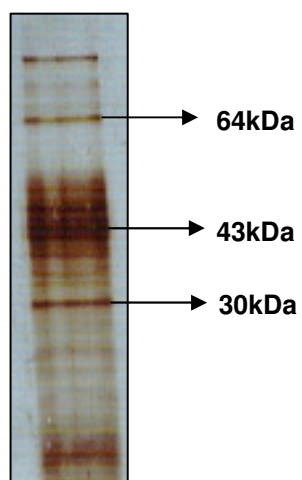


Figura 2 – SDS-PAGE a 10% mostrando o perfil protéico do exoantígeno de *T.rubrum* após coloração pela prata. Setas indicam peso molecular do padrão utilizado.

4.3. Ensaios de Fagocitose

4.3.1. Partículas de zymosan em presença de exoantígeno de *T.rubrum*

Macrófagos foram incubados com concentrações crescentes do exoantígeno de *T.rubrum* e partículas de zymosan. Verificamos que o exoantígeno provocou diminuição significativa do Índice de Fagocitose, conforme o aumento de sua concentração. Os macrófagos diminuíram gradativamente sua capacidade fagocítica, até deixar completamente de realizá-la. Foi observado que os macrófagos realizaram normalmente sua função fagocítica, em presença de zymosan e de zymosan com Sabouraud-dextrose caldo, provavelmente pela via da manose.

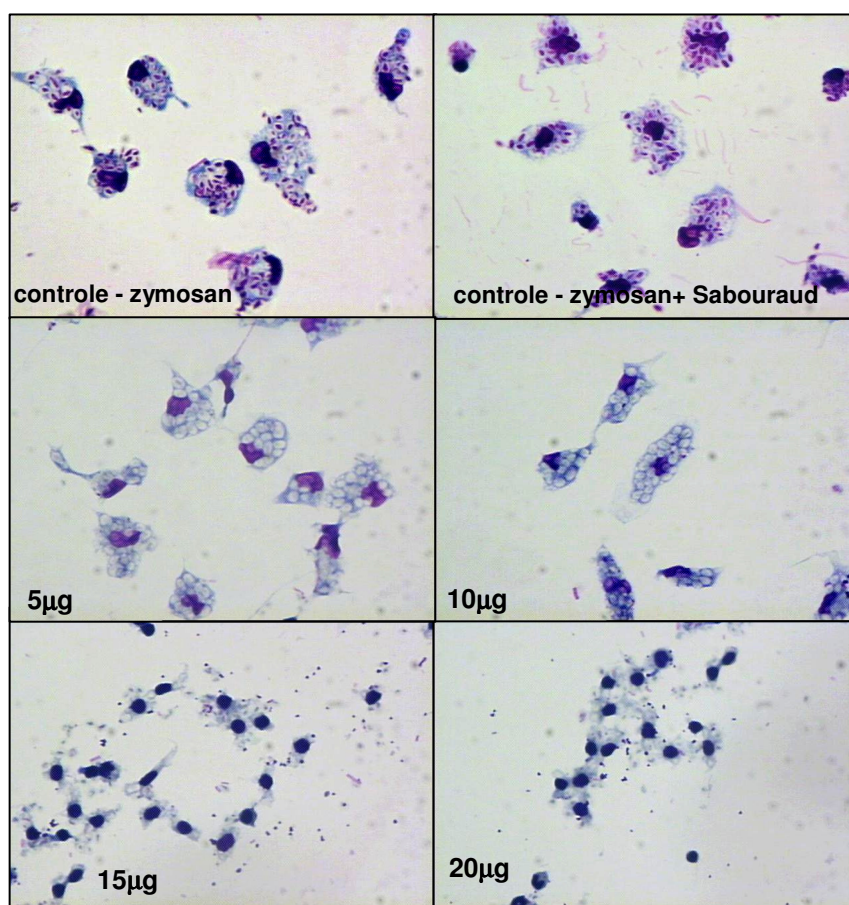


Figura 3 – Partículas de zymosan fagocitadas por macrófagos e diminuição da capacidade fagocítica, com aumento da concentração de exoantígeno de *T. rubrum* (MOC - 200x).

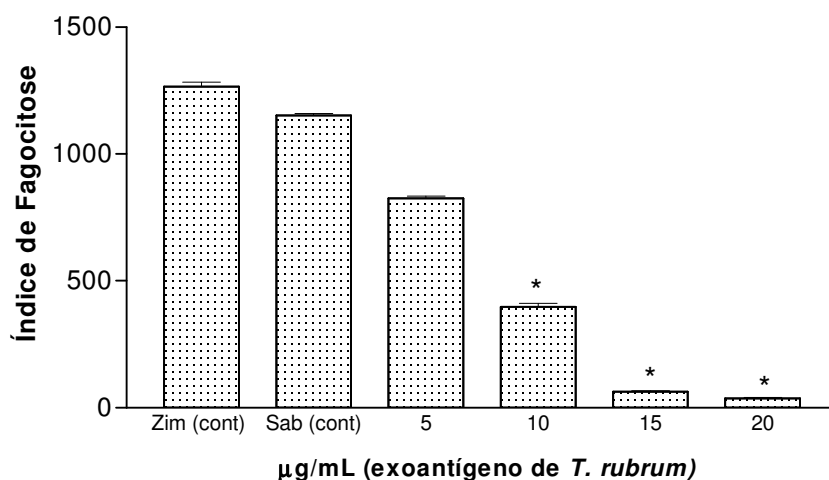


Figura 4 – Índice de Fagocitose - macrófagos incubados com partículas de zymosan e concentrações crescentes de exoantígeno de *T.rubrum*.

Zym (cont) - macrófagos cultivados apenas com partículas de zymosan;

Sab (cont) - macrófagos cultivados com partículas de zymosan e Sabouraud-dextrose caldo;

5, 10, 15 e 20µg - macrófagos cultivados com partículas de zymosan e concentrações crescentes de exoantígeno de *T.rubrum* (5, 10, 15 e 20µg).

* $p < 0,05$ quando comparados aos macrófagos cultivados apenas com zymosan e com zymosan e Sabouraud-dextrose caldo (controles).

4.3.2. Conídios de *T.rubrum* em presença de exoantígeno deste fungo

Macrófagos foram incubados com conídios de *T.rubrum*. Em paralelo, também foi testada a fagocitose com a adição de concentrações crescentes de exoantígeno do fungo. Os macrófagos realizaram normalmente a função fagocítica quando cultivados com conídios de *T.rubrum*. Isto também ocorreu em presença dos controles (Sabouraud-dextrose caldo e caldo Batata). Entretanto, houve diminuição significativa no Índice de Fagocitose quando o ensaio foi realizado na presença de concentrações crescentes de exoantígeno de *T.rubrum*.

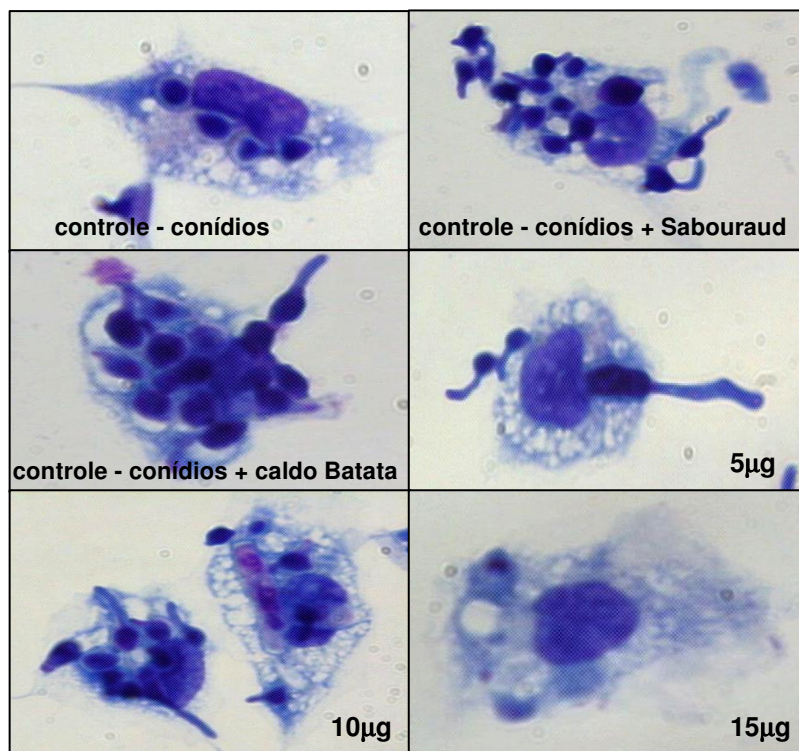


Figura 5 – Conídios fagocitados por macrófagos e diminuição da capacidade fagocítica dos macrófagos com aumento da concentração de exoantígeno de *T.rubrum* (MOC-1000x).

