Cristiane Beatriz de Oliveira

Análise da expressão dos receptores toll-like 2 e 4 nos queratinócitos dos doentes portadores de dermatofitoses localizadas e dermatofitoses extensas causadas por *Trichophyton rubrum*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Dermatologia
Orientador: Prof. Dr. Paulo Ricardo Criado

**São Paulo
2012**

Cristiane Beatriz de Oliveira

Análise da expressão dos receptores toll-like 2 e 4 nos queratinócitos dos doentes portadores de dermatofitoses localizadas e dermatofitoses extensas causadas por *Trichophyton rubrum*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Dermatologia
Orientador: Prof. Dr. Paulo Ricardo Criado

**São Paulo
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Cristiane Beatriz de

Análise da expressão dos receptores toll-like 2 e 4 nos queratinócitos dos doentes portadores de dermatofitoses localizadas e dermatofitoses extensas causadas por *Trichophyton rubrum* / Cristiane Beatriz de Oliveira. -- São Paulo, 2012.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Dermatologia.

Orientador: Paulo Ricardo Criado.

Descritores: 1.Tinha 2.Receptor 2 toll-like 3.Receptor 4 toll-like 4.Queratinócitos 5.Imunidade inata 6.*Trichophyton rubrum* 7.Pele 8.Micose

USP/FM/DBD-201/12

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a minha filha Julia, hoje com 7 anos, que nunca pode neste tempo todo ter a mãe por inteiro. Ora em busca do Título de Especialista, ora sonhando com o possível Título de Mestre.

Espero que ela possa primeiro me perdoar pela ausência e depois que meu exemplo a ensine a ter coragem, fé, perseverança e persistência em tudo na vida. E assim, ao longo da vida, ao se deparar com os obstáculos possa acelerar e saltar, ao invés de parar e reconhecê-lo como limite.

AGRADECIMENTOS

Agraceço a Deus e a Nossa Senhora da Abadia que sempre estiveram ao meu lado ao longo de toda a minha vida.

Agradeço ao Dr. Paulo Ricardo Criado por ter acreditado em mim, e por de fato ter me orientado em todas as fases deste trabalho, compreendendo as dificuldades e as limitações ora impostas pela distância, ora pelo acúmulo de afazeres.

Agradeço a Sra. Eli Maria de Freitas pela paciência e sabedoria, pois sem a valiosa ajuda de sua experiência esta dissertação não estaria concluída.

Agradeço a Fernanda Guedes Luiz (Imunohistoquímica) pela amizade, competência e disponibilidade.

Agradeço a equipe do laboratório de anatomia patológica em especial Jacqueline Maria Cruz Meneghin e Maria Cristina Galhardo pela gentileza e apoio de sempre.

Agradeço a Dra Neusa Y. S. Valente e a Dra Miriam N. Sotto pela confiança depositada e pelas valiosas sugestões em todas as fases do projeto.

Agradeço ao Leandro (gerência) pela disponibilidade.

Agradeço aos amigos e professores Rosana Rosa Miranda (UFTM) e Altacílio Aparecido Nunes (USP-Ribeirão Preto) a valiosa ajuda na fase final.

Agradeço ao professor Dr. Luis Fernando Ferraz da Silva a gentileza e a disponibilidade de como poucos dividir o “saber”.

Agradeço a Claudia Freitas e a Katia Cristina Dantas a amizade e incentivo.

Agradeço as Dras. Bogdana Victoria Kadunc e Jaqueline Mota as lições de vida e da profissão das quais eu procuro me lembrar nos momentos mais delicados de minha vida, e que ainda hoje são capazes de me fazer levantar, secar as lágrimas e prosseguir de cabeça erguida.

Agradeço ao Dr. Nilton di Chiacchio pela confiança de ter me aberto as portas do HSPM sempre que precisei.

Agradeço ao Dr. Mario Fernando por ter assistido meus pacientes neste período.

Agradeço ao meu marido por ter tolerado minhas oscilações de humor neste período, e a nobreza de ter adiado todos os nossos planos e sonhos em conjunto, para que eu pudesse buscar este sonho que era só meu.

Agradeço aos meus amigos de quatro patas Xuxa (*in memoriam*), Camila, Julie, Max, Pingo, João, Maia, Pips, Laila, Pula e Julianito, exemplos de superação, capazes de recarregar diariamente a minha bateria.

“Nossos sonhos podem se transformar em realidade
se os desejamos tanto ao ponto de correr atrás deles”.

Walt Disney

Esta dissertação esta de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de quadros

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de siglas

Resumo

Summary

1- Introdução.....	01
2- Objetivos.....	04
3- Revisão da literatura.....	06
3.1- Dermatofitoses: visão geral.....	07
3.2- Fatores predisponentes às infecções cutâneas por dermatófitos.....	08
3.2.1- Fatores relacionados ao hospedeiro.....	08
3.2.2- Fatores relacionados ao dermatófito.....	10
3.3- A imunidade na doença fúngica.....	14
3.3.1- A imunidade inata.....	14
3.3.2- A resposta imune adquirida.....	18
3.3.3- Células epiteliais e sua participação na imunidade.....	19
3.3.4- Outros aspectos da imunidade nas dermatofitoses.....	24
3.4- Receptores toll-like.....	29

3.4.1- Breve histórico.....	29
3.4.2- O papel dos receptores toll-like em diferentes dermatoses.....	32
3.4.3- O papel dos receptores toll-like em doenças fúngicas.....	34
4- Casuística e método.....	39
4.1- Coleta das amostras para estudo micológico.....	45
4.2- Coleta das amostras para estudo Histoquímico e Imuno-histoquímico	45
4.3- Técnica de Imuno-histoquímica.....	47
4.4- Análise das imagens.....	49
4.5- Análise estatística.....	51
5- Resultados.....	54
6- Discussão.....	80
7- Conclusões.....	93
8- Perspectivas.....	97
9- Anexos.....	99
10- Referências bibliográficas.....	113

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Micoses superficiais e os elementos da resposta imune.....	28
Figura 2 A/B/C/D- Dermatofitose extensa	42
Figura 3- Área esquemática de biópsia da lesão.....	46
Figura 4- Imagem do programa Image Pro Plus utilizado.....	51
Figura 5- Expressão do TLR2 em epiderme profunda de pele lesada em indivíduo com dermatofitose extensa, evidenciada pela marcação (área marcada) do programa Image Pro Plus (Imuno-histoquímica).....	52
Figura 6 A/B- Expressão do TLR2 em epiderme superficial e profunda de pele sã em indivíduo com dermatofitose extensa, evidenciada pela marcação (área marcada) do programa Image Pro Plus (Imuno-histoquímica).....	53
Figura 7 A/B- Expressão de TRL2 em epiderme de dois casos controles (imuno-histoquímica, aumento 200X).....	57
Figura 8 A/B- Expressão de TRL2 na epiderme de área sã e pele lesada de indivíduo com dermatofitose localizada (imuno-histoquímica, aumento 200X).....	58
Figura 9 A/B- Expressão de TRL2 na epiderme de área sã e pele lesada de indivíduo com dermatofitose disseminada (imuno-histoquímica, aumento 200X).....	59
Figura 10 A/B- Expressão de TRL4 em epiderme de dois casos controles (imuno-histoquímica, aumento 200X).....	60
Figura 11 A/B- Expressão de TRL4 na epiderme de área sã e pele lesada de indivíduo com dermatofitose localizada (imuno-histoquímica, aumento 200X).....	61
Figura 12 A/B- Expressão de TRL4 na epiderme de área sã e pele lesada de indivíduo com dermatofitose disseminada (imuno-histoquímica, aumento 200X).....	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Padrão de expressão dos Receptores Toll-like (TLRs) na epiderme normal.....	23
Quadro 2- Características dos Receptores Toll-like.....	30
Quadro 3- Relevância da expressão dos Receptores Toll-like (TLRs), em dermatoses frequentes.....	33
Quadro 4- Dados demográficos e clínicos dos pacientes controles.....	43
Quadro 5- Dados demográficos e clínicos dos pacientes portadores de dermatofitose localizada.....	44
Quadro 6- Dados demográficos e clínicos dos pacientes portadores de dermatofitoses extensa.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Expressão dos TLR2 e 4 quantificada por porcentagem de área na epiderme superficial de portadores de dermatofitoses localizadas e extensas.....	63
Tabela 2- Expressão dos TLR2 e 4 quantificada por índice de densidade óptica na epiderme superficial de portadores de dermatofitoses localizadas e extensas.....	64
Tabela 3- Expressão dos TLR2 e 4 quantificada por porcentagem de área na epiderme profunda de portadores de dermatofitoses localizadas e extensas.....	66
Tabela 4- Expressão dos TLR2 e 4 quantificada por índice de densidade óptica na epiderme profunda de portadores de dermatofitoses localizadas e extensas.....	67
Tabela 5- Comparação da expressão dos TLR2 na epiderme superficial e profunda, quantificados por índice de densidade óptica e porcentagem de área.....	69
Tabela 6- Comparação da expressão dos TLR4 na epiderme superficial e profunda, quantificados por índice de densidade óptica e porcentagem de área.....	70

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Expressão comparativa do TLR2 na pele sã e lesada de indivíduos portadores de dermatofitose extensa e localizada, e em controles sadios, quantificada através da porcentagem de área marcada na epiderme profunda e superficial..... 73

Gráfico 2- Expressão comparativa do TLR2 na pele sã e lesada de indivíduos portadores de dermatofitose extensa e localizada, e em controles sadios, quantificada através do IDO na epiderme profunda e superficial... 74

Gráfico 3: Expressão comparativa do TLR4 na pele sã e lesada de indivíduos portadores de dermatofitose extensa e localizada, e em controles sadios, quantificada através da porcentagem de área marcada na epiderme profunda e superficial..... 75

Gráfico 4: Expressão comparativa do TLR4 na pele sã e lesada de indivíduos portadores de dermatofitose extensa e localizada, e em controles sadios, quantificada através do IDO na epiderme profunda e superficial.. .76

LISTA DE ABREVIATURAS

µm- micrometro

cm.: centímetro

Dr.: Doutor

Dra(s).: Doutora(s)

ed.: edição

et al.: e outros

M- Molar

M. canis- Microsporum canis

mm- milímetro

mM- Milimol

p.: página

Prof.: Professor

Sra.: Senhora

T. rubrum- Trichophyton rubrum

LISTA DE SÍMBOLOS

% porcentagem

< menor

= igual a

> maior que

± mais ou menos

°C- grau Celsius

LISTA DE SIGLAS

CAPEPESQ- Comitê de Ética em Pesquisa

CD- Células dendríticas

CD14- antígeno de diferenciação monocitária 14

CF- Citometria de fluxo

CL- Célula de Langerhans

CMV- Citomegalovirus

CR3- Receptor 3 de complemento

DC-SIGN (CD209)- Não integrina aderida a molécula de adesão intercellular 3 específica de célula dendrítica (ICAM 3).