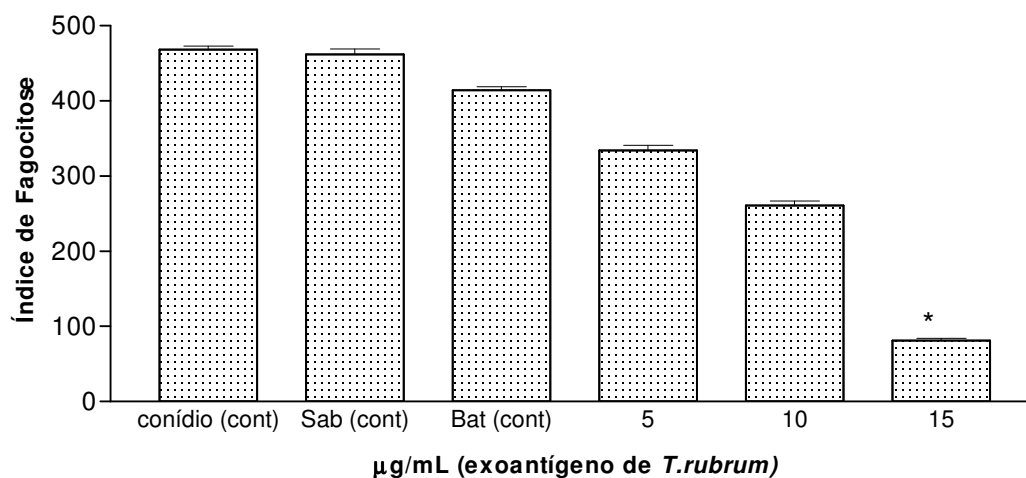


Figura 6 – Índice de Fagocitose - macrófagos incubados com conídios e concentrações crescentes de exoantígeno de *T.rubrum*.

conídios (cont) - macrófagos cultivados com conídios de *T.rubrum*;

Sab (cont) - macrófagos cultivados com Sabouraud-dextrose caldo e conídios;

Bat (cont) - macrófagos cultivados com caldo Batata e conídios;

5, 10 e 15µg - macrófagos cultivados com conídios e concentrações crescentes de exoantígeno de *T.rubrum* (5, 10 e 15µg).

* $p < 0,05$ em relação aos macrófagos cultivados apenas com conídios, com Sabouraud-dextrose caldo e caldo Batata (controles).

4.3.3. Conídios de *T.rubrum* em presença de manana

Com a finalidade de verificar se a via da manose atua de forma significativa no processo de fagocitose, macrófagos foram incubados com manana em diferentes concentrações. Em seguida, foram acrescentados à cultura, conídios de *T.rubrum* e avaliado o Índice de Fagocitose. Foi verificada uma diminuição significativa no Índice de Fagocitose de conídios pelos macrófagos, na presença de manana. Além disso, observou-se que 50µg de manana foram suficientes para saturar os receptores de manose dos macrófagos, pois o Índice de Fagocitose não apresentou variação quando macrófagos foram incubados com 100µg de manana.

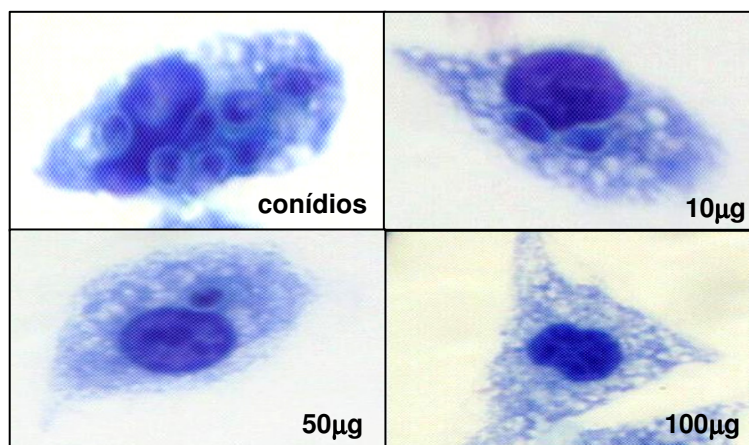


Figura 7 – Conídios fagocitados por macrófagos e diminuição na capacidade fagocítica com aumento da concentração de manana (MOC 1000x).

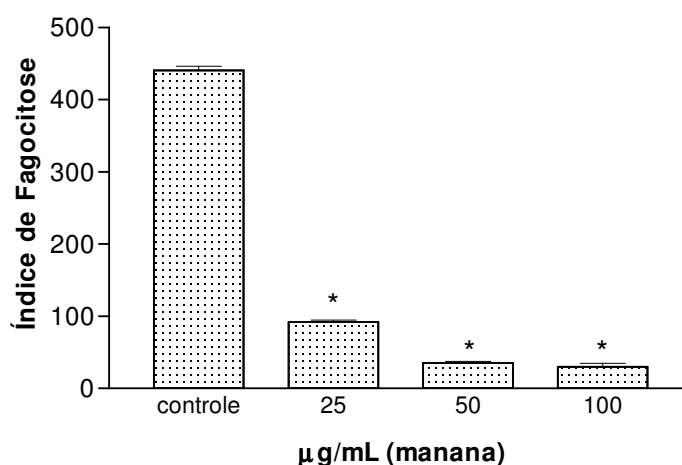


Figura 8 – Índice de Fagocitose - macrófagos incubados com conídios de *T.rubrum* e concentrações crescentes de manana.

controle - macrófagos cultivados com conídios de *T.rubrum*;

25, 50 e 100µg/mL - macrófagos cultivados com conídios e concentrações crescentes de manana.

* $p < 0,05$ em relação aos macrófagos cultivados apenas com conídios do fungo (controle).

4.4. Expressão de moléculas de superfície de macrófagos na presença de exoantígeno e conídios de *T.rubrum*

A análise dos resultados demonstra que os macrófagos cultivados com exoantígeno de *T.rubrum* não apresentaram diminuição na expressão de suas moléculas de superfície. Entretanto, os macrófagos que fagocitaram os conídios diminuíram significativamente a expressão das moléculas de superfície, tais como MHC classe II, CD80 e CD54.

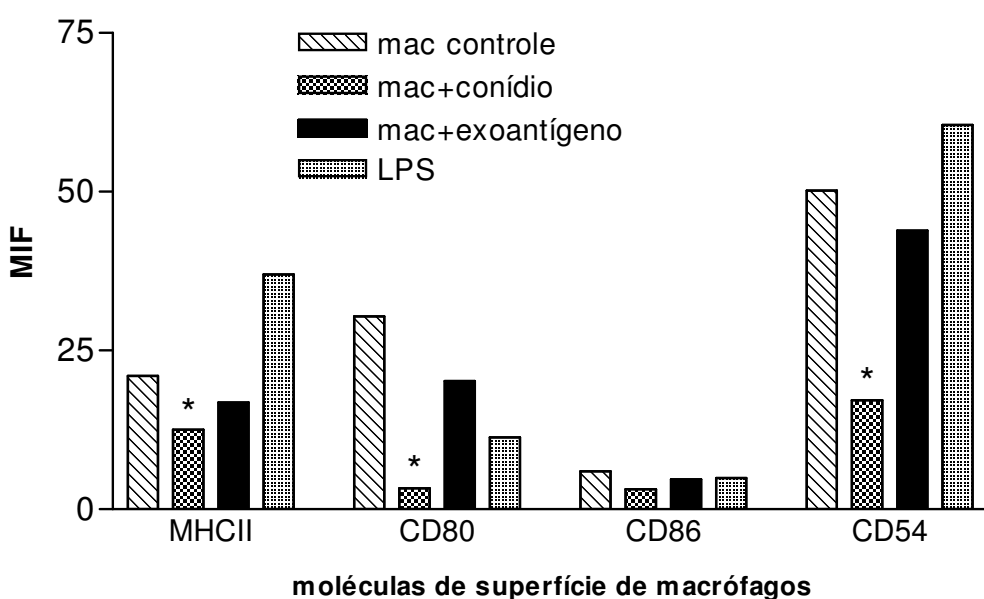


Figura 9 – Média de intensidade de fluorescência (MIF) - expressão das moléculas de superfície celular de macrófagos cultivados com conídios de *T.rubrum* e seu exoantígeno.

mac controle - macrófagos;

mac+conídio - conídios de *T.rubrum* fagocitados por macrófagos;

mac+exoantígeno - exoantígeno do fungo;

LPS - LPS como controle positivo de ativação.

* $p < 0,05$ quando comparados com macrófagos na ausência de estimulação.

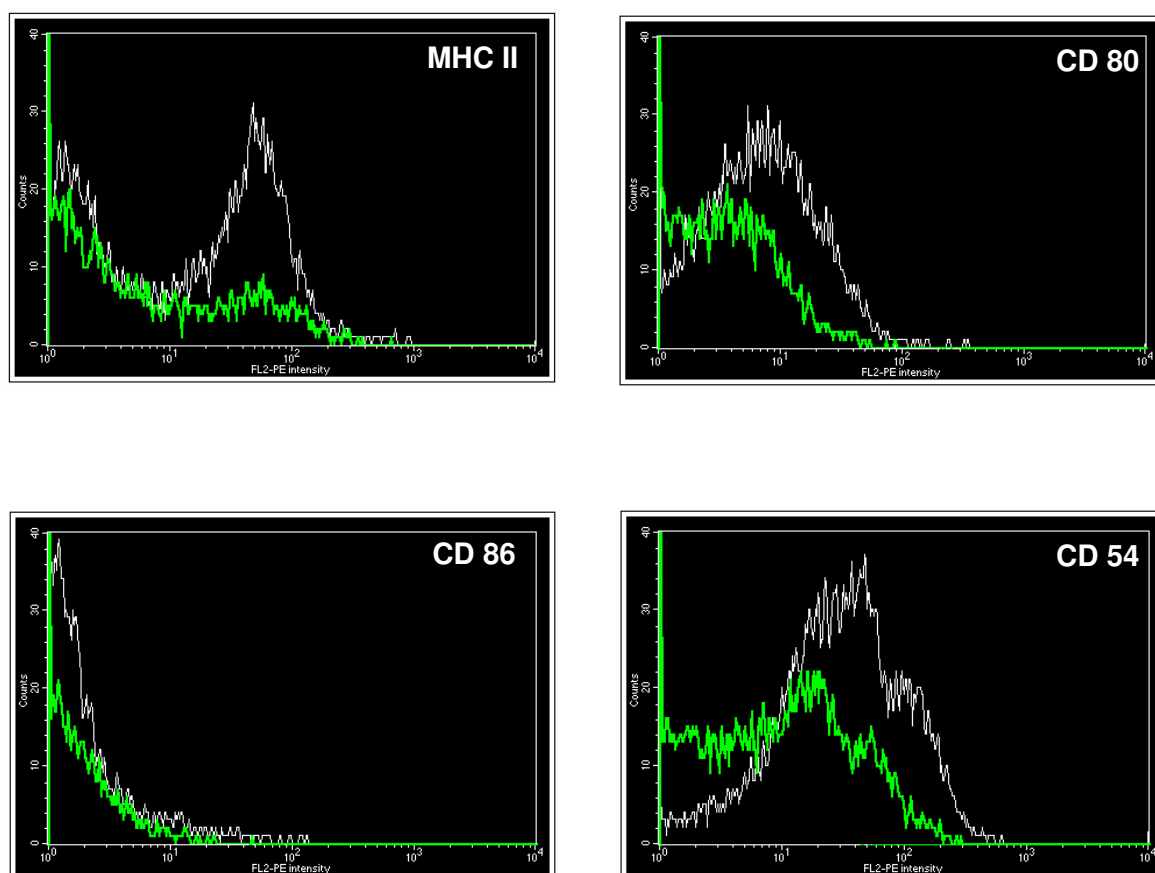


Figura 10 – Média de Intensidade de Fluorescência da expressão de moléculas de superfície celular de macrófagos estimulados ou não com conídios de *T.rubrum* (leitura em Citômetro de Fluxo).

Apenas macrófagos – linha branca;

Macrófagos em presença de conídios de *T.rubrum* – linha verde.

4.5. Dosagem de citocinas e liberação de óxido nítrico

A seguir dosamos as citocinas TNF- α , IL-12 e IL-10 e avaliamos a liberação de óxido nítrico por macrófagos cultivados com conídios de *T.rubrum* e em paralelo com exoantígeno. A análise dos resultados mostrou que os macrófagos que foram incubados com os conídios de *T.rubrum* apresentaram um aumento significativo da síntese de TNF- α e IL-10, entretanto não houve produção de IL-12 nem liberação de óxido nítrico. Já os macrófagos cultivados com exoantígeno do fungo não apresentaram secreção destas citocinas nem de óxido nítrico.

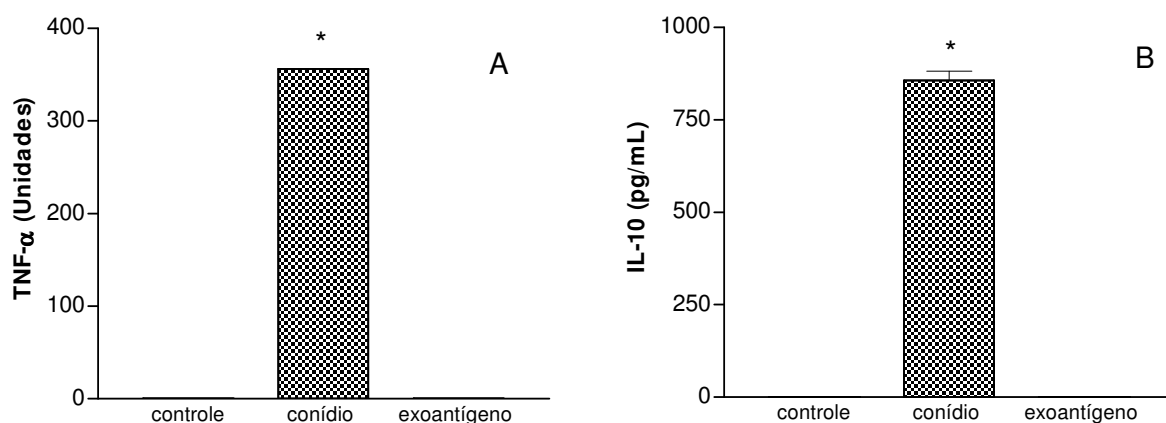


Figura 11 – Produção de TNF- α (A) e IL-10 (B) por macrófagos cultivados com conídios de *T.rubrum* e em paralelo com exoantígeno.

controle - macrófagos na ausência de estimulação;

conídio - macrófagos cultivados com conídios de *T.rubrum*;

exoantígeno - macrófagos cultivados com exoantígeno do fungo.

* $p < 0,05$ quando comparado com macrófagos na ausência de estimulação (controle) e com macrófagos estimulados com exoantígeno (exoantígeno).

8 horas de cultura	TNF- α (U/mL)	IL-12 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	NO (μ M)
conídio	356	0	900	0
exoantígeno	0	0	0	0

4.6. Análise de viabilidade de conídios de *T.rubrum* fagocitados por macrófagos

Com a finalidade de verificar por quanto tempo os conídios de *T.rubrum* permanecem viáveis no interior dos macrófagos, estas células foram incubadas com conídios. As culturas foram mantidas por períodos de 6, 8, 10 e 12 horas, quando então, as placas foram lavadas para retirar os conídios não fagocitados. Em seguida, os macrófagos que permaneceram na placa foram lisados para liberar os conídios do seu interior. 100µL da suspensão final foram semeados em Sabouraud-dextrose ágar, mantido a 25°C por 7 dias, quando as unidades formadoras de colônias do fungo cresceram e puderam ser contadas.

Verificamos, por meio dos resultados, que a partir de 10 horas ocorre uma diminuição na quantidade de colônias de fungo formadas.

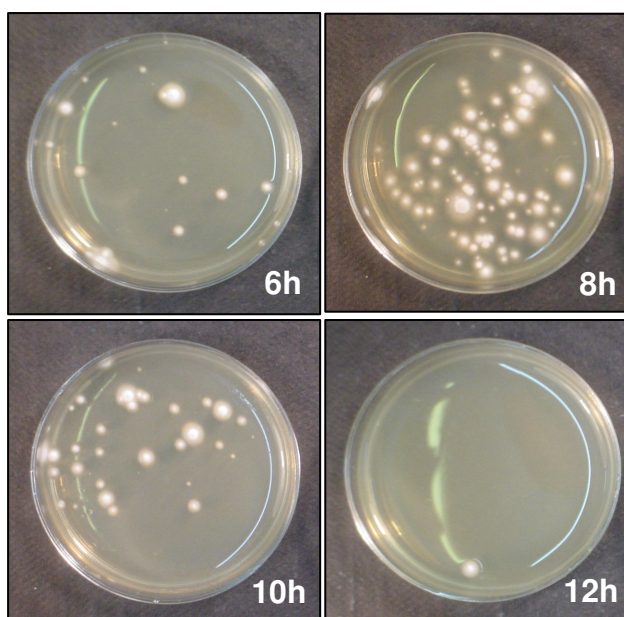


Figura 12 – Unidades formadoras de colônias de *T.rubrum* obtidas após 6, 8, 10 e 12 horas de incubação.

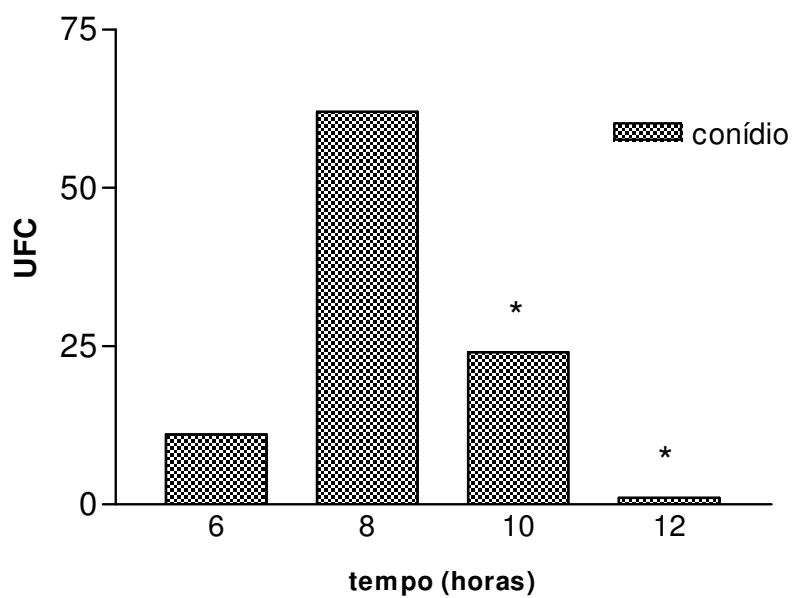


Figura 13 – Unidades formadoras de colônias de *T. rubrum* cultivados com conídios do fungo.

conídio - macrófagos cultivados com conídios de *T. rubrum*.