DNA- Ácido desoxirribonucléico

Fc Ig- Fração c da imunoglobulina

GM-CSF: fator estimulador de colônia de macrófago e granulócito

GPI- glicosilfosfatidilinositol

HC-FMUSP- Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HE- Hematoxilina eosina

HIV- Vírus da imunodeficiência humana

HLA classe II- antígeno de histocompatibilidade humana de classe II

HSPM- Hospital do Servidor Público Municipal

ICAM3- Molécula de adesão intercelular 3

IDO- Índice de densidade óptica

IFN- Interferon

Ig- Imunoglobulina

IL- Interleucina

IL1R- Receptor de interleucina 1

L Th1- Linfócitos T auxiliares tipo 1

L Th2- Linfócitos T auxiliares tipo 2

L Treg- Linfócitos T reguladores

LL37- Catelicidina 37

LP- lipoproteína

LPS- lipossacarídeo

MDDCs: célula dendrítica derivada de monócitos

MIP2- Proteína inflamatória macrofágica 2

MR- Receptor de manose

mRNA- Ácido ribonucleico mensageiro

MyD88- Fator marcador de diferenciação mielóide 88

NF-κB Fator nuclear Kappa B

NK- Natural Killer

ON: óxido nítrico

ORI- oxigênio reativo intermediário

PAF- Fator ativador de plaquetas

PAMP- Padrão Molecular Associado a Patógeno

PAS- Ácido Periódico de Schiff

PG- peptideoglicano

PG- Prostaglandina

pH- Potencial hidrogeniônico

Poly I:C- copolímero de ácido poli-inosínico e poli-citidílico

PRR(s)- Receptor(s) de Padrão de Reconhecimento

TGF β - Fator de crescimento e transformação beta

TLR 2- Receptor Toll-like 2

TLR 4- Receptor Toll-like 4

TLR(s)- Receptor(s) Toll-like

TNF α - Fator de necrose tumoral α

UFTM- Universidade Federal do Triângulo Mineiro

USP- Universidade de São Paulo

RESUMO

Oliveira CB de. Análise da Expressão dos Receptores Toll-like 2 e 4 nos Queratinócitos dos doentes Portadores de Dermatofitoses Localizadas e Dermatofitoses Extensas causadas por *Trichophyton rubrum*. (dissertação). São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo." 2012.

Introdução e objetivo: Existem poucos estudos a respeito da imunidade inata em dermatofitoses (tinhas), este trabalho estudou a expressão dos receptores toll-like 2 e 4 em dermatofitoses por *T. rubrum*.

Casuística e método: Estudaram-se sete pacientes com dermatofitose extensa, definida como pelo menos três segmentos corporais acometidos, e oito com a forma localizada. Inexistia qualquer imunodepressão primária ou secundária nos pacientes. Realizou-se em cada doente biópsia de área da pele lesada e sã, esta última distando pelo menos 4 cm da lesão. Outros 20 fragmentos de pele foram obtidos a partir de cirurgias estéticas. Utilizou-se a imuno-histoquímica com anticorpos anti-TLR2 e TLR4. As imagens foram analisadas pelo programa Image Pro Plus. A epiderme foi dividida em superficial e profunda, para análise da imunomarcagem, considerando-se o ponto de divisão como 50% da sua espessura.

Resultados: A análise da expressão do TLR4 em pacientes com tinha na epiderme superficial apresentou menores índices de densidade óptica (IDO), média $108,8 \pm 7,73$ e $110,86 \pm 15,57$ em pacientes com tinha localizada e extensa, respectivamente, em relação aos controles ($145,26 \pm 21,88$) com significância estatística. Também houve redução da expressão do TLR4 na epiderme profunda com IDO de $111,19 \pm 13,45$ em dermatofitoses extensas e $144,65 \pm 17,20$ nos controles ($p=0,001$). A análise da expressão do TLR2 na epiderme profunda em indivíduos com dermatofitose localizada evidenciou menor expressão na área lesada do que na sã do mesmo indivíduo, média $109,28 \pm 30,9$ e $118,75 \pm 36,84$, respectivamente ($p=0,018$). Embora não tenha havido redução da expressão do TLR2 na epiderme superficial comparativamente aos controles, na epiderme profunda encontrou-se, na área lesada das dermatofitoses extensas, menor expressão em relação aos controles, sendo $6,29 \pm 9,73$ e $27,8 \pm 18,6$, respectivamente.

Conclusões: Encontrou-se menor expressão de TLR4 na epiderme superficial e profunda em indivíduos com dermatofitose comparativamente aos controles sadios. Em dermatofitoses extensas também a expressão de TLR2 está diminuída na epiderme profunda. Não existe diminuição da expressão do TLR2 na epiderme superficial provavelmente para manter a função de barreira da epiderme, onde este receptor é importante para coesão dos queratinócitos. Observou-se ainda menor expressão de TLR2 na pele lesada comparada à sã de indivíduos com dermatofitose localizada o

que justificaria o fato destas lesões permanecerem limitadas a uma única área.

SUMMARY

Oliveira CB de. Analysis of the expression of toll-like receptors (TLR) 2 and 4 in keratinocytes of patients with localised or extensive dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum*. (dissertation). São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo." 2012.

Introduction & Objectives: There are few studies to concern the role of innate immune response in dermatophytosis, so we conducted an investigation to define the involvement of TLRs in the course of *tinea* due *T. rubrum* infection.

Patients & Methods: We allocated 8 patients with localised dermatophytosis and 7 with widespread one, defined as at least on three body segments. The skin was biopsied in two points: from lesion (active lesion) and healthy skin distant at least 4 cm. Twenty controls were obtained from cosmetic surgery. We use immunohistochemical staining with antibodies for antigens TLR 2 and 4. Images were analyzed.

Results: (i) analysis of the expression of TLR4 of patients with *tinea*, found on the upper epidermis, average optical density index of $108,8 \pm 7,73$ and $110,86 \pm 15,57$ in localised and widespread *tinea*, respectively, and $145,26 \pm 21,88$ in control skin; similar reduction maintain at lower one with average optical density index $111,19 \pm 13,45$ in widespread *tinea* and $144,65 \pm 17,20$ in controls $p=0,001$; (ii) analysis of TLR2 expression in the lower epidermis of patients with *tinea* met reduced optical density index in skin with localised *tinea* than in healthy skin, average $109,28 \pm 30,9$ and $118,75 \pm 36,84$, respectively, $p 0.018$. There were no reduction in TLR2 expression in upper epidermis compared to controls, although it was significant reduced in lower epidermis in widespread *tinea*, average $27,8 \pm 18,6$ and $6,29 \pm 9,73$.

Conclusions: We found reduced expression of TLR4 in the lower and upper epidermis skin with *tinea* compared to controls in widespread and localised dermatophytosis. There was no reduction of TLR2 at upper epidermis probably in order to maintain the epidermal barrier function. We found yet a reduced expression of TLR2 in the infected skin compared to healthy one of the same patient with localised dermatophytosis which could explain that in these cases the *tinea* was not spread in extension.

Innate immunity • *Trichophyton rubrum* • Keratinocytes • mycosis •
skin • Toll-like receptor • dermatophytose

1 INTRODUÇÃO

Embora já exista na literatura um número razoável de estudos a respeito dos Receptores de Padrão de Reconhecimento em diversas doenças fúngicas, até o momento não existem estudos, *in vivo*, sobre a expressão dos TLRs (receptores toll-like) em dermatofitoses.

Em analogia às outras doenças fúngicas estudadas, acredita-se que sua apresentação clínica, com maior ou menor inflamação, e seu prognóstico, na direção da cura ou cronicidade, dependa do predomínio celular ou humoral na resposta imune (Wang et al., 2001; Netea et al., 2003; Baroni et al., 2006).

Mesmo se admitindo o epitélio como integrante da resposta imunológica do indivíduo, não se conhecem ainda os padrões histopatológicos e estruturais desta resposta e de sua interação com a barreira mecânica (Yuki et al., 2011).

Os receptores toll-like inicialmente foram apontados como participantes da resposta imune inata em *Drosophila* sp., conferindo aos mesmos capacidade de se defender contra fungos. Posteriormente, notou-se certa especificidade na resposta e uma capacidade de interligar a resposta imune imediata e à adquirida (McInturff et al., 2005; Kang et al., 2006).

Embora esta dissertação revise sucintamente a resposta imune inata e adquirida frente a infecções fúngicas, especialmente dermatofitoses, enfatizando a participação dos receptores toll-like em cada uma delas, o estudo restringe-se em avaliar a expressão dos TLRs 2 e 4 nos queratinócitos de indivíduos com dermatofitose. Não foi nosso objetivo, no momento, identificar o PAMP (Padrão associado à Patógeno) pertencente à

parede fúngica e capaz de ser reconhecido pelos TLRs; identificar outros PRRs (Receptores de Padrão de Reconhecimento) envolvidos; ou definir a função das células do sistema imune propriamente dito, residentes ou transitando na epiderme.

Os TLRs 2 e 4 foram descritos na resposta imune às doenças fúngicas, participando da eliminação do patógeno e na imunomodulação da resposta de defesa do hospedeiro (Romani, 2004). Estudo recente em cultura de células mostrou que apesar de homogeneizados de parede fúngica serem capazes de aumentar a expressão de alguns TLRs, conídeos com parede íntegra falharam em fazê-lo (García-Madrid et al., 2011). Com intuito de verificar a expressão epidérmica destes receptores durante a infecção em indivíduos com dermatofitoses, desenhou-se este estudo.

Este estudo motivou-se:

(i) Pela ausência de estudos em dermatofitoses que elucidem a resposta imunológica e definam o papel dos TLRs na sua evolução clínica e prognóstico, somados à relevância das dermatofitoses em nosso meio;

(ii) Pelo indiscutível papel de defesa da epiderme, tanto mecânica como imune, e ainda;

(iii) Pela consolidação dos TLRs como importantes participantes da resposta imune, em especial os TLR 2 e 4, descritos como participantes no reconhecimento de fungos e expressos na epiderme humana.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a expressão dos TLRs 2 e 4 nos queratinócitos dos doentes portadores de dermatofitoses extensas ou localizadas, utilizando para isto a histopatologia pela técnica da imuno-histoquímica.

Os objetivos específicos do estudo foram:

1. Avaliar comparativamente a expressão dos TLRs 2 e 4 em indivíduos com dermatofitoses localizadas e extensas.
2. Avaliar a expressão dos TLRs 2 e 4 em indivíduos com dermatofitoses localizadas e extensas comparativamente ao grupo controle.
3. Avaliar comparativamente a expressão dos TLRs 2 e 4 na área sã e na área propriamente lesada da epiderme de indivíduos com dermatofitose.
4. Comparar a expressão dos TLR2 e 4 na epiderme superficial e profunda dentro de cada um dos grupos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1- Dermatofitoses: visão geral

As infecções fúngicas, em especial as micoses superficiais, são entidades tão comuns quanto às infecções bacterianas em alguns ambientes (Weitzman, Summerbell, 1995). As dermatofitoses são citadas entre as dermatoses mais freqüentes em todo mundo, em especial em regiões quentes e úmidas como o Brasil, podendo acometer até vinte e cinco por cento da população mundial (Peres et al., 2010).

Os dermatófitos são os agentes etiológicos mais comuns, capazes de invadir tecidos queratinizados como a pele, os pêlos e as unhas, em seres humanos ou outros animais, produzindo assim infecções denominadas dermatofitoses ou tinhas (do latim *tinea*) (Weitzman, Summerbell, 1995).

Os gêneros de dermatófitos mais prevalentes são *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (Havlickova et al., 2008). Classificam-se quanto ao habitat primário sendo divididos em antropofílicos, zoofílicos e geofílicos (Rippon, 1985). Os fungos antropofílicos são responsáveis pela maior parte das infecções no continente americano e em parte da Europa (Seebacher, et al. 2008). Em estudos brasileiros o *Trichophyton rubrum* é o mais encontrado (Siqueira et al., 2006; Godoy-Martinez et al., 2009), provocando infecções pouco inflamatórias com tendência a cronicidade, fato relevante na transmissão (MacGregor et al., 1992).

A transmissão se dá por meio de artrósporos, presentes em escamas de pele ou pêlos, que são transferidos para outros animais ou seres

humanos. O contato direto não é necessário (Weitzman I, Summerbell, 1995). Após a adesão ao queratinócito o artrósporo invade a epiderme (Vermout et al., 2008).

O desenvolvimento da doença, o quadro clínico e a evolução no sentido da cura ou cronicidade da infecção dependem do comportamento do hospedeiro frente à infecção, da virulência da cepa ou da espécie infectante, da localização anatômica da infecção, bem como de fatores ambientais locais (Weitzman, Summerbell, 1995; Peres et al., 2010).

3.2- Fatores predisponentes às infecções cutâneas por dermatófitos

3.2.1- Fatores relacionados ao hospedeiro

A suscetibilidade às dermatofitoses varia com a presença de doenças sistêmicas ou cutâneas que interfiram em sua propagação, por mecanismos imunológicos ou por alterações da barreira cutânea (Findling et al., 1981; Hay, 1982; Wagner, Sohnle, 1995).

Entre os fatores protetores locais encontram-se a adequada queratinização e proliferação da epiderme (Berk et al., 1976), a presença de lípides cutâneos que contenham ácidos graxos saturados com atividade fungistática (Wagner, Sohnle, 1995), e a presença da transferrina insaturada na derme, que evita o crescimento do fungo nas camadas mais profundas da pele, mesmo em indivíduos imunossuprimidos (King et al., 1975).

Os fatores de suscetibilidade individual, apesar de estudados a mais de três décadas, ainda não foram definidos, podendo estar relacionados a variações na composição dos ácidos graxos no sebo, à tensão de dióxido de carbono na superfície da pele, presença de umidade ou existência no suor e soro de substâncias inibidoras para o crescimento de dermatófitos como a transferrina (King et al., 1975).

Outro fator relevante é o tipo de resposta imune que o indivíduo organiza, podendo ser predominantemente celular ou humoral, o que definirá a resolução da infecção ou sua cronicidade. Experimentalmente, observou-se que o principal braço eferente da resistência imunológica à infecção fúngica é o linfócito T, que não sofre influência pela administração de anticorpos específicos. A cinética desta resposta nas infecções em seres humanos, aparentemente, é semelhante, com o desenvolvimento tanto de reação cutânea de hipersensibilidade tardia à tricofitina, quanto de resposta blastogênica de linfócitos T que levaria a cura (Jones et al., 1974). Em oposição a isso, uma resposta imune celular incompleta, levaria a cronicidade como descrito na *Tinea imbricata* (Hay et al., 1983).

Sendo assim a resposta imune protetora seria, então, mediada por citocinas do polo de resposta Th1 (Linfócitos T auxiliares tipo 1), como IL12 (interleucina 12) e IFN γ (interferon gama) e caracterizada pela ação dos macrófagos como células efetoras (Woodfolk, Platts-Mills, 1998; Mignon et al., 2008).

A participação de cada elemento da resposta imune vem sendo aos poucos elucidada: as células de Langerhans (CL) atuam como células apresentadoras de antígenos; os fagócitos mononucleares, principalmente polimorfonucleares neutrófilos lisam dermatófitos intra e extracelularmente, pela via oxidativa (Calderon et al., 1989), enquanto os antígenos de dermatófitos são quimiotáticos para leucócitos humanos, ativando assim a via alternativa do complemento (Wagner, Sohnle, 1995).

Atualmente reconhece-se a participação da epiderme também como barreira imunológica, sendo amplificada pelo restante do sistema imune, observando-se elevada taxa de substituição epitelial, coincidente com o pico máximo da resposta imune. Assim é possível a eliminação dos dermatófitos via descamação do estrato córneo (Cairns et al., 1996).

Embora a clínica e a evolução das lesões sejam influenciadas pela imunidade do indivíduo, a ocorrência da dermatofitose independe do *status* imune do indivíduo (Hay, 1995), mesmo nos raros casos com invasão do tecido celular subcutâneo (Allen et al., 1977). Fatores fúngicos que possam influenciar estes padrões de resposta imunológica foram então investigados.

3.2.2- Fatores relacionados ao dermatófito

Fatores como a virulência da cepa e a espécie do fungo podem estimular de maneira diferente a imunidade do indivíduo, determinando a diversidade clínica conhecida (Weitzman, Summerbell, 1995). Espécies de

dermatófitos como o *Trichophyton rubrum* caracterizam-se por causar infecções crônicas ou recidivantes, enquanto outros fungos induzem resistência à reinfecção (MacGregor et al., 1992; Vermout et al., 2008). Desde a década de setenta tentativas foram feitas no sentido de identificar uma molécula fúngica que pudesse inibir a resposta imune efetiva ao fungo, explicando assim a cronicidade ou as recidivas freqüentes de alguns casos (Shervin et al., 1979; Lilic et al., 1996; Slunt et al., 1996; Woodfolk, Platts-Mills, 1998; Woodfolk, et al., 2000).

Os fungos como organismos eucariotas estão envoltos em parede celular rígida composta por complexa estrutura onde participam, externamente, polissacarídeos capazes de serem reconhecidos por receptores do hospedeiro, além de β glucanas, quitina e mananas. A composição da parede varia entre os fungos, por exemplo, a manana localiza-se internamente no *Cryptococcus sp.*, enquanto se encontra modificada no *Aspergillus sp.*, impedindo assim seu reconhecimento pelo hospedeiro (Roeder et al., 2004).

Também os glicopeptídeos como a manana, produzidos por dermatófitos, são capazes de inibir reversivelmente resposta inflamatória local ao fungo e a blastogênese dos linfócitos T, *in vitro*, modulando assim a imunidade do hospedeiro (Blake et al., 1991; MacGregor et al., 1992). Este mecanismo é mais intenso nas infecções por *T. rubrum*, onde ocorreria ainda a inibição da proliferação dos queratinócitos, contribuindo para cronicidade destas lesões (Blake et al., 1991).

Implicadas na virulência estariam também estruturas fúngicas de aderência ao hospedeiro e à matriz extracelular (Romani, 2004). Estruturas fibrilares de ancoragem, como as adesinas glicoprotéicas facilitam a adesão ao hospedeiro, aumentando a virulência da espécie (Kaufman G et al., 2005; Vermout et al., 2008).

Acrescido a estes fatores, alguns fungos teriam a capacidade de alterar o pH do meio, facilitando a atividade enzimática e a infecção por algumas espécies (Peres et al., 2010). Relacionadas diretamente à virulência estão ainda a secreção de enzimas na superfície da pele (como: fosfolipases, elastases e proteases), que são necessárias para nutrição e capacidade de penetração do fungo (Romani, 2004). Quanto maior a capacidade do fungo de produzir enzimas queratinolíticas e proteolíticas, maior a virulência (Brouta et al., 2003; Baldo et al., 2008; Leng et al., 2008; Vermout et al., 2008). Estudos gênicos apontaram, no *T. rubrum*, o gene *pacC1* como regulador da secreção de proteases e do pH do meio sendo o mesmo, importante na fase inicial da dermatofitose, onde participaria do processo de adesão e nutrição fúngica (Ferreira-Nozawa et al., 2006).

Outro aspecto que também predispõe à infecção fúngica é a presença de algumas enzimas hidrolíticas, em especial as proteases, que aparentemente estimulam uma maior resposta inflamatória do hospedeiro, iniciando a organização da resposta imune do indivíduo para resolução da infecção (Vermout et al., 2008).

As diferentes formas morfológicas do fungo possuem a capacidade de ativar diferentes braços da resposta imune, definindo assim a gravidade e as características clínicas da infecção, especialmente em fungos dimórficos. Pode-se então acrescentar o dimorfismo como um dos fatores relacionados à virulência, podendo a migração do fungo de uma para outra forma funcionar como mecanismo de evasão da resposta imune (Romani, 2004).

Como a resposta imunológica elaborada pelo indivíduo depende também de fatores fúngicos, os mesmos são capazes de desenvolverem estratégias para evadirem da resposta imunológica do hospedeiro como os comensais que são capazes de induzir a tolerância imune, evitando uma resposta efetiva do hospedeiro (Romani, 2004).

Sendo assim o quadro clínico dependerá da interação fungo / hospedeiro, onde o fungo modula a resposta imune que o indivíduo é capaz de elaborar, determinando a virulência e apresentação clínica da infecção. A resposta imune iniciada após o reconhecimento de diferentes estruturas fúngicas influi na virulência, por exemplo, em infecções crônicas ou recorrentes pelo *T. rubrum*, em imunocompetentes, ocorre predomínio de hipersensibilidade imediata mediada por IgE (imunoglobulina E), com elevados níveis séricos de IgE e IgG4 (imunoglobulina G4), insuficientes para adequada resolução do quadro (Mignon et al., 2008).

Os diferentes perfis de citocinas liberados durante a infecção fúngica definiriam o tipo de células de defesa presentes no infiltrado inflamatório, sendo, por exemplo, as infecções por *T. rubrum* ricas em mononucleares, e

as causadas por *T. mentagrophytes* ricas em neutrófilos, explicando a cronicidade da primeira (Shiraki et al., 2006; Tani et al., 2007).

3.3- A imunidade na doença fúngica

Diversos aspectos da imunidade inata e adquirida comportam-se de maneira particular e complementar nas infecções fúngicas, apresentando características distintas frente aos diferentes fungos e seus aspectos morfológicos, e contribuindo assim para apresentação clínica da doença. A ativação da imunidade inata se relacionaria com a resolução do quadro, enquanto, a polaridade da resposta adquirida definiria a resolução ou a cronicidade da lesão (Cassone, 2007).

Alguns aspectos da imunidade inata e adquirida na resposta imunológica às infecções fúngicas serão resumidamente abordados, com ênfase nos queratinócitos, objeto do estudo.

3.3.1- A resposta imune inata

A resposta do hospedeiro frente ao invasor se inicia rapidamente, e caracteriza-se, principalmente pela fagocitose e destruição do patógeno, com concomitante liberação de citocinas pró-inflamatórias e apresentação do antígeno às células dendríticas (Ermercan et al., 2011).

O reconhecimento do que é próprio ou não, é realizado com a participação de uma seqüência repetida de bases de leucina, formando receptores de padrão de reconhecimento, que, então, reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), conservados ao longo da evolução, e conferem assim alguma especificidade à resposta imune inata (Romani, 2004).

Nos mamíferos o sistema de defesa é composto por células exclusivas ou não do sistema imunológico, receptores celulares e moleculares, fatores humorais como citocinas, quimiocinas, sistema complemento, peptídeos e lipídeos antimicrobianos. Dentre as células do sistema imune citamos: polimorfonucleares (neutrófilos, monócitos, mastócitos e eosinófilos), leucócitos mononucleares, células dendríticas (CD), células de Langerhans (CL) e células NK (Almeida, 2008). Participam ainda células não exclusivas do sistema imune, como as endoteliais que sinalizam o sítio inflamatório através de moléculas de expressão ou endereçamento celular, e as epiteliais capazes de secretar citocinas (Almeida, 2008).

Dentre os já citados PRRs encontram-se receptores da família toll-like, que iniciam a resposta imune inata e organizam o padrão de resposta adquirida, através da produção de diferentes perfis de citocinas. Estes receptores, além de estarem presentes em algumas das células do sistema imune propriamente dito, estão presentes nos queratinócitos, podendo, então, serem ao mesmo tempo ativados em mais de um tipo celular (Romani, 2004).

O mecanismo inicial de destruição dos fungos ou parte deles é celular (fagocitose) ou humoral (através de substâncias microbidas produzidas contra elementos não possíveis de se fagocitar) (Romani, 2004). Inicialmente após a fagocitose são liberados grânulos e oxigênio reativo, associados à secreção de IL8 (Vasconcelos et al., 2011). Em seguida os antígenos são processados pelas células fagocíticas, e apresentados ao sistema imune adaptativo para que se defina a polaridade da resposta, que pode levar a resolução ou cronicidade da infecção (Romani, 2004).

A atividade fungicida se dá principalmente pelos polimorfonucleares: monócitos e neutrófilos, os últimos atraídos para área, também pela IL8 secretada por queratinócitos (Almeida, 2008).

As respostas inatas e adaptativas são capazes de se regularem reciprocamente. Enquanto as células fagocíticas, interferem diretamente na infectividade fúngica e influenciam sua morfologia e fenótipo, as mesmas são potencializadas por opsoninas e citocinas, derivadas de células T, pertencentes ao sistema imune adaptativo (Romani, 2004).

Opsoninas e citocinas também potencializam a produção de oxigênio reativo intermediário (ORI), durante o *burst* oxidativo, após reconhecimento dos patógenos. Em contato com os fungos o ORI produz modificações protéicas, com quebra de ácido nucléico e peroxidação de lipídeos (Romani, 2004).

A atividade fungistática combina mecanismos oxidativos e de degranulação com liberação intra e extracelular de moléculas efetoras, defensinas e peptídeos catiônicos neutrofílicos (Romani, 2004).