6, 8, 10 e 12 - culturas realizadas em 6, 8, 10 e 12 horas.

* $p < 0,05$ quando comparados com unidades formadoras de colônias em 8 horas de cultivo.

4.7. Viabilidade de macrófagos

4.7.1. Microscopia óptica

Analisando os resultados obtidos, verificamos que a partir de 10 horas praticamente não houve mais crescimento do fungo nas placas. Para auxiliar a interpretação destes resultados, isto é, para verificar se os macrófagos foram capazes de eliminar os conídios ou se os conídios lisaram os macrófagos, estes foram cultivados com as mesmas quantidades de conídios, nos mesmos períodos de tempo, para análise microscópica.

Só então, foi possível verificar que a partir de 10 horas houve liberação dos conídios, que haviam sido fagocitados, para o sobrenadante. Quando as placas foram lavadas, de acordo com o protocolo utilizado, os conídios foram desprezados, pois não estavam mais no interior dos macrófagos, provavelmente pela lise da membrana celular. Observamos que os conídios iniciaram um processo de desenvolvimento no interior dos macrófagos, inclusive com a formação de hifas. Foi realizada a contagem do número de células no aumento de 200x em 3 campos, obtendo-se uma média.

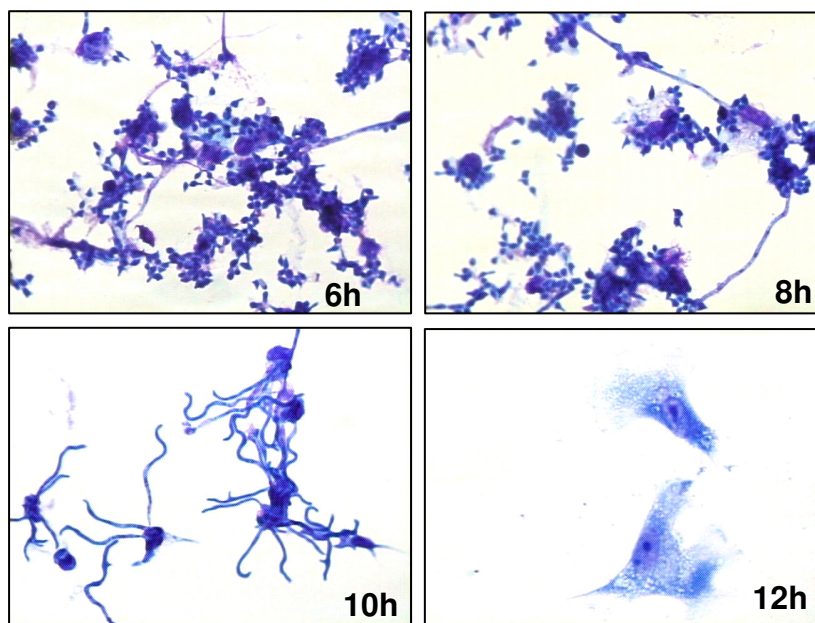


Figura 14 – Fotografia de conídios de *T. rubrum* internalizados por macrófagos se desenvolvendo no seu interior (MOC-200x).

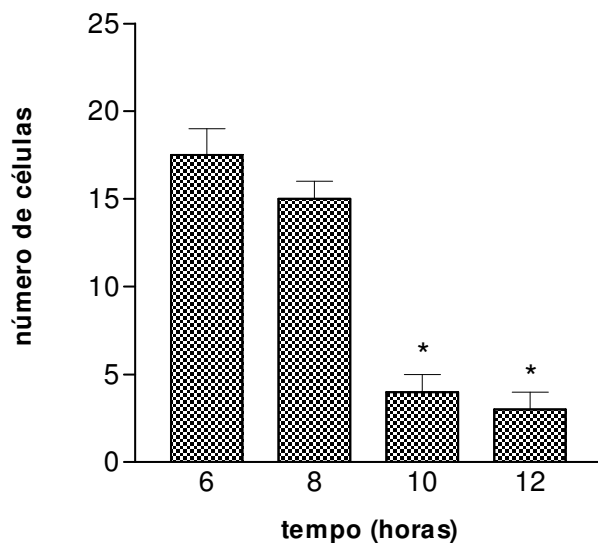


Figura 15 – Média das células contadas por campo (MOC-200x).

* $p < 0,05$ quando comparados com 6 e 8 horas de cultura.

4.7.2. Densidade óptica

Após a contagem do número de células, o material fixado foi descorado com metanol e a densidade óptica foi determinada em 620nm. Os resultados obtidos confirmaram diminuição do número de células encontradas nas placas nos períodos de 10 e 12 horas.

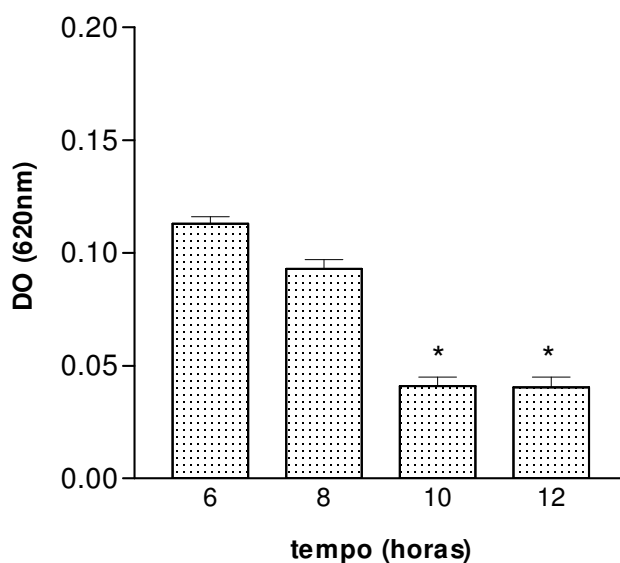


Figura 16 – Densidade Óptica (620nm).

* $p < 0,05$ quando comparados com 6 e 8 horas de cultura.

4.8. Comparação da viabilidade de macrófagos após fagocitose de conídios de *T.rubrum* e sob a ação do seu exoantígeno

Com a finalidade de verificar se a ação tóxica do *T.rubrum* ocorre por conta dos produtos de liberação deste fungo (exoantígeno), o mesmo ensaio foi realizado com acompanhamento pela microscopia óptica, desta vez testando apenas macrófagos como controle negativo, macrófagos e conídios em cinco períodos de tempos (4, 6, 8, 10 e 12 horas) e finalmente, macrófagos cultivados com exoantígeno de *T.rubrum* em dois períodos de tempo (8 e 10 horas).

Observamos através da microscopia óptica que os macrófagos sem estímulo nenhum permanecem viáveis durante todo o tempo de ocorrência do ensaio. Acrescentando os conídios de *T.rubrum*, observamos a ocorrência de fagocitose pelos macrófagos num período de 4 horas. A partir de 6 horas, os conídios no interior dos macrófagos passam a se desenvolver e a formar hifas.

Já o exoantígeno, não foi capaz de causar a morte dos macrófagos, estimulando apenas a formação de vacúolos no seu interior.

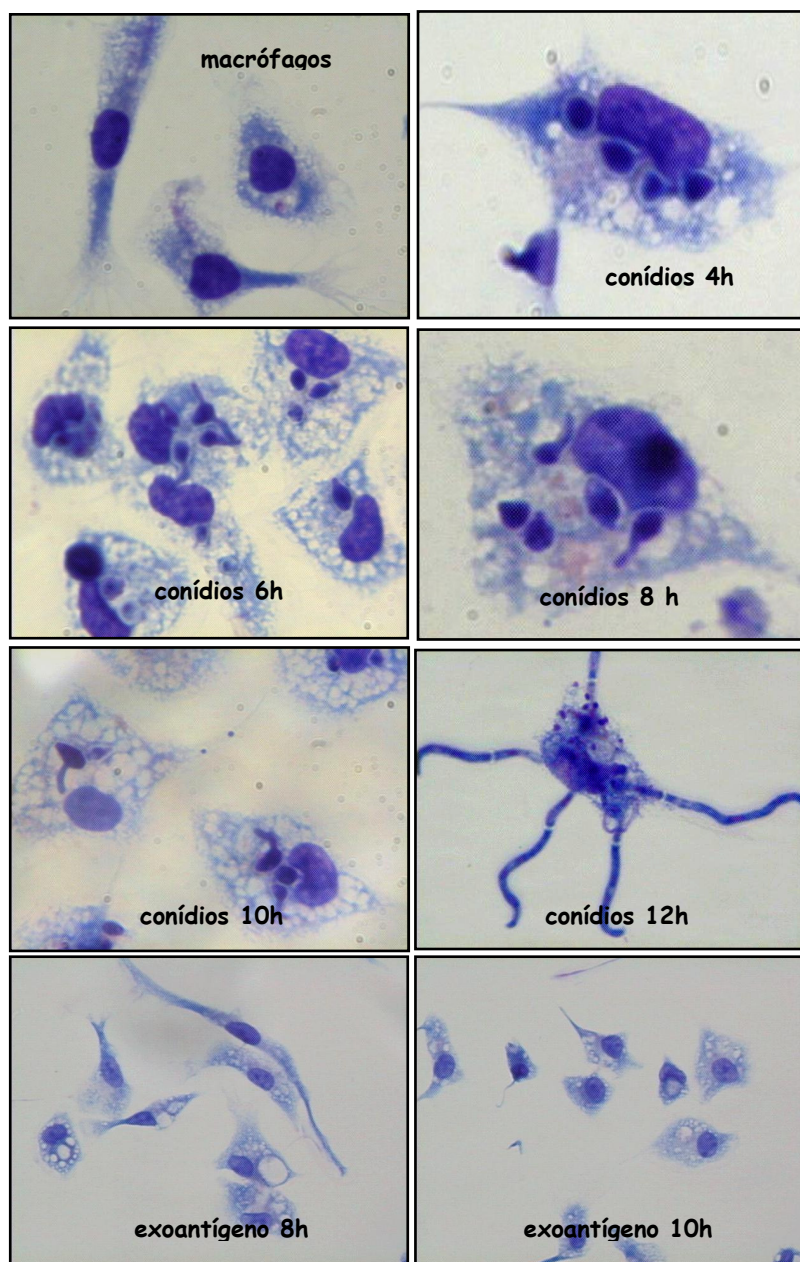


Figura 17 – Fotografia de conídios fagocitados por macrófagos mostrando processo de formação de hifas no seu interior (MOC-1000x) e macrófagos cultivados com exoantígeno de *T.rubrum* provocando apenas a formação de vacúolos (MOC-200x).

4.9. Viabilidade de macrófagos após fagocitose de conídios de *T.rubrum* cultivados com anti-TNF- α ou anti-IL-10

Com a finalidade de verificarmos se a causa da morte dos macrófagos ocorreu graças à ação de TNF- α ou IL-10, macrófagos foram cultivados com conídios de *T.rubrum* e com anticorpos anti-TNF- α ou anti-IL-10.

Os resultados mostraram que o bloqueio dessas citocinas não interferiu no processo de desenvolvimento de conídios no interior dos macrófagos.

4.10. Dosagem da enzima desidrogenase láctica

A enzima desidrogenase láctica apresenta-se aumentada na ocorrência de lise celular, já que se trata de uma enzima presente no interior de todas as células. Com a finalidade de comprovar a ocorrência de lise da membrana dos macrófagos pela formação de hifa no seu interior, a enzima foi dosada no sobrenadante de cultura de macrófagos, macrófagos cultivados com conídios de *T.rubrum* e em paralelo com seu exoantígeno. Observamos, pelos os resultados, que 8 horas após os macrófagos terem fagocitado os conídios, ocorreu aumento da enzima, apresentando o pico máximo em 10 horas, indicando que houve rompimento da membrana celular e morte das células. Quando os macrófagos forma cultivados com exoantígeno, os níveis de desidrogenase láctica foram praticamente os mesmos aos observados com os obtidos do sobrenadante da cultura apenas de macrófagos, mostrando que não há ocorrência de lise.

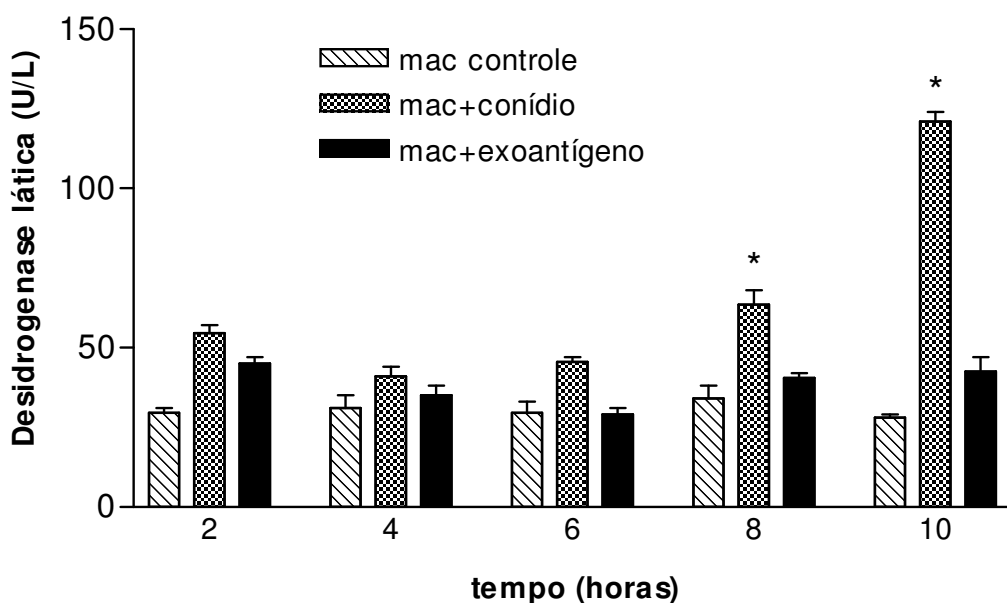


Figura 18 – Níveis de desidrogenase láctica dosada do sobrenadante de culturas de mac controle – macrófagos;
mac+conídio – macrófagos e conídios;
mac+exoantígeno – macrófagos cultivados com exoantígeno.

* $p < 0,05$ quando comparados com macrófagos cultivados com conídios em 2, 4 e 6 horas.

4.11. Microscopia Eletrônica

Com o objetivo de confirmar os resultados obtidos até então, foi realizado o mesmo ensaio, de cultura de células com macrófagos e conídios, mas desta vez, a suspensão foi preparada para microscopia eletrônica. As culturas foram incubadas por 6, 8, 10 e 12 horas.

Os resultados mostraram claramente que a partir de 8 horas os conídios passaram a se desenvolver no interior dos macrófagos, com formação de hifas levando a lise e conseqüente morte destas células.

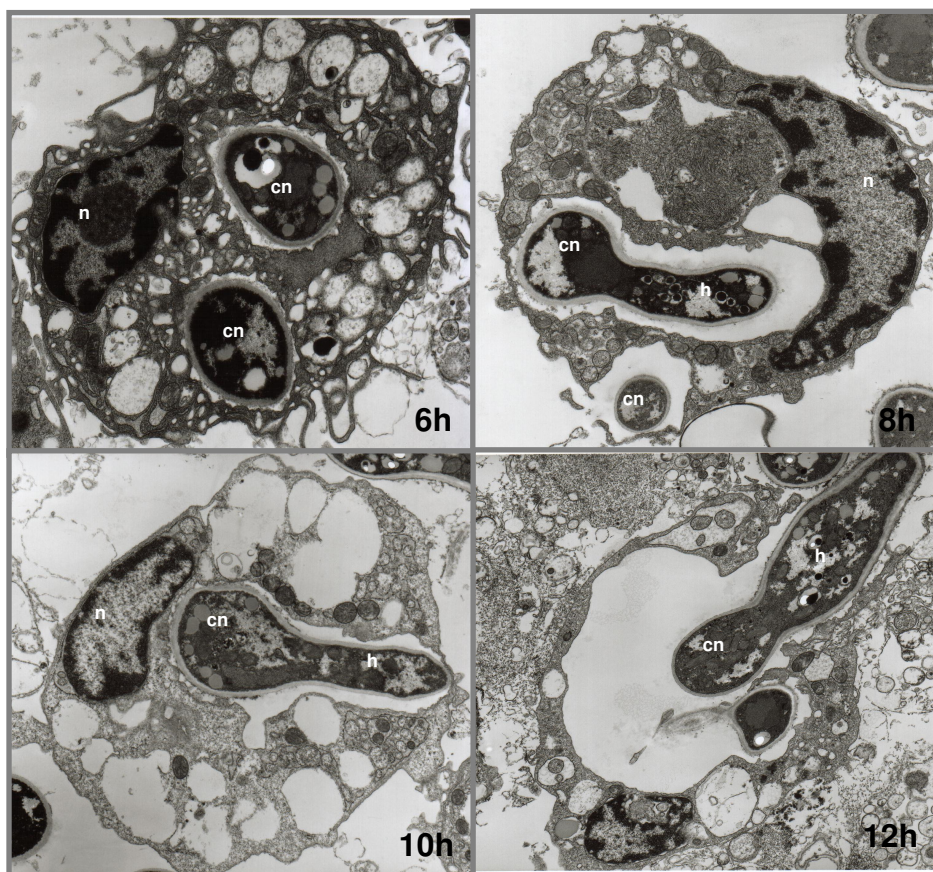


Figura 19 – Fotografia de conídios fagocitados por macrófagos mostrando processo de lise celular provocado pelo desenvolvimento dos conídios no interior destas células. (5000x)

n-núcleo do macrófago;

cn-conídio de *T.rubrum*;

h-hifa.