A fim de se evadirem da resposta imune efetiva do hospedeiro, os fungos se tornaram capazes de inibir o estresse oxidativo e produzir bloqueadores da fagocitose como catalase, manitol e melanina (Romani, 2004). Os conídios do *T. rubrum* conseguem inibir, inclusive, sua fagocitose através da manana e de exoantígenos, além de diminuírem a expressão de moléculas co-estimuladoras e HLA classe II e induzir a secreção de IL10, enquanto, suas hifas crescem e lisam o macrófago (Almeida, 2008).

Demonstrando ainda a regulação mútua, nos neutrófilos a atividade fungicida é regulada pelas células T. Citocinas como IL1, TNF α , IL6, IFN γ e GM-CSF, no local da infecção, aumentam os receptores de superfície para fagocitose como o Fc IgG e CR3 (Receptor 3 de complemento) (Vasconcelos et al., 2011).

Em síntese, apesar de inespecífica, a diversidade de receptores e moléculas opsonizantes que participam do reconhecimento das várias moléculas da parede fúngica podem definir diferentes cenários de imunomodulação ou imunoestimulação, contribuindo para o surgimento das diversas nuances clínicas que um mesmo fungo é capaz de apresentar, e não dependendo da competência imune do hospedeiro. Sendo assim os TLRs são mais uma classe de receptores capazes de reconhecer o fungo e

em interação com os fatores aqui descritos contribuir na construção da resposta imune do indivíduo ao fungo.

3.3.2 - A resposta imune adquirida

Na imunidade adquirida as células T exercem mecanismos antifúngicos diretos como: liberação de peptídeos pelas células T CD8, lise dos fungos em fagócitos e função efetora, além de liberarem citocinas que mobilizam e ativam efetores antifúngicos nos leucócitos circulantes. Uma resposta bem sucedida aos fungos depende da resposta imune celular adequada. Assim em micoses crônicas e disseminadas existe resposta celular incompleta e altos níveis de anticorpos (Romani, 2004).

Uma resposta com padrão Th1, mediada por IL12, permitirá a migração dos fagócitos ao local da infecção e a produção de IFN, um facilitador da opsonização de anticorpos. Quando não ocorre a ativação dos fagócitos efetores as infecções tendem a disseminação, cronicidade e comensalismo. Como exemplo destaca-se a paracoccidiodomicose onde uma resposta com padrão Th1 leva a infecção assintomática, enquanto o padrão Th2 leva a quadros graves. Nas infecções disseminadas produz-se pouco IFN, e ocorre a hipersensibilidade tardia anérgica, com a produção de citocinas de padrão Th2 como IL4 e 5, além de IgE, IgG4, IgA e eosinofilia (Romani, 2004).

3.3.3- Células epiteliais e sua participação na imunidade

A pele, em extensão, é o maior órgão do ser humano, capaz de participar ativamente da defesa contra patógenos, através de seu mecanismo de barreira ou da resposta imune. Como mecanismos de barreira da pele estão a queratinização e a capacidade de descamação inerente à epiderme. Por ser a primeira barreira ao patógeno, aí se inicia a resposta imune inata (Vasconcelos et al., 2010).

Participam da resposta imunológica na pele as células residentes cutâneas, como células de Langerhans e queratinócitos, e células presentes transitoriamente ou não como linfócitos, células endoteliais, macrófagos, células dendríticas, linfonodos de drenagem (onde se diferenciam os linfócitos T), e elementos humorais como citocinas, prostaglandinas, leucotrienos, peptídeos antimicrobianos e outros (Vasconcelos et al., 2010).

Cada parte desta cascata tem sido abordada com a finalidade de se reconhecer a participação de genes específicos em cada etapa, desde o reconhecimento antigênico até a proliferação de células de defesa, incluindo a transcrição de mediadores e peptídeos efetores, cuja produção pode se dar inclusive nas células epiteliais (Baroni et al., 2006; Vasconcelos et al., 2010). Nas células epiteliais expressam-se receptores como receptor de manose e TLRs, em especial o TLR 2 e 4, importantes no reconhecimento de patógenos e deflagração da resposta imune (Roeder et al, 2006).

Os receptores de padrão de reconhecimento, expressos na epiderme, parecem estar fortemente relacionados com sua função imunológica. Assim, também estão aparentemente relacionados a modulação imune que resulta em cronicidade e a tolerogênese (Roeder et al., 2006).

Entre eles destacam-se a família dos receptores toll-like. Nos queratinócitos expressam-se TLR 1-6 e 9, cada um com seu padrão de reconhecimento de patógeno característico (Ermerican et al., 2011). Os TLR 1 e 2 são expressos em toda espessura da epiderme, mas concentram-se na camada basal, enquanto o TLR5 é exclusivo da camada basal. Os TLR 3 e 4 expressam-se fracamente (quadro 1). De acordo com a doença em questão observou-se aumento ou diminuição da expressão epidérmica destes receptores, ou mesmo, apenas, alteração do padrão de expressão (Baker et al., 2003). Células do sistema imunológico residentes ou presentes transitoriamente na pele também expressam estes receptores, como as células de Langerhans, por exemplo, que expressam TLR 1 a 3, 5, 6 e 10 (Ermerican et al., 2011).

Estímulo contínuo do TLR2 pela flora residente na epiderme, aparentemente, induz a tolerância, embora o mecanismo exato não tenha sido definido, acredita-se que participem desta tolerância o IFN γ e CD14 (Kawai et al., 2002).

Como os TLRs encontram-se em contínuo contato com patógenos no meio, sua localização preferencial é intracelular, a fim de regular a resposta imune (Begon et al., 2007). Como nas células epiteliais, expostas a

patógenos, existem receptores continuamente expressos como TLR2, TLR4 e MyD88. A falta de alguns co-receptores necessários à sinalização, como CD14 seria outro possível mecanismo de regulação imunológica (Uehara et al., 2001). Da regulação deste sistema participariam os patógenos e citocinas pró-inflamatórias como IFN e TNF α , capazes de induzir a liberação de TNF α e IL-8, o que aumentaria, *in vitro*, a expressão intracitoplasmática e a presença destes receptores na membrana celular (Begon et al., 2007).

Os TLRs estariam envolvidos em diferentes aspectos da imunidade inata como a produção das defensinas antimicrobianas (Miller et al., 2005; Baroni, 2006), a produção de IL8 e IL1 (Song et al., 2002), sendo regulados por TGF β (Kawai et al., 2002), TNF α e IFN γ (Begon et al., 2007).

A diversidade da apresentação clínica de algumas infecções fúngicas relacionam-se a ativação de TLRs, como os TLR 2 e 4, implicados na defesa contra a candidíase; do TLR4 na aspergilose, induzindo citocinas pró-inflamatórias; e ainda do TLR2 no reconhecimento do zymosan da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Outros fungos como a *Malassezia furfur* também induzem TLR 2 e MyD88 mRNA (Baroni et al, 2006).

A atividade imunológica dos queratinócitos nas infecções fúngicas do qual aparentemente participam os PRRs foi descrita em diferentes entidades ora com função protetora, ora com função moduladora da resposta imune. Nas infecções por *Candida sp*, os queratinócitos apresentam atividade fungicida, mediada por TLRs 2 e 4, e de NF- κ B, com participação de IL1,

PGE2, além do fator ativador de plaquetas (PAF). Os queratinócitos também apresentam em sua superfície um receptor ligador de manose, e são capazes de produzir antimicrobianos como óxido nítrico, antileucoprotease, β defensinas e LL37 (Pivarcsi et al., 2003).

A função dos queratinócitos na resposta imune ao fungo inclui sua capacidade de atrair neutrófilos e células efectoras, a fim de eliminar fungos como a *Candida*, e outros patógenos como *Staphylococcus* e *Mycobacterium* (Pivarcsi et al., 2003).

Quadro 1- Padrão de expressão dos Receptores Toll-like (TLRs) na epiderme normal.

Epiderme Normal	
TLR1	Toda epiderme, principalmente na camada basal (Baker et al., 2003);
TLR2	<p>Toda epiderme, principalmente na camada basal, geralmente em estudos com anticorpos policlonais (Baker et al., 2003; Begon et al., 2007);</p> <p>Diferente disto, estudos, em pele de face normal, usando anticorpos monoclonais e técnica de imunofluorescência, evidenciaram expressão na epiderme supra-basal (mais superficial) e folículos (Pivarcsi et al., 2003; Yamasaki et al., 2010).</p> <p>A expressão é principalmente intracitoplasmática, forte e difusa, por citometria de fluxo (CF) (Begon et al., 2007);</p>
TLR3	Fracamente expressos (Baker et al., 2003); Expressa-se, principalmente na basal (Begon et al., 2007);
TLR4	Fracamente expressos (Baker et al., 2003); Expresso na epiderme, principalmente nas camadas inferiores, principalmente intracitoplasmático, fino e difuso, observado por CF (Begon et al., 2007);
TLR5	Exclusivo (Baker et al., 2003) ou principalmente na camada basal (Begon et al., 2007);
TLR6	Expresso na epiderme (Begon et al., 2007);
TLR9	Expressa-se principalmente nas camadas superficiais (Miller et al., 2005).

3.3.4 – Outros aspectos da imunidade nas dermatofitoses

As características da resposta imunológica nas dermatofitoses ainda é objeto de estudo. Sabe-se que a proteção do hospedeiro se inicia na indução de resposta imune inata adequada (Cassone, 2007). Os queratinócitos são os primeiros elementos celulares com os quais os dermatófitos entram em contato durante a infecção (Mignon et al., 2008) e aparentemente modularão a resposta imune do hospedeiro, a semelhança ao que ocorre em outras infecções fúngicas (Sugita et al., 2007).

Durante a invasão da camada córnea, antígenos secretados por dermatófitos, como as proteases queratinolíticas, induzem a produção de anticorpos pelo hospedeiro (Mignon et al., 1999; Léchenne et al., 2007; Vermout et al., 2008), que podem ser protetores ou não (inibidores / bloqueadores) (Martinez, Casadevall, 2005).

A partir do contato com os queratinócitos inicia-se a produção de citocinas, incluindo a IL8 (potente quimiotático de neutrófilos) e a citocina próinflamatória TNF α (fator de necrose tumoral alfa) (Nakamura et al., 2002), com intuito de destruir os dermatófitos. As várias espécies de dermatófitos diferem na capacidade de induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias (Mignon et al., 2008), sendo as espécies geofílicas as mais inflamatórias, seguidas pelas zoofílicas e por último as antropofílicas (Tani et al., 2007).

Além das citocinas os queratinócitos humanos secretam ainda peptídeos antimicrobianos, como as catelicidinas e as defensinas, com potencial atividade antifúngica (Mignon et al., 2008). Vários autores

demonstraram que a β defensina humana e a catelicidina LL37 são fungistáticas e fungicidas, *in vitro*, contra o *T. rubrum* e que sua expressão está aumentada, *in vivo*, na tinha do corpo causada por este fungo (LópezGarcia et al., 2006; Jensen et al., 2007).

As células dendríticas (CD) epidérmicas, especialmente as CL, são essenciais na deflagração da resposta adaptativa e na modulação do sistema imune a fim de destruir os dermatófitos (Mignon et al., 2008). Possuem receptores para padrões moleculares associados a patógenos, os quais incluem os receptores Toll-like (TLRs), com função de ativar as CD e receptores de Lectina e Lectina-símile como o DC SIGN (CD209), proteína transmembrana, especializada no reconhecimento de estruturas de patógenos associadas a carboidratos (Sato et al., 2006; Saijo et al., 2010).

Assim como em outras infecções fúngicas, nos dermatófitos os PRRs possuem importante papel na resolução ou cronicidade da doença. Moléculas como a Dectin 2, um receptor lectina símile tipo C, expresso na maioria das CD diferenciadas, tais como a CL, é capaz de reconhecer e ligar-se às hifas dos *M. canis* e *T. rubrum*, determinando a secreção de citocinas próinflamatórias, como o TNF α (Sato et al., 2006). Em oposição a este efeito imunoestimulador, a fagocitose dos conídeos do *T. rubrum* pelos macrófagos induz à secreção de IL10, uma citocina com propriedades antiinflamatórias, enquanto fatores relacionados a imunidade protetora como moléculas co-estimuladoras CD54 e CD80, óxido nítrico e a IL12 são suprimidos (Campos et al., 2006).

Outros elementos celulares importantes na imunidade inata aos dermatófitos são os neutrófilos que se acumulam após a aderência dos conídeos aos corneócitos, ainda na fase germinativa. Admite-se, então, que os neutrófilos em conjunto com os macrófagos são as células efetoras finais na eliminação da dermatofitose, via resposta Th1 (Mignon et al., 2008) (figura 1).

Entretanto, destaca-se o importante papel de elementos fúngicos como as mananas na organização da resposta imunológica. Vários estudos apontam as propriedades imunossupressoras destas moléculas como responsáveis pela cronicidade da dermatofitose pelo *T. rubrum* na espécie humana (Mignon et al., 2008), um deles ressaltando que a fagocitose de conídeos do *T. rubrum* pelos macrófagos é inibida pelas mananas da parede fúngica e por exoantígenos (Tani et al., 2007).

As mananas derivadas dos dermatófitos podem inibir ainda a adesão celular DC-SIGN-dependente do ICAM3 das células T nativas, o que levanta a hipótese de que as mananas dos dermatófitos poderiam evitar as interações iniciais entre as CDs e as células T nativas, bloqueando a apresentação antigênica e a ativação das células T, e assim favorecendo o desenvolvimento de infecções disseminadas ou invasivas causadas pelos dermatófitos (Willment, Brown, 2008). O DC-SIGN reconhece carboidratos com manose e oligossacarídeos Ca^{2+} dependente, na superfície de vários patógenos, como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Chrysosporium tropicum* (Serrano-Gómez et al., 2005). A expressão deste receptor é IL4 dependente e ocorre em CD e macrófagos *in vivo*. A função deste receptor

aparentemente é internalizar antígenos através de endocitose, mediar à adesão intercelular, reconhecendo moléculas endógenas, como ICAM 2 na superfície das células endoteliais e ICAM 3 em células T nativas (Serrano-Gómez et al., 2005).

Assim sendo a resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro depende de um balanço entre os fatores fúngicos e do hospedeiro, e da maneira como são detectados os antígenos fúngicos (Mignon et al., 2008). Por exemplo o zymosan, derivado da parede celular das leveduras é indutor de citocinas pró-inflamatórias e também de CDs reguladoras da tolerância imunológica, via TLR2, além de induzir Dectin1 e mediar a liberação de IL10 (Dillon et al., 2006).

Outros fatores de virulência dos dermatófitos (glicoproteínas da parede celular, endoproteases e exoproteases) também contribuem para a modulação da resposta imune do hospedeiro e podem ser expressos ao longo do processo infeccioso (Hay et al., 1988; Acorci Valério et al., 2010).

Figura 1- Micoses superficiais e os elementos da resposta imune

Imunidade inata e possíveis ações nas infecções fúngicas superficiais. O aumento da secreção da IL10 (ação imunossupressora sobre a atividade Th1) determinado pelos conídeos do *T. rubrum* e a diminuída secreção da IL12 (necessária ao estímulo Th1) ambos inerentes à ação do patógeno sobre o hospedeiro criam um ambiente propício a expressão do DC-SIGN pelos macrófagos o que contribui para a cronicidade da infecção (Criado et al., 2011).

3.4- Receptores toll-like

3.4.1- Breve histórico

Os receptores toll foram, inicialmente, descritos como participantes da migração dorso-ventral em *Drosophila melanogaster* durante o desenvolvimento embrionário (Lemaitre et al., 1996). Em 1996, Hoffmann e colaboradores correlacionaram os receptores toll com a susceptibilidade a infecções fúngicas (Takeda, Akira, 2004), sua ativação estaria envolvida na produção de peptídeos antimicrobianos (Ermertcan et al., 2011).

Posteriormente estruturas homólogas foram observadas em vertebrados (Medzhitov et al., 1997). Inicialmente os TLRs foram relacionadas à resposta imune inata, e depois ao se observar sua capacidade de induzir genes inflamatórios à resposta específica (Arancibia et al., 2007). O primeiro TLR descrito em vertebrados foi o TLR4, caracterizado como indutor da expressão gênica necessária a resposta inflamatória (Takeda, Akira, 2004).

Dos treze TLR descritos, onze foram encontrados em humanos (Li et al., 2009), e relacionados a diferentes PAMPs (quadro 2). Os TLRs 1,2,4,5 e 6 reconhecem patógenos extracelulares e se localizam na parte externa da membrana celular. Enquanto o TLR 3, 7, 8 e 9 localizam-se na membrana dos endossomos. A participação destes receptores na resposta inflamatória após reconhecimento de ligantes endógenos ou exógenos tem sido descrita por diversos autores (Keogh, Parker, 2011).

Quadro 2- Características dos Receptores Toll-like

TLR	Ligante endógeno	Ligante exógeno	Citocinas e moléculas efetoras induzidas	Funções
1	NI	LP Tri-acyl-lipopeptídeo (TLR2/TLR1) LP <i>Mycobacteria</i> 19 Kd (TLR2/TLR1) Proteína de superfície da <i>Borrelia sp.</i>	TNF- α IL-12	Defesa contra <i>Mycobacteria</i> e outros organismos expressando LP tri acetilada
2	HSPgp96 HSP60 HSP70	PG de bactéria gram positiva Lipopeptídeo do <i>Mycoplasma</i> LP Tri-acetilada (TLR2/TLR1) LP Di-acetilada (TLR2/TLR6) Glucuronoxylomanana de fungos Zimosan de levedura (também TLR 2/TLR6) Ácido lipoteicóico GPI âncora <i>Trypanosoma cruzi</i> (também TLR 2/TLR6) LPS de leptospiros e espiroquetas Proteína A de membrana (<i>Klebsiella pneumoniae</i>) Dimanósido fosfatidilinositol (<i>Mycobacteria</i>) LP <i>Mycobacteria</i> 19 Kd (TLR2/TLR1) Modulina solúvel em fenol (<i>Staphylococcus epidermidis</i>) (TLR 2/TLR6) Proteína hemaglutinina do vírus do sarampo Partículas de CMV humano Porina B (<i>Neisseria meningitidis</i>)	TNF- α IL-1 β IL-6 IL-8 IL-10 IL-12 ON IL-4, IL-5, IL-6 IL-13 (mastócitos)	Defesa contra várias bactérias gram positivas, <i>Mycobacteria</i> , <i>Mycoplasma</i> , protozoários e fungos Estresse oxidativo e necrose celular Ativação da cadeia respiratória Indução de apoptose Indução de ligante antimicrobiano TLR 4, β -defensina 2 Ativação e degranulação de mastócitos
3	NI	RNA viral de dupla hélice (poly I:C)	IFN- β	Defesa antiviral
4	HSPgp96 HSP60 HSP70 Extra domínio A da fibronectina β -Defensina 2 Fibrinogênio	LPS Ácido lipoteicóico Proteína F do vírus sincicial respiratório Escherichia coli P fimbriae E5564? (antagonista LPS) Taxol (produto de planta antitumor) Glucuronoxylomanana de <i>Cryptococcus neoformans</i>	TNF- α / IFN- β IL-1/ IL-6/ IL-10/ IL-13 Proteína 1 α/β inflamatória de macrófago ON Leucotrienos Prostaglandinas	Defesa contra várias bactérias gram negativas, fungos e vírus Indução de apoptose
5	NI	Flagelina de bactérias gram negativas e positivas (também reconhecido pelos TLR5/TLR4).	TNF- α / IL-1 β IL-6 /IL-10 /IFN- γ	Defesa contra bactéria flagelada

			ON (TLR5/TLR4)	Maturação de DC
6	NI	LP Di-acyl-lipopeptídeo (<i>Mycoplasma</i>) (TLR2/TLR6) Modulina solúvel em fenol (<i>Staphylococcus epidermidis</i>) (TLR 2/TLR6):Zimosan de levedura GPI âncora <i>Trypanossoma cruzi</i>	TNF- α	Defesa contra bactéria, fungos, micoplasma e protozoários
7	RNA de hélice simples (Influenza vírus) RNA de hélice simples (HIV-1)	Imidazoquinolinas (Imiquimod, Resiquimod) Loxoribina Bropirimina	IFN α (plasmócitos e DCs) IFN- γ (células T) IFN- β / TNF- α IL-1/ IL-6/ IL-8 IL-12 (MDDCs) IL-18/ GM-CSF Superóxidos (eosinófilos)	Defesa anti- tumoral e antiviral Maturação de DC Ativação e migração de CL da pele para linfonodos de drenagem Desenvolvimento de resposta Th1 Ativação de células NK Proliferação de células B Ativação eosinofílica
8	RNA de hélice simples (HIV-1)	Imidazoquinolinas (Imiquimod, Resiquimod)	Semelhante TLR7	Semelhante TLR7
9	Complexos cromatina IgG	DNA guanina-citidina não metilada Herpes simplex vírus vivo ou atenuado	IFN- α (células dendríticas plasmócitoides) IFN- γ (células NK) IFN- β / IL-6/ IL-12	Defesa antiviral e anti bacteriana Desenvolvimento de resposta Th1 Maturação de DC Proliferação de células B
10	NI	NI Pode interagir com TLR 2	Desconhecido	Desconhecido
11	NI	Bactérias uropatogênicas e proteínas de parasitas em ratos. Proflina-like do <i>Toxoplasma gondii</i> (Ermertcan AT et al. 2011)	NI	NI

Quadro 2- Características dos Receptores Toll-like (conclusão)

TLR: receptor Toll-like; NI: não identificado; LP: lipoproteína; PG: peptideoglicano; GPI: glicosilfosfatidilinositol; Poly I:C: copolímero de ácido poli-inosínico e poli-citidílico; NO: óxido nítrico; DC: células dendríticas; MDDCs: célula dendrítica derivada de monócitos; GM-CSF: fator estimulador de colônia de macrófago e granulócito; NK: natural killer; LPS: lipopolissacáride.

Adaptado de Kang et al (2006) e Cristofaro, Opal (2006).

3.4.2- O papel dos receptores toll-like em diferentes dermatoses

Os TLRs têm sido estudados em diversas doenças, participando da atividade imunológica das mesmas ao reconhecer exo ou endoantígenos, sendo capazes de definir o quadro clínico e o prognóstico das entidades, transformando-se assim em aliados promissores na compreensão da patogênese de algumas delas (Arancibia et al., 2007). Destacam-se colite, aterosclerose, doenças auto-imunes, câncer e outras (Ermertcan et al., 2011).

Em doenças cutâneas a participação dos TLRs foi descrita em: acne, rosácea, dermatite atópica, psoríase, lúpus eritematoso, micose fungóide e algumas doenças infecciosas como hanseníase, infecções *fúngicas* como Aspergilose, Criptococose, Paracoccidioidomicose e Candidíase (Ermertcan et al., 2011; Miller, Modlin, 2007) (quadro 3).

O conhecimento destes receptores permitiu ainda utilizá-los como estratégia de tratamento, e agonistas ao TLR7/8 como o imiquimode é hoje utilizado no tratamento do câncer cutâneo e verrugas virais (Arancibia et al., 2007).

Quadro 3- Relevância da expressão dos Receptores Toll-like (TLRs), em dermatoses frequentes (Miller, Modlin, 2007).

Dermatoses	Relevância dos TLRs
Dermatite atópica	Polimorfismos gênicos na expressão de TLR 2 e 9 podem predispor a quadros mais severos e infecções.
Psoríase	Aumento da expressão dos TLR 1, 2, 4, 5 e 9 com produção de citocinas inflamatórias e peptídeos antimicrobianos.
Acne	O <i>Propionibacterium acnes</i> pode aumentar a produção de IL12 e IL8, através de TLR2.
Estafilococcia	O heterodímero TLR2/6 participa do reconhecimento do <i>Staphylococcus aureus</i> com produção de defensinas e maior controle do quadro.
Candidíase	O TLR 2 reconhece a fosfolipomanana, enquanto o TLR4 a manana. Em cultura queratinócitos apresentam atividade fungicida via TLRs.
Herpes vírus	Maiores recorrências em indivíduos com deficiência de TLR2, enquanto a deficiência de TLR3 levaria a infecções mais disseminadas.