5. DISCUSSÃO

Dermatofitoses crônicas normalmente são causadas por *T.rubrum*. As espécies antropofílicas são as mais comuns, especializadas para a vida parasitária e perfeitamente adaptadas ao tecido queratinizado humano, tendendo a produzir infecções menos inflamatórias e mais crônicas⁵. As lesões causadas por estas espécies apresentam evolução lenta e os pacientes cronicamente infectados não respondem bem à terapia antifúngica^{6,7}.

Há ainda muito por esclarecer, no que se refere à resposta imunológica na erradicação da dermatofitose²¹. Até o presente, os trabalhos realizados com dermatófitos tratam da resposta imune mediada por linfócitos e poucos estudos têm focado a resposta inata por macrófagos. Como esta resposta representa um mecanismo de extrema importância na primeira linha de defesa do organismo, estudamos a interação de *T.rubrum* com macrófagos peritoneais de camundongos para entendermos alguns pontos relacionados com a principal característica desta micose, a cronicidade observada nas lesões e conseqüente persistência da infecção no organismo do hospedeiro.

Os mecanismos imunológicos de defesa contra fungos são mediados principalmente por células, especializadas na captura, englobamento e destruição dos microrganismos. Os macrófagos, residentes nos tecidos e os neutrófilos, que circulam no sangue e penetram nos tecidos somente quando estes estão infectados, são as células centrais da imunidade inata⁵⁹. Pacientes que apresentam deficiência neste tipo de imunidade, freqüentemente desenvolvem infecções fúngicas extensas e recorrentes na pele, no couro cabeludo, unhas e mucosas^{31, 32, 33}.

O reconhecimento e fagocitose dos microrganismos ocorrem através de receptores presentes nos macrófagos⁵⁸. Alguns receptores fagocíticos reconhecem açúcares comuns na parede de microrganismos, sendo denominados receptores lectina. Entre eles estão o receptor manose e o receptor β -glucano. O receptor manose é uma proteína transmembrana de 175kDa com uma cauda citoplasmática de apenas 45 aminoácidos e uma porção extracelular formada por oito domínios lectina tipo-C, uma região de fibronectina tipo II e outra região rica em cisteína. O receptor manose

reconhece oligo-manoses, α -ligadas como as presentes no zymosan e na manana. O receptor manose é expresso em macrófagos e células dendríticas e a estimulação com IFN- γ ou LPS diminuem sua expressão. O receptor β -glucano, reconhece oligossacarídeos ligados através de ligação β e em conjunto com o receptor manose participa do reconhecimento de microrganismos. A Dectina -1 é o receptor β -glucano mais bem caracterizado, apresenta um único domínio lectina-like e uma cauda citoplasmática contendo motivos ITAM⁷¹.

Neste trabalho, avaliamos a interação dos macrófagos com conídios de *T.rubrum*, além de analisarmos a ação dos produtos liberados pelo fungo (exoantígenos) sobre estas células. Verificamos que a adição de manana inibiu de uma maneira dose-dependente, mas não totalmente a fagocitose de conídios de *T.rubrum*. Estes achados indicam que a fagocitose dos conídios poderia ter ocorrido pelo receptor de manose ou β -glucano, ou ambos.

Os nossos resultados mostraram que exoantígenos de *T.rubrum* foram capazes de inibir a fagocitose de partículas de zymosan e de conídios do fungo. Entretanto, verificamos que estas substâncias liberadas pelo fungo não tiveram ação sobre a expressão de moléculas de superfície celular, nem na produção de citocinas e óxido nítrico. Além disso, verificamos que o exoantígeno não teve ação tóxica sobre os macrófagos, promovendo apenas a formação de vacúolos no seu interior.

Já a fagocitose de conídios teve conseqüências funcionais para os macrófagos, pois resultou na diminuição significativa da expressão de suas moléculas de superfície, tais como MHC classe II, CD80 e CD54. Portanto, é provável que o processo de ativação de linfócitos T, via apresentação de antígenos, esteja prejudicado. Talvez a inibição da resposta imune adaptativa (ativação de linfócitos T) seja um mecanismo de escape utilizado pelo fungo para se adaptar ao hospedeiro.

A viabilidade de conídios do fungo fagocitados por macrófagos foi avaliada pela contagem do número de unidades formadora de colônias. Observamos que a partir de determinado período de incubação, não houve

mais crescimento de fungo na placa de meio de cultura, onde havia sido semeada a suspensão de conídios liberados do interior de macrófagos.

Em 1987, verificou-se que neutrófilos estimulados com Concanavalina A, apresentavam atividade citotóxica sobre conídios de *T.rubrum* fagocitados por estas células. Estes resultados foram verificados quando a suspensão semeada em meio Sabouraud-dextrose ágar, contendo conídios liberados por células lisadas, não apresentaram crescimento de colônias deste fungo⁶⁵.

Em outro trabalho, verificou-se que macrófagos alveolares murinos foram capazes de fagocitar e matar conídios de *Aspergillus fumigatus* através de reativos intermediários do oxigênio. A deficiência na produção desta substância causada por corticoesteróides, foi responsável pelo desenvolvimento de aspergilose invasiva em camundongos imunocomprometidos⁶³.

Outro estudo mostrou que células fagocíticas como os macrófagos alveolares e as mononucleares circulantes apresentaram uma intensa atividade antifúngica contra *Penicillium marneffe*. A ativação destas células fagocíticas com M-CSF aumentou sua capacidade de eliminar conídios do fungo por meio da explosão respiratória da célula⁶⁴.

A partir dos resultados obtidos com o ensaio de viabilidade de conídios e pela análise dos trabalhos citados na literatura, interpretamos que os macrófagos haviam eliminado os conídios do seu interior e, por isso, não houve mais o crescimento do fungo na placa.

Entretanto, verificamos, através de microscopia óptica, que após 8 horas em cultura, os conídios fagocitados iniciaram um processo de crescimento no interior dos macrófagos, com formação de hifas. Pela microscopia eletrônica, confirmamos esses achados e observamos que a formação de hifas levou à ruptura da membrana, causando lise e conseqüente morte dos macrófagos. Além disso, encontramos no sobrenadante destas culturas, níveis elevados de desidrogenase láctica, uma enzima usada como marcador de necrose, indicando que as hifas de *T.rubrum* romperam a membrana dos macrófagos, levando-os à morte.

A partir de então, foi possível interpretarmos os dados obtidos no ensaio de viabilidade de conídios. De acordo com o protocolo utilizado, as placas contendo macrófagos foram lavadas para remoção de conídios não fagocitados. Com isso, os conídios foram removidos da placa, pois não estavam mais no interior dos macrófagos. Nesta situação, fica claro que o não crescimento do fungo no cultivo ocorreu devido à remoção dos conídios e hifas e não a uma ação fungicida dos macrófagos.

Nossos resultados mostraram que macrófagos infectados por *T.rubrum* produziram altos níveis de IL-10 e TNF- α , ou seja, citocinas típicas de efeito anti-inflamatório e pró-inflamatório, respectivamente. Esses resultados podem indicar que reação inflamatória local na infecção pode ser uma resultante dos efeitos antagônicos dessas citocinas. Examinamos em seguida, se IL-10 e TNF- α poderiam estar influenciando o crescimento dos conídios no macrófago. Para tanto, utilizamos anti-IL-10 e anti-TNF- α nas culturas e observamos que a inibição de ambas não influenciou a morte dos macrófagos provocada pelos conídios. Concluímos, então, que estas citocinas não agem de forma autócrina no controle do crescimento do fungo em macrófagos infectados. Entretanto, o papel destas citocinas na resposta inflamatória fica ainda por ser esclarecido.

Estudos recentes mostraram que os mecanismos dependentes de receptor Toll-like 2, induzidos por certos microrganismos contribuem para evasão ou inibição da resposta imune. Por exemplo, infecções por *Yersinia enterocolitica* ou *Candida albicans* ativam receptor Toll-like 2, mediados por ativação de receptor β -glucano (Dectina-1) e induzem a produção de IL-10. No caso de infecção por *Candida*, esse efeito é potencializado por linfócitos T reguladores CD4⁺CD25⁺. A ausência de receptor Toll-like 2 em camundongos *Knockout* levaram a uma maior resistência à infecção por *Yersinia* e *Candida*^{72,73}. Dentro desta ótica, foi mostrado que *Aspergillus fumigatus* também evadiu a resposta imune durante a germinação através da produção de IL-10 mediado por receptor Toll-like 2, enquanto efeitos proinflamatórios, mediados por receptor Toll-like 4 perderam seu sinal⁷⁴. Estes trabalhos sugerem que muitos patógenos fúngicos, tais como *C. albicans* e *A. fumigatus* induzem citocinas

antiinflamatórias mediadas por receptor Toll-like 2 para modular as funções do sistema imune e se adaptar ao hospedeiro.

Um outro aspecto que merece ser discutido é o fato de conídios de *T.rubrum* não terem induzido macrófagos a secretarem IL-12 e, ao contrário, induziram a secreção de uma alta quantidade de IL-10 e TNF- α . Sabe-se que citocinas de perfil Th1 (IL-12 e IFN- γ) promovem a diferenciação de linfócitos que expressam T-bet e secretam IFN- γ (linfócitos com fenótipo Th1). Por outro lado, a ativação de receptores de IL-4, favorece a expressão de GATA-3 e produção de maior quantidade de IL-4 (linfócitos com fenótipo Th2)⁷⁵. Foi descrito que IL-10 promove a diferenciação de células T reguladoras que produzem maior quantidade de IL-10, denominadas Tr1⁷⁶. É provável que a infecção pelo fungo induza células T reguladoras. Já em relação a TNF- α , não há estudos que definam o seu papel na diferenciação de linfócitos T.