2.4.6.2- O papel dos receptores toll-like em doenças fúngicas

Devido a sua complexidade estrutural, diversos componentes da parede fúngica agem como PAMPS e são reconhecidos por TLR expressos em fagócitos e células dendríticas. O TLR 2 produz citocinas inflamatórias como TNF e IL1 beta, embora IL10 seja também produzido. A sinalização se dá, principalmente, pelo zimosan através do TLR2, em co-participação com receptor β glucan/dectin-1 (Romani, 2004).

Estudos, *in vitro*, com *Candida albicans*, demonstraram que o TLR2 reconhece ainda o glicopeptídeo fosfolipomanana da superfície de sua parede celular, enquanto, o TLR4 reconhece o polissacarídeo manana (Netea et al., 2003; Netea et al., 2004a). Sugerindo a participação de ambos os receptores expressos nos queratinócitos na defesa do hospedeiro contra a *Candida albicans* (Kaufman et al., 2005). Os PRRs estão também expressos nas células de defesa propriamente ditas, modulando o sistema imune inato e definindo a polaridade da resposta inflamatória adquirida (Nisini et al., 2007).

Como exemplo observamos que a hifa do *Aspergillus sp*, é reconhecida preferencialmente por monócitos através de TLR4/ CD14, diferente do que ocorre com os conídeos, sugerindo que o TLR seja capaz de reconhecer as diferentes formas morfológicas. O reconhecimento do TLR 4/ CD14 é semelhante no *Saccharomyces sp.*, na manana da *Candida sp.* e no glucoronoxylomanana do *Cryptococcus sp.* Este último ativando o TLR com efeitos imunoreguladores e imunodepressores (Romani, 2004).

É possível que TNF e IL 1 β possam ser liberados, em resposta a infecção pela *Candida sp.*, de maneira independente do TLR 4; embora se saiba que camundongos TLR 4/deficientes apresentam menor resistência a infecção. Estudos indicam que o padrão dependente do MyD88 em células dendríticas é necessário para resposta Th1 adequada, mediando resistência a *Candida sp.* e *Aspergillus sp.*, sendo indispensável para deflagração da resposta imune inata a *Candida sp.*, mas não a resposta ao *Aspergillus sp* (Romani, 2004).

A função efetora da resposta imune inata, através dos neutrófilos é ativada por TLR e IL1R na resposta antifúngica. A expressão dos TLRs varia com o tipo morfológico destes fungos. Assim o estresse oxidativo, a degranulação de neutrófilos bem como a quantidade e especificidade de suas toxinas determinará a eficiência da atividade fungicida *versus* a citotoxicidade inflamatória (Romani, 2004).

A sinalização do TLR depende do morfotipo, os diferentes TLRs ativados influenciam de maneira distinta a resposta Th1 e inata, ativando funções antifúngicas especializadas em células dendríticas e neutrófilos.

Leveduras e hifas de *Candida albians* participam da diferenciação de monócitos em células dendríticas. Embora ambas sejam capazes de polarizar as células T *naïve* para Th1, observou-se em estudo experimental que os monócitos se comportam de maneira distinta ao fagocitar leveduras e hifas. Ao fagocitarem leveduras os monócitos se tornam incapazes de se diferenciar em CD, diferenciando-se em macrófagos. Enquanto isso, as hifas

induzem a diferenciação dos mesmos em células dendríticas, com fenótipo atípico e baixa capacidade de induzir Th1 (Nisini et al., 2007).

O β -glucan, provavelmente, está envolvido na modulação e ativação do sistema imune inato, sendo responsável pela incapacidade dos monócitos infectados de diferenciarem em células dendríticas funcionantes para apresentação do antígeno às células T. Sua localização na parede celular de hifas, mas não nas de leveduras reforça a hipótese (Nisini et al., 2007).

Em um trabalho investigativo, o fenótipo observado em macrófagos estimulados por hifas ou glucanas desencadeia a secreção de um perfil de citocinas muito parecido, sendo incapazes de produzir IL12, em contraste com a expressão de CD83 e CD86 que indicam maturidade. Enquanto nas células dendríticas estimuladas por glucana ocorre produção de IL6, e baixos níveis de IL10. A falha nesta polarização da resposta imunológica explica a capacidade da *Candida albicans* de se evadir da resposta imune do hospedeiro (Nisini et al., 2007).

A avaliação da expressão de TLR em infecções por *Malassezia furfur* foi avaliada em cultura de queratinócitos onde se observou aumento precoce na expressão de TLR 2, MyD88 e em menores níveis TLR1. Não houve aumento de expressão de TLR 3, 4 e 5 neste estudo. O aumento de TLR2 relacionou-se diretamente ao aumento da expressão de IL8, essencial para quimiotaxia de células inflamatórias (Baroni et al., 2006).

Estudos realizados em *Paracoccidioides brasiliensis*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans* sugerem o envolvimento dos TLRs

também no reconhecimento destes patógenos (Jouault et al., 2003; Diniz et al., 2004; Zhao, Wu, 2008).

Na paracoccidiodomicose observou-se possível regulação pelas CD, em camundongos susceptíveis, promovendo a produção de IL10 e contribuindo para o aumento da susceptibilidade mediada pela expressão de TLR2. O mecanismo de susceptibilidade sugerido, comparativamente entre camundongos susceptíveis e resistentes ao *Paracoccidiodies brasiliensis*, foi a expressão em CD. Em camundongos resistentes à infecção fúngica ocorre menor produção de IL10, IL12 e TNF α , enquanto, nos susceptíveis haveria maior produção de TNF α , IL12, CD80 e CD54, além de maior fagocitose. A ativação do TLR2 seria responsável pela produção de IL10 e sua maior produção contribuiria para aumentar a susceptibilidade à infecção (Ferreira et al., 2007).

Em dermatofitoses raros trabalhos recentes estudaram a participação dos TLRs na defesa imune contra o fungo. Em dermatofitose por *T. rubrum* um estudo chinês, em cultura de queratinócitos humanos linhagem HaCaT, apontou aumento da expressão do TLR 2 e 4 e dectin 1, mensurado por citometria de fluxo após cultura com conídeos do fungo. Resultando em concomitante aumento de secreção de IL8, IL6 e IL13 (Li et al., 2011).

Este achado foi distinto ao encontrado por outro grupo trabalhando com queratinócitos humanos, provenientes de cirurgias, onde houve diminuição da expressão de TLR 2 e 6 após exposição a conídeos íntegros deste dermatófito (García-Madrid et al., 2011).

Não existe ainda na literatura indexada na base de dados PubMed/Medline estudos *in vivo* da expressão dos TLRs 2 e 4 em queratinócitos da epiderme humana durante a infecção cutânea pelo *T. rubrum*.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Estudaram-se dois grupos de doentes portadores de dermatofitose sendo 7 portadores de dermatofitoses extensas (figura 2) e 8 portadores de dermatofitoses localizadas. Incluiu-se ainda um grupo controle, constituído de indivíduos saudáveis submetidos à cirurgia estética na face, abdome ou mama. Inexistia qualquer infecção cutânea fúngica na pele biopsiada do grupo controle.

Como critério de inclusão micológico, todos os doentes selecionados tinham exame micológico direto positivo para fungos dermatófitos (hifas hialinas, septadas e artrósporos) e cultura para fungos em meio de Ágar Dextrose Sabouraud à temperatura ambiente, com crescimento de colônia com características macroscópicas do *T. rubrum*, o que posteriormente foi confirmado com microcultivo em lâmina segundo critérios propostos por Lacaz et al., 2002.

Critérios de inclusão dos pacientes:

- a. Doentes com dermatofitose confirmadas com micológico direto e cultura para fungos, sendo: dermatofitoses extensas (acometendo pelo menos três seguimentos corporais distintos) (exemplo na figura 2 A/B/C/D) ou localizadas (acometendo único segmento corporal);
- b. Indivíduos maiores de 18 anos;
- c. Indivíduos que aceitaram participar do estudo e assinaram termo de consentimento após esclarecimento.

Critérios de exclusão dos pacientes:

- a. Indivíduos portadores de imunossupressão adquirida (HIV, diabetes melito, medicações imunossupressoras, nefropatas e hepatopatas) ou congênita;
- b. Gestantes;
- c. Menores que 18 anos de idade;
- d. Doentes cujo agente etiológico da dermatofitose não fosse identificado como *Trichophyton rubrum*;
- e. Pacientes submetidos à terapia antifúngica tópica ou sistêmica no último mês.

Os dados demográficos e clínicos dos indivíduos incluídos no estudo estão descritos nos quadros 4 a 6.

Todos doentes incluídos neste estudo leram e assinaram o Termo de consentimento pós-informado. (ANEXO I) O estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CAPEPESQ) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e aprovado sob protocolo número 673/06.

Com a finalidade de garantir a homogeneidade da amostra, preencheu-se a Ficha Clínica (ANEXO II).

Figura A/B/C/D- Paciente com dermatofitose extensa.
(Publicação de fotos autorizadas pelo doente)

Quadro 4- Dados demográficos e clínicos dos pacientes controles.

Doentes	Sexo	Idade	Etnia	Locais biopsiados
Controle 1	F	50	B	Face
Controle 2	F	64	B	Face
Controle 3	F	59	B	Face
Controle 4	F	48	B	Face
Controle 5	F	55	B	Face
Controle 6	F	53	B	Face
Controle 7	F	50	B	Face
Controle 8	F	67	B	Face
Controle 9	F	53	B	Face
Controle 10	F	59	B	Face
Controle 11	F	50	B	Face
Controle 12	F	67	B	Face
Controle 13	F	56	B	Face
Controle 14	F	52	B	Face
Controle 15	F	72	B	Face
Controle 16	F	70	B	Face
Controle 17	F	51	B	Abdome
Controle 18	F	46	B	Mama
Controle 19	M	62	B	Tórax
Controle 20	F	56	B	Dorso

Legenda M: masculino, F: feminino, B: branco.

Quadro 5- Dados demográficos e clínicos dos pacientes portadores de dermatofitose localizada

Doentes	Sexo	Idade	Etnia	Tempo da instalação da micose	Locais da tinha	Locais biopsiados
Doente 1	M	44	B	2 meses	Virilha e flanko E	Virilha
Doente 2	F	24	B	3 meses	Braço E	Braço E
Doente 3	M	18	B	5 meses	Nádegas	Nádegas
Doente 4	M	30	B	5 anos	Virilha, nádegas	Nádegas
Doente 5	F	41	P	5 meses	Abdome, coxa D	Abdome
Doente 6	M	58	B	5 anos	Dorso e coxa D	Coxa D
Doente 7	M	62	B	1 ano	Palmar e plantar a D	Palmo-plantar D
Doente 8	F	36	B	1m	Coxa E	Coxa E

Legenda M: masculino, F: feminino, D: direito, E: esquerdo, P: pardo, B: branco.

Quadro 6- Dados demográficos e clínicos dos pacientes portadores de dermatofitoses extensa

Doentes	Sexo	Idade	Etnia	Tempo da instalação da micose	Locais da tinha	Locais biopsiados
Doente 1	F	35	B	5 anos	Virilha, abdome, panturrilha D	Abdome
Doente 2	M	41	B	2 meses	Dorso, virilha, abdome e antebraço D	Abdome
Doente 3	M	26	B	3 anos	Tórax D, axila, pés, membros superiores e inferiores	Tórax D
Doente 4	F	28	B	5 meses	Abdome inferior, região sacral, virilha e coxas D e E	Abdome inferior
Doente 5	M	19	P	3 meses	Pescoço, abdome, virilha	Abdome
Doente 6	F	51	B	2 meses	Pescoço, membro superior E, tronco, perna	Perna
Doente 7	M	47	B	6 meses	Antebraço D, virilha, abdome inferior	Antebraço D

Legenda M: masculino, F: feminino, D: direito, E: esquerdo, P: pardo, B: branco.

4.1- Coleta das amostras para estudo micológico:

Realizou-se exame micológico direto das escamas cutâneas da borda ativa da lesão e da pele aparentemente sã dos doentes selecionados para o estudo, os quais foram admitidos no atendimento de triagem da Divisão de Dermatologia do HC-FMUSP (AGD DERMA), consecutivamente no período do estudo, com hipótese diagnóstica de dermatofitose do corpo. As amostras foram clarificadas pelo hidróxido de potássio a 20% em lâminas e em seguida cobertas por lamínulas e observadas ao microscópio óptico de luz. A fim de se definir gênero e espécie do fungo, parte do material foi semeada em meio de ágar Dextrose Sabouraud, mantido a 25° C.

Observou-se o aspecto macroscópico da colônia por duas semanas. A fim de definir o gênero e a espécie do fungo, cultivou-se em ágar-batata a 25°C, e corou-se com lactofenol azul de algodão.

No microcultivo foram identificadas formas reprodutoras características deste fungo (diversos microconídeos regulares e piriformes, e macroconídeos escassos, alongados, de paredes finas e septados).

4.2- Coleta das amostras para estudo Histoquímico e Imuno-histoquímico:

Dos doentes portadores de dermatofitoses foram retirados dois fragmentos cutâneos, por punch ou trépano de 5mm de diâmetro, sob

anestesia local com lidocaína a 2% sem vasoconstritor: um fragmento da borda ativa da lesão e outro de pele sã, distando pelo menos 4 cm da área cutânea acometida, no mesmo segmento corporal. Seguiu-se a hemostasia através de ponto de sutura com fio mononylon 4.0. (figura 3)

Figura 3- Área esquemática do local de biópsia da lesão.

Os fragmentos de pele colhidos foram fixados no formal tamponado a 10% (tampão fosfato 0,02M; pH 7,2) e submetidos à técnica de histoquímica [técnica histológica de rotina com coloração pela hematoxilina e eosina (HE), coloração pelo ácido periódico de Schiff-(PAS)] e imuno-histoquímica com os anticorpos marcadores anti-TLR2 e TLR4, conforme técnica descrita a seguir.

Os resultados descritivos de histoquímica e coloração de PAS encontram-se descritos no anexo 3.

4.3- Técnica de Imuno-histoquímica:

Os cortes histológicos de 4 μm de espessura foram obtidos a partir de material embebido em parafina e colhidos em lâminas previamente preparadas com solução adesiva de 3 amino-propyltriethoxy-silane (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO/USA, cód. A3648) a 2%. A seguir, os cortes histológicos foram desparafinizados em dois banhos de xilol à temperatura ambiente durante 20 minutos cada. Posteriormente, foram hidratados em seqüência decrescente de etanol (absoluto, 95% e 70%) e água corrente durante cinco minutos cada.

Nas lâminas que foram marcadas com anti-TLR4, realizou-se o bloqueio de peroxidase endógena, feito em câmara escura com seis incubações em água oxigenada 3% por 10 minutos cada. Em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por cinco minutos cada e submersas em solução salina tamponada (PBS) pH 7.4.

Posteriormente, as lâminas foram submetidas a tratamento para exposição dos sítios antigênicos em calor úmido (panela a vapor) no tampão TRIS/EDTA 10mM/1mM pH 9.0, durante 25 minutos após o aquecimento do tampão a 95°C. Após serem lavadas em água corrente e água destilada por cinco minutos cada e submersas em PBS pH 7.4, procedeu-se o bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido o que foi realizado com incubação em solução de leite desnatado (Molico, Nestlé®) a 10% durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Então, foram incubadas com o anticorpo primário policlonal anti-TLR-2 (Santa Cruz Biotechnology[®], Inc., Santa Cruz, CA, USA, código sc-10739) diluído a 1:50, ou policlonal anti-TLR4 (Abcam, Cambridge, MA, USA, código ab47093) diluído a 1:100 em BSA fração V (SERVA. 1930) 1% acrescida de azida sódica 0,1% em PBS pH 7.4, “over-night” a 4°C.

Para pesquisa de TLR2 após lavagem das lâminas por duas vezes em PBS pH 7.4 durante cinco minutos cada, seguiu-se à incubação com o anticorpo secundário anti-IgG/IgM (mouse/rabbit) (EnVision[™] G2 system-AP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, código K5355) pronto para uso durante 30 minutos a 37°C. Em seguida as lâminas foram lavadas em tampão PBS pH 7.4, por duas vezes, durante cinco minutos cada e incubadas com o polímero marcado com fosfatase alcalina (EnVision[™] G2 system-AP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, código K5355) pronto para uso em câmara úmida durante 30 minutos a 37°C.

Para a pesquisa de TLR4 após o procedimento de lavagem das lâminas por duas vezes em tampão PBS pH 7.4 durante cinco minutos cada, procedeu-se à incubação com o anticorpo secundário anti-IgG/IgM (mouse/rabbit/goat) biotinilado (LSAB+system-HRP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, cód. K0690) pronto para uso em câmara úmida durante 30 minutos a 37°C. E em seguida as lâminas foram lavadas em tampão PBS pH 7.4, por duas vezes, durante cinco minutos cada e incubadas com o complexo Streptavidina-Biotina-Peroxidase (LSAB+system-HRP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, cód. K0690) pronto para uso em câmara úmida durante 30 minutos a 37°C.

As reações para a expressão de TLR4, foram visualizadas através do cromógeno diaminobenzidina (3,3'-diaminobenzidine, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO/USA, código D5637) 0,03% acrescida de 1,2 ml de água oxigenada 3%. As reações para a expressão de TLR2 foram visualizadas através do cromógeno "Permanent Red" (DAKO, Carpinteria, CA, USA, código K0640) 0,13% acrescido de 40µl de levamisole (DAKO, Carpinteria, CA, USA, código X3021).

A intensidade da cor foi controlada ao microscópio óptico através dos controles positivos que acompanharam as reações. Os controles positivos aos antígenos estudados foram: pele normal para células com expressão de TLR2 e TLR4. Os controles negativos das reações foram obtidos através da omissão do anticorpo primário, que foi substituído por PBS.

As lâminas foram, então, lavadas em água corrente por cinco minutos, contracoradas com Hematoxilina de Harris por 10 segundos. A seguir foram lavadas em água corrente, e secas à temperatura ambiente.

Por último procedeu-se a montagem das lâminas com resina Permout (FISHER Scientific, Fair Lawn, NJ/USA, cód. SP15-100).

4.4- Análise das imagens

As lâminas foram fotografadas em toda a extensão da epiderme superficial e profunda, com ocular de 10X e objetiva de 20X, utilizando câmera Carl Zeiss AxioCam MR3 montada em microscópio óptico Zeiss

modelo Axiophot. Posteriormente as imagens foram analisadas em programa próprio Imagem Pro Plus (Media Cybernetics, Inc). (figura 4 a 6) Inicialmente definiu-se a escala de cor a ser considerada marcada em histograma de cores. Admitiu-se 3,11 pixel por unidade.

Todos os campos das lâminas foram fotografados. Para análise dividiu-se a epiderme em superior e inferior utilizando para tanto linha traçada no marco 50% da sua espessura após três medidas em diferentes pontos da lâmina.

Da imagem realizaram-se medidas da área marcada, área total e índice de densidade óptica, separadamente para metade superior e inferior da epiderme.

Calculou-se a relação entre a área marcada e área total da epiderme, expressando-se o resultado em porcentagem. Depois de mensurado o índice de densidade óptica pelo programa, o valor encontrado foi subtraído de 255 (o que em escala de cinza corresponderia a somatória de todas as cores), a inversão dos valores foi realizada para facilitar a interpretação dos resultados, sendo assim quanto mais próximo de zero mais claro e quanto mais próximo de 255 mais escura a marcação na área em estudo. (Custódio, 2009)

Para os dois parâmetros mensurados, os valores referentes aos diversos campos fotografados da mesma lâmina foram somados e o valor utilizado para comparação foi a média simples dos mesmos.

Figura 4- Imagem do programa Image Pro Plus.
(Em azul a área marcada, dentro da linha verde a área a ser mensurada como área total de epiderme superficial, em amarelo linha que divide a epiderme no que chamaremos de epiderme superficial e profunda).

4.5- Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando programa de estatística SigmaStat MFC Application, versão 2.0, (SPSS Inc). Realizou-se teste pareado Wilcoxon Signed Ranks para estudo comparativo entre as peles sã e lesada do mesmo indivíduo. A comparação entre os grupos utilizou o teste Kruskal-Wallis. O p com significância estatística admitido foi menor que 0,05.

Figura 5- Expressão do TLR2 em epiderme profunda de área lesada em indivíduo com dermatofitose extensa, evidenciada pela marcação (área marcada) do programa Image Pro Plus (Imuno-histoquímica).

Figura 6 A/B- Expressão do TLR2 em epiderme superficial e profunda de área sã em indivíduo com dermatofitose extensa, evidenciada pela marcação (área marcada) do programa Image Pro Plus (Imunohistoquímica).

5 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em relação aos três grupos estudados:

- I. Grupo A: pacientes com dermatofitose extensa, definida como dermatofitose presente em 3 ou mais segmentos corporais, composto por 7 indivíduos;
- II. Grupo B: pacientes portadores de dermatofitose localizada com 8 indivíduos;
- III. Grupo C: controle composto por 20 indivíduos sadios.

A média de idade por grupo foi de 35,3 (19-51) anos para o grupo A; 39,13 (18-62) anos para o grupo B e 57 (46-72) anos para o grupo C. Os pacientes em estudo eram de etnia branca em sua maioria, a exceção de dois pardos, sendo um no grupo de dermatofitose localizada e outro no grupo de dermatofitose extensa.

No grupo controle (grupo C) a maioria das biopsias foi obtida da face. Nos grupos dos doentes (grupo A e B), as áreas acometidas pela dermatofitose e biopsiadas foram as mais diversas e encontram-se descritas nos quadros de 4-6. O tempo de evolução da doença foi de 16,29 (2-60) meses no grupo A e de 18,5 (1-60) meses no grupo B.

Após cultura de raspado da pele da borda ativa da lesão, em meio próprio de Ágar-Sabouraud, houve crescimento de *T. rubrum* em todos os casos de dermatofitose (grupos A e B). Os casos onde houve crescimento

de outras espécies de fungos foram excluídos do estudo (critérios de exclusão).

Referente ao padrão de expressão dos receptores, evidenciamos que o TLR2 expressou-se difusamente em toda epiderme superficial e profunda, com marcação nuclear e citoplasmática nas células epidérmicas, às vezes com aspecto grosseiro (figuras 7 a 9).

Enquanto o TLR4 se expressa em toda epiderme superficial e profunda difusamente em grânulos finos, com marcação nuclear e padrão homogêneo de distribuição citoplasmática nas células epidérmicas (figuras 10 a 12).

Figura 7 A/B- Expressão de TRL2 em epiderme de dois casos controles (imuno-histoquímica, aumento 200X).

Figura 8 A/B- Expressão de TRL2 na epiderme de área sã e pele lesada de indivíduo com dermatofitose localizada (imuno-histoquímica, aumento 200X).

Figura 9 A/B- Expressão de TRL2 na epiderme de área sã e pele lesada de indivíduo com dermatofitose disseminada (imuno-histoquímica, aumento 200X).

Figura 10 A/B- Expressão de TRL4 em epiderme de dois casos controles (imuno-histoquímica, aumento 200X).

Figura 11 A/B- Expressão de TRL4 na epiderme de área sã e pele lesada de indivíduo com dermatofitose localizada (imuno-histoquímica, aumento 200X).

Figura 12 A/B- Expressão de TRL4 na epiderme de área sã e pele lesada de indivíduo com dermatofitose disseminada (imuno-histoquímica, aumento 200X).