Em nosso trabalho, demonstramos que manana inibiu a fagocitose de *T.rubrum*. Sabe-se que manana pode interagir com receptores de manose e β -glucano (Dectina-1). Em modelos de candidíase, foi descrito que o engajamento das leveduras com o receptor β -glucano (Dectina-1) ativam receptor Toll-like 2, promovendo liberação de IL-10. Resta investigar se o mesmo ocorre com *T.rubrum*. Ainda, de acordo com os trabalhos citados anteriormente, esta citocina com potente efeito anti-inflamatório, poderia estar influenciando a diferenciação de linfócitos T reguladores. A cronicidade de certas infecções podem ser atribuídas à presença destes linfócitos assim como foi primeiramente descrito em modelos de *Leishmania*⁷⁷.

Por estes achados e pelos estudos prévios já realizados com o *T.rubrum*, é possível que a persistência da infecção seja devido à imunossupressão mediada por IL-10 induzindo células T reguladoras, pela incapacidade de macrófagos em apresentar antígenos aos linfócitos T e pelo efeito do fungo no interior desta célula. Estes efeitos inibitórios podem explicar a incapacidade de pacientes cronicamente afetados com *T.rubrum* em erradicar o fungo do tecido infectado, permitindo sua sobrevivência e conseqüente cronicidade observada na lesão.

6. CONCLUSÕES

A análise dos resultados descritos anteriormente permite algumas conclusões, tais como:

- O exoantígeno de *T.rubrum* provocou uma inibição na capacidade dos macrófagos em realizar fagocitose. Entretanto, o exoantígeno não interferiu na expressão de moléculas de superfície celular de macrófagos e não foi capaz de estimular a secreção de TNF- α , IL-12, IL-10 e NO.
- Os conídios de *T.rubrum* foram fagocitados por macrófagos, pela via de manose.
- Os conídios fagocitados por macrófagos, provocaram diminuição significativa na expressão de moléculas de superfície celular, tais como MHC classe II, CD80 e CD54.
- Após fagocitarem os conídios, os macrófagos secretaram uma alta quantidade de TNF- α e IL-10, mas não secretaram IL-12, nem liberaram óxido nítrico.
- Após 8 horas de cultivo, os conídios fagocitados pelos macrófagos provocaram lise e conseqüente morte destas células através da formação de hifas nos seu interior. Houve liberação da enzima desidrogenase láctica no sobrenadante da cultura dos macrófagos, mostrando que houve rompimento da membrana celular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] LACAZ, C. S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C., HEINS-VACCARI, E. M., MELO, N. T. Tratado de Micologia Médica. 9^a ed. São Paulo: **Sarvier**, 2002.
- [2] GUPTA A.K., KONNIKOV N., MACDONALD P. et al. Prevalence and epidemiology of toenail onychomycosis in diabetic subjects: a multicentre survey. **Br J dermatol** Oct; 139(4): 665-671, 1998.
- [3] LOPÉZ-MARTÍNEZ R., et. al. Exoenzimas de Dermatofitos isolados de Tineas Agudas e Crônicas. **Ver. Lat-Amer. Microbiol.**, 36:17-20, 1994.
- [4] KURSTAK, E. Immunology of fungal diseases. **New York: Marcel Dekker.** v.47, 1989.
- [5] CUCÉ, L. C. & NETO, C. F. **Manual de Dermatologia**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1990.
- [6] GRAPPEL, S. F., BISHOP, C. T., BLANK, F. Immunology of dermatophytes and dermatophytosis. **Bacteriol. Rev.**, v.38, p. 222-50, 1974
- [7] CREMER, G., ROUJEAU, J. C., HOUIN, R., et al. Chronic dermatophyte infections – Physio-pathology, treatment. **J. Micol. Med.**, v.5, p.2-7, 1995.
- [8] FERREIRA, W., ÁVILA, S. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas autoimunes. 2^a ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2000.
- [9] MATSUMOTO, T., AJELLO, L. Current taxonomic concepts pertaining to the dermatophytes and related fungi. **Int. J. Dermatol.**, 491-499, 1987.
- [10] CANTEROS, G. E., DAVEL, G. O., VIVOT, W. Agentes causales de onicomicose. **Ver. Arg. Microbiol.**, v.26, p.65-71, 1994.

- [11] MIDGLEY, G., MOORE, M. K., COOK, J. C., et al. Micology of nail disorders. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.31, p.s68-74, 1994.
- [12] ZAIAS, N. & REBELL, G. Chronic dermatophytosis syndrome due to *Trichophyton rubrum*. **Int. J. Dermatol**, v.35, p.614-17, 1996.
- [13] BLANK, H. Griseofulvin and dermatomycoses. Na International Symposium sponsored by the University of Miami. **Arch Derm.**, 81: 649-882, 1960.
- [14] CAMPOS, M. C. R. M., Diagnóstico Laboratorial de Micoses. Mogi das Cruzes. [Apostila do Curso de Biomedicina da Universidade de Mogi das Cruzes - UMC], 1997.
- [15] WAGNER, D. K. & SOHNLE, P. G. Cutaneous defenses against Dermatophytes and yeasts. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.8, p.317-35, 1995.
- [16] ZAITZ, C., VENDRAME, C. M., FERNANDEZ, D., et al. A possible serum factor in patients with dermatophytid of the hands. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v.4, p.194-7, 1995.
- [17] MENDEL, E. H. *Tinea circinata* and onychomycoses (*Trichophyton purpureum*): resistance to griseofulvin during uncontrolled diabetis. **Arch. Dermatol.**, v.82, p.1027, 1960.
- [18] NELSON, R. D., SHIBATA, N., PODZORSKI, R. P., et al. *Candida mannan*: Chemistry, supresión of cell-mediated immunity and possible mechanisms of actino. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.4, p.1-19, 1991.
- [19] FINDLING, J. W., TYRREL, J. N., ARON, D. C., et al. Fungal infections in cushing's syndrome. **Ann. Intern. Med.**, v.395, p.92, 1981.

[20] BLATT, S. O., HENDRIX, C. W., BUTZIN, C. A., et al. Boswell. **Ann. Intern. Med.**, v.119, p.77-84, 1993.

[21] ZAITZ, C. Produção de Antígenos de *Trichophyton mentagrophytes* para estudo de aspectos imunológicos das dermatofitoses e das dermatofitides. Tese apresentada ao Departamento de Dermatologia da Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Doutor, 1992.

[22] GRAPPEL, S.F., BISHOP, C.T., BLANK, F. Immunology of dermatophytes and dermatophytosis. **Bacteriol Ver**, v.38, p.222-50, 1974.

[23] ZAITZ, C. Imunologia das Dermatofitoses. **An. Bras. Dermatol**, Rio de Janeiro, v.69(3), p.217-222, 1994.

[24] TOEWS, G.B., BERGSTRESSER P.R., STREILEN, J.W. Langerhans cells: sentinels of skin associated lymphoid tissue. **J Invest Dermatol**, 78:78-82, 1980.

[25] BRAATHEN, L.R., KAAMAN, T. Human epidermal Langerhans cells induce cellular immune response to trichophytin in dermatophytosis. **Br J Dermatol**, 109, 295-300, 1983.

[26] SZEPESE, E., MAGYARLAKI, M., BATTYANI, Z., et al. Immunohistological characterization of the cellular infiltrate in dermatophytosis. **Mycoses**, v.36, p.203-6, 1993.

[27] BRAATHEN, L. R. Human epidermal Langerhan's cells induce cellular immunity tottrichophytin in dermatomycosis. **Br. J. Dermatol.**, 109:295-300, 1983.

- [28] CRUICKSHANK, C.N.D., TROTTER, M.D., WOOD, S.R. Studies on trichophytin sensitivity. **J Invest Dermatol**, 35: 219-23, 1960.
- [29] NEISSER A. Plato's versuche uber die herstellung und verwendung von trichophytin. **Arch Derm Syph**; 60:63-73, 1902.
- [30] SVEJGAARD E. Immunologic investigations of dermatophyte and dermatophytosis. **Semin Dermatol**; 4: 201-21, 1995.
- [31] STAUGHTON, R. Skin manifestations in AIDS patients. **Br. J. Clin. Pract. Symp. Suppl.**, 71: 109-113, 1990.
- [32] HUNZIKER, N. & BRUN, R. Lack of delayed reaction in presence of cell-mediated immunity in trichophytin hipersensitivity. **Arch. Dermatol.**, 116, 1266-1268, 1980.
- [33] KAAMAN, T. The clinical significance of cutaneous reaction to trichophytin in dermatophytosis. **Acta Derm. Venereol.**, 58, 139-143, 1978.
- [34] HANIFIN, J.M., RAY, L.F. & LOBITZ, W.C. Immunological reactivity in dermatophytosis. **Br. J. Dermatol.**, 90, 1-8, 1974.
- [35] WOODFOLK JA, PLATTS-MILLS TA. The immune response to dermatophytes. **Res Immunol**, 149(4-5): 436-45, 1998.
- [36] LEPPER, A.W.D. Experimental bovine *Trichophyton verrucosum* infection. The cellular responses in primary lesions of the skin resulting from surface or intradermal inoculation. **Res. Vet. Sci.**, 16, 287-298, 1974.
- [37] KAAMAN, T. Cell-mediated reactivity in dermatophytosis: difference in skin responses to purified trichophytin in tinea pedis and tinea cruris. **Acta Derm. Venereol.**, 61, 119-123, 1981.

- [38] ROMANI, N., KANIPGEN, E., KOCH, F., HEUFLE C., & SCHULER G. Dendritic cell production of cytokines and responses to cytokines. **Int. Rev. Immunol.**, 6, 151-161, 1990.
- [39] SMITH KJ, WELSH M, SKELTON H. *Trichophyton rubrum* showing deep dermal invasion directly from the epidermis in immunosuppressed patients. **Br J Dermatol.** 145(2):344-8, 2001.
- [40] HAY, R.J. & SHENNAN, G. Chronic dermatophyte infections. - II. Antibody and cell-mediated immune responses. **Br. J. Dermatol.**, 106, 191-198, 1982.
- [41] WOODFOLK, J.A., WHEATLEY, L.M., BENJAMIN, D.C., PIYASENA, R.V. & PLATTS-MILLS, T.A.E. A novel Trichophyton allergen is a member of the subtilase family of serine proteinases. **J. Allergy Clin. Immunol.**, 101(1), S153, 1998.
- [42] LEIBOVICI, V., EVRON, R., AXELROD, O. Imbalance of immune responses in patients with chronic and widespread fungal skin infection. **Clin. Exp. Dermatol.**, v.20, p.390-4, 1995.
- [43] MOSER, S.A. & POLLACK, J.D. Isolation of glycopeptides with skin test activity from dermatophytes. **Infect. Immun.**, 19, 1031-1046, 1978.
- [44] BARKER, S.A., CRUICKSHANK, C.N.D., MORRIS, J.H. & WOOD, S.R. The isolation of trichophytin glycopeptide and its structure in relationship to the immediate and delay hypersensitivity reactions. **Immunology**, 5, 627-631, 1962.
- [45] DEUEL, B., ARRUDA, L.K., HAYDEN, M.L., CHAPMAN, M.D. & PLATTS-MILLS, T.A.E. *Trichophyton tonsurans* allergen: characterization of a protein that causes immediate but not delay hypersensitivity. **J. Immunol.**, 147, 96-101, 1991.

- [46] WOODFOLK, J. A., SLUNT, J.B., DEUELL, B., HAYDEN, M.L. & PLATTS-MILLS, T.A.E. Definition of a Trichophyton protein associated with delay hypersensitivity in humans: evidence for immediate (IgE and IgG4) and delay hypersensitivity to a single protein. **J. Immunol.**, 156, 1695-1701, 1996.
- [47] WOODFOLK, J.A., SUNG, S.J., BENJAMIN, D.C., LEE, J.K. & PLATTS-MILLS, T.A.E. Distinct human T cell repertoires mediate immediate and delay-type hypersensitivity to the Trichophyton antigen, Tri r 2. **J. Immunol**, 165: 4379-87, 2000.
- [48] SMITH, J. M. Strategies for the development of a vaccine against ringworm. *J. Med & Veterin. Mycol.*, 33: 87-91, 1995.
- [49] MOSMANN, T.R., CERWINSKI, H., BOND, M.W., GIEDLIN, M.A. & COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clones. - I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, 136, 2348-2357, 1986.
- [50] WOODFOLK JA, PLATTS-MILLS TA. Diversity of the human allergen-specific T cell repertoire associated with distinct skin test reactions: delayed-type hypersensitivity-associated major epitopes induce Th1- and Th2-dominated responses. **J Immunol**. 167(9): 5412-9, 2001.
- [51] BLAKE, J.S., DAHL, M.V., HERRON, M.J. & NELSON, R.D. Na immunoinhibitory cell wall glycoprotein (mannan) from *Trichophyton rubrum*. **Invest. Dermatol.**, 96, 657-661, 1991.
- [52] GRANDO, S.A, HOSTAGER, B.S., HERRON, M.J., DAHL, M.V. & NELSON, R.D. Binding of *Trichophyton rubrum* mannan to human monocytes *in vitro*. **J Invest. Dermatol.**, 98, 876-880, 1992.

- [53] CABRERA, R. M. Comparison of the immunoinhibitory properties of cell wall mannan glycoproteins from *Trichophyton rubrum* and *Microporum canis*. **J. Invest. Dermatol.**, 96:601, 1991.
- [54] DAHL, M. V., GRANDO, S.A. Chronic Dermatophytosis: What is special about *Trichophyton rubrum* ?. **Adv. Dermatol.**, 9: 97-109, 1994.
- [55] SCHAUFUSS P., STELLER U. Haemolytic activities of *Trichophyton* species. **Med Mycol.**41(6):511-6, 2003.
- [56] SVEJGAARD, E. Recent trends in the immunology of dermatophytosis. **Microbiol. Sci.**, v.3, p.154-9, 1986.
- [57] SADAHIRO, A. Estudo dos antígenos leucocitários humanos (HLA) em pacientes caucasianos Judeus Ashkenazitas com dermatofitose crônica causada por *Trichophyton rubrum* São Paulo, (Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo), 1998.
- [58] UNDERHILL, D.M., OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annu Rev Immunol.** 20:825-52, 2002.
- [59] PARHAM, P. O Sistema Imune. 1^a ed. Porto Alegre: **Ed Artmed**, 2001.
- [60] CALICH, V., VAZ, C. Imunologia. 1^a ed. Rio de Janeiro: **Ed. Revinter**, 2001.
- [61] ABBAS, A. K., LICHTMAN, A.H., POBER, J.S. Imunologia Celular e Molecular. 4^a ed. Rio de Janeiro: **Ed Revinter**, 2003.
- [62] RICHARDSON M.D., BELL, Y. Non-opsonic phagocytosis of *Trichophyton mentagrophytes* arthroconidia by human neutrophils in vitro. **J Med Microbiol**, 42(3):225-9, 1995.

- [63] PHILIPPE B., IBRAHIM-GRANET O., PREVOST M.C., GOUGEROT-POCIDALO M.A., SANCHEZ PEREZ M., VAN DER MEEREN A., LATGE J.P. Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. **Infect Immun.**, 71(6):3034-42, 2003.
- [64] ROILIDES E., LYMAN C.A., SEIN T., PETRAITIENE R., WALSH T.J. Macrophage colony-stimulating factor enhances phagocytosis and oxidative burst of mononuclear phagocytes against *Penicillium marneffei* conidia. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 15;36(1-2):19-26, 2003.
- [65] CALDERON R.A., HAY R.J. Fungicidal activity of human neutrophils and monocytes on dermatophyte fungi, *Trichophyton quinckeanum* and *Trichophyton rubrum*. **Immunology.** 61(3):289-95, 1987.
- [66] BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72:248-254, 1976.
- [67] LAEMMLI, V.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 227 (259):680-5, 1970.
- [68] ANSORGE, W. Fast visualization of protein bands by impregnation in potassium permanganate and silver nitrate. **Electrophoresis.** 82:235-42, 1983.
- [69] ODA, L.M.; KUBELKA, C.F., ALVIANI, C.S. & TRAVASSOS, L.R. Ingestion of yeast forms of *Sporothrix schenckii* by mouse peritoneal macrophages. **Infect. Immun.** 39:497-504, 1983.
- [70] RIBEIRO-DIAS, F., M. RUSSO, J. A. MARZAGAO BARBUTO, F. R. NASCIMENTO, J. TIMENETSKY, AND S. JANCAR.. Mycoplasma arginini enhances cytotoxicity of thioglycollate-elicited murine macrophages toward YAC-1 tumor cells through production of NO. **J Leukoc Biol.** 65:808-14, 1999.

- [71] LINEHAN, S. A., MARTÍNEZ-POMARES, L., GORDON, S. Macrophage lectins in host defence. **Microbes and Infection**, 2, 279-288, 2000.
- [72] NETEA, M. G., SUTMULLER, R., HERMANN, C., et. al. Toll-Like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cell. **J Immunol**. 172:3712-3718, 2004.
- [73] NETEA, M. G., GRAAF, C., VAN DER MEER, J. W. M., et. al. Toll-like receptor and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. **J Leukoc Biol**. 75: 749-755, 2004.
- [74] NETEA, M. G., WARRIS, A., VAN DER MEER, J. W. M., et. al. *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition during germination through loss of TLR4-mediated signal transduction. **J Infect Dis**. 188: 320-326, 2003.
- [75] MURPHY, K. M., REINER, S. L. The lineage decisions of helper T cells. **Nature**. 2:933-944, 2002.
- [76] JIANG, H., CHESS, L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. **The Journal of Clinical Invest**. 114:1198-1208, 2004.
- [77] HISAEDA, H., MAEKAWA, Y., IWAKAWA, D., et al. Escape of Malaria parasites from host immunity requires CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. **Nature**. 10:29-30, 2004.