Tabela 1- Expressão dos TLR2 e 4 quantificada por porcentagem de área na epiderme superficial de portadores de dermatofitoses localizadas e extensas.

TLR	N	GRUPO	SUBGRUPO	%ÁREA (Média±desvio padrão)	%ÁREA Mediana (Mínimo- Máximo)
TLR2	8	Localizada	Pele normal	30,50±30,91 ^{1,3}	20,50 (2-84)
TLR2	8	Localizada	Pele lesada	28,88±29,83 ^{1,3,9}	25,50 (0-76)
TLR2	7	Extensa	Pele normal	19,29±17,19 ^{5,7,9}	21 (1-52)
TLR2	7	Extensa	Pele lesada	11,57±19,02 ^{5,7,9}	3 (0-53)
TLR2	20	Controles saudáveis		26,05±14,18 ^{3,7,9}	25 (1-51)
TLR4	8	Localizada	Pele normal	51,50±36,04 ^{2,4}	64 (3-89)
TLR4	8	Localizada	Pele lesada	44,75±34,56 ^{2,4}	45 (0-82)
TLR4	8	Extensa	Pele normal	37,86±34,60^{6,8}	54 (1-74)
TLR4	8	Extensa	Pele lesada	35,14±39,19^{6,8,a}	11 (0-82)
TLR4	20	Controles saudáveis		68,90±21,25^{4,8,a}	74,5 (13-89)

¹t=0,174; p=0,867 ²t=1,938; p=0,094 ³F=0,126; p=0,882 ⁴F=2,30; p=0,117

⁵t = 0,954; p = 0,377) ⁶t = 0,366; p= 0,727 ⁷F=2,271; p=0,120 ⁸**F=4,942; p=0,014**

^a**P=2,607; p= 0,042** (Bonferroni t-test)

Tabela 2- Expressão dos TLR2 e 4, quantificada por índice de densidade óptica na epiderme superficial de portadores de dermatofitoses localizadas e extensas.

TLR	N	GRUPO	SUBGRUPO	IDO (Média±desvio padrão)	IDO Mediana (Mínimo-Máximo)
TLR2	8	Localizada	Pele normal	114,37±32,41 ^{1,3}	97,76 (93,79-175,31)
TLR2	8	Localizada	Pele lesada	107,66±26,88 ^{1,3}	93,13 (84,9-149,72)
TLR2	8	Extensa	Pele normal	123,45±37,63 ^{5,7}	98,51 (87,93-183,51)
TLR2	8	Extensa	Pele lesada	120,89±45,64 ^{5,7}	99,83 (91,75-214,94)
TLR2	20	Controles saudáveis		128,59±15,25 ^{3,7}	130,72 (95,1-155,37)
TLR4	8	Localizada	Pele normal	108,75±9,47^{2,4,a}	105,42 (99,44-122,84)
TLR4	8	Localizada	Pele lesada	108,80±7,73^{2,4,b}	110,39 (97,76-120,38)
TLR4	7	Extensa	Pele normal	109,86±6,84^{8,c}	110,29 ⁶ (99,61-120,15)
TLR4	7	Extensa	Pele lesada	110,86±15,57^{8,d}	108,16 ⁶ (98,43-144,37)

TLR4	20	Controles saudáveis	145,26±21,88^{4,8,a,b,c,d}	149,95 (98,13-179,23)
------	----	---------------------	---	--------------------------

Tabela 2- Expressão dos TLR2 e 4, quantificada por índice de densidade óptica na epiderme superficial de portadores de dermatofitoses localizadas e extensas (conclusão).

IDO: índice de densidade óptica ¹t=1,510; p=0,175 ²t=-0,0138; p=0,989 ³F=2,869; p=0,071
⁴F=17,875; **p<0,001** ⁵t = 0,304; p = 0,771 ⁶W= -14,000; p=0,297 ⁷F=0,221; p=0,803

⁸F=13,286, **p<0,001**

^aP=4,817; **p<0,001** ^bP=4,811; **p<0,001** ^c P=4,166, **p=<0,001** ^d P=4,045; **p=0,001**
 (Bonferroni t-test)

Tabela 3- Expressão dos TLR2 e 4, quantificada por porcentagem de área, na epiderme profunda de portadores de dermatofitoses localizadas e extensas.

Receptor	n	GRUPO	SUBGRUPO	%ÁREA Média±desvio padrão	%ÁREA Mediana (Mínimo-máximo)
TLR2	8	Localizada	Pele normal	29,44±33,45 ^{1,3}	11,5 (0,5-87)
TLR2	8	Localizada	Pele lesada	32,38±30,23 ^{1,3}	30,5 (0-72)
TLR2	7	Extensa	Pele normal	12,74±11,96^{5,7}	13,2 (0-29)
TLR2	7	Extensa	Pele lesada	6,29±9,73^{5,7,a}	3 (0-27)
TLR2	20	Controles saudáveis		27,80±18,60^{3,7,a}	25,5 (0-64)
TLR4	8	Localizada	Pele normal	51,50±31,79 ^{2,4}	62 (4-84)
TLR4	8	Localizada	Pele lesada	45,38±33,78 ^{2,4}	51 (0-86)
TLR4	8	Extensa	Pele normal	35,50±29,74^{6,8,b}	44 (2-69,5)
TLR4	8	Extensa	Pele lesada	26,71±28,18^{6,8,c}	11 (1-68)
TLR4	20	Controles saudáveis		66,80±19,58^{4,8,b,c}	71,5 (10-84)

IDO: Índice de densidade óptica

¹t=0,520; p=0,619 ²t=-2,135; p=0,070 ³F=0,0954; p=0,909 ⁴F=2,324; p=0,114

⁵t = -1,372; p = 0,219) ⁶t = 1,268; p= 0,252 ⁷F=5,621; p=0,008 ⁸F=9,612; p<0,001

^aP=3,050; p=0,014 ^bP=3,012; p=0,015 ^cP=3,858; p=0,002 (Bonferroni t-test)

Tabela 4- Expressão dos TLR2 e 4 quantificada por índice de densidade óptica na epiderme profunda de portadores de dermatofitoses localizadas e extensas.

TLR	n	GRUPO	SUBGRUPO	IDO (Média±desvio padrão)	IDO Mediana (Mínimo- Máximo)
TLR2	8	Localizada	Pele normal	118,75±36,84^{1,3}	100,46 (96,03-195,86)
TLR2	8	Localizada	Pele lesada	109,28±30,90^{1,3}	97,56 (84,25-172,65)
TLR2	7	Extensa	Pele normal	144,69±68,79	98,97 (90,6-255) ^{5,7}
TLR2	7	Extensa	Pele lesada	132,82±60,59	98,61 (84,75-255) ^{5,7}
TLR2	20	Controles saudáveis		132,85±15,26 ³	134,44 ⁷ (92,46-155,37)
TLR4	8	Localizada	Pele normal	110,83±7,65 ²	110,78 (102,52-122,56)^{4,a}
TLR4	8	Localizada	Pele lesada	110,30±4,75 ²	111,19 (102,55-116,04)^{4, b}
TLR4	7	Extensa	Pele normal	111,77±6,80^{6,8,c}	113,42 (101,42-118,84)
TLR4	7	Extensa	Pele lesada	111,19±13,45^{6,8,d}	104,83 (99,98-138,59)
TLR4	20	Controles saudáveis		144,65±17,20^{8,c,d}	148,41 (99,16-162,05)^{4,a,b}

Tabela 4- Expressão dos TLR2 e 4 quantificada por índice de densidade óptica na epiderme profunda de portadores de dermatofitoses localizadas e extensas (Conclusão).

¹**t=-3,093; p=0,018** ²t=-0,0176; p=0,865 ³F=2,812; p=0,075 ⁴**H= 19,310; p<0,001**

⁵W=8,0; p=0,578 ⁶t = -0,149; p = 0,887 ⁷H=0,734; p=0,693 ⁸**F= 20,130; p<0,001**

^a**P=3,466; p<0,05** ^b**P=3,579; p<0,05** (Dunn`s) ^c**P=4,990; p=<0,001** ^d**P=5,079; p=0,001**
(Bonferroni t-test)

Tabela 5- Comparação da expressão dos TLR2 na epiderme superficial e profunda, quantificados por índice de densidade óptica e porcentagem de área.

		% ÁREA		ÍNDICE DE DENSIDADE ÓPTICA	
		Superficial	Profunda	Superficial	Profunda
Dermatofitose localizada	Pele sã	30,50±30,91 ^{a,b}	29,44±33,45 ^{a,b}	114,37±32,41	118,75±36,84
				97,76 ^{c,d}	100,46 ^{c,d}
				(93,79-175,31)	(96,03-195,86)
	Pele lesada	28,88±29,83 ^{a,b}	32,38±30,23 ^{a,b}	107,66±26,88	109,28±30,90
Dermatofitose extensa	Pele sã	19,29±17,19 ^{e,f}	12,74±11,96 ^{e,f}	123,45±37,63 ^g	144,69±68,79 ^g
				98,51 ^h	98,97 ^h
				(87,93-183,51)	(90,6-255)
	Pele lesada	11,57±19,02 ^{e,f}	6,29±9,73 ^{e,f}	120,89±45,64 ^g	132,82±60,59 ^g
Controles		26,05±14,18 ^{b,e,f}	27,80±18,60 ^{b,e,f}	130,72 ^{d,h}	134,44 ^{d,h}
				(95,1-155,37)	(92,46-155,37)

^a p=0,954 ^b p=0,991 ^c p=0,050 ^d p=0,028 (sem relevância clínica) ^e p=0,207 ^f p=0,012
^g p= 0,236 ^h p=0,690

Tabela 6- Comparação da expressão dos TLR4 na epiderme superficial e profunda, quantificados por índice de densidade óptica e porcentagem de área.

		% ÁREA		ÍNDICE DE DENSIDADE ÓPTICA	
		Superficial	Profunda	Superficial	Profunda
Dermatofitose localizada	Pele sã	51,50±36,04	51,50±31,79	108,75±9,47 ^c 105,42 ^d	110,83±7,65 ^c
		64 (3-89) ^{a,b}	62 (4-84) ^{a,b}	(99,44- 122,84)	110,78 ^d (102,52-122,56)
	Pele lesada	44,75±34,56	45,38±33,78	108,80±7,73 ^c 110,39 ^d	110,30±4,75 ^c
		45 (0-82) ^{a,b}	51 (0-86) ^{a,b}	(97,76-120,38)	111,19 ^d (102,55-116,04)
Dermatofitose extensa	Pele sã	37,86±34,6 ^e	35,50±29,74 ^e	109,86±6,84	111,77±6,80
		54 (1-74) ^f	44 (2-69,5) ^f	110,29 ^{g,h} (99,61-120,15)	113,42 ^{g,h} (101,42-118,84)
	Pele lesada	35,14±39,19 ^e	26,71±28,18 ^e	110,86±15,57	111,19±13,45
		11 (0-82) ^f	11 (1-68) ^f	108,16 ^{g,h} (98,43-144,37)	104,83 ^{g,h} (99,98-138,59)
Controles		68,90±21,25 74,5 (13-89) ^{b,f}	66,80±19,58 71,5 (10-84) ^{b,f}	145,26±21,88 149,95 ^{d, h} (98,13-179,23)	144,65±17,20 148,41 ^{d, h} (99,16-162,05)

^a p=0,326 ^b p=0,301 ^c p=0,904 ^d p<0,001* ^e p=0,919 ^f p,0,001* ^g p=0,392 ^h p 0,001

*(sem relevância clínica para esta análise)

Após estudo das imagens observou-se que houve uma diminuição na expressão do **TLR4**, na **epiderme superficial**, em todos os indivíduos com dermatofitose, tanto na pele sã como na pele lesada, independente de tratar-se de dermatofitose localizada ou extensa, em relação ao grupo controle. Não observamos nesta amostra diferença estatística na expressão do **TRL4** na pele sã ou clinicamente lesada dos indivíduos doentes. (tabelas 1 e 2)

No que se refere à expressão do **TLR2**, na **epiderme superficial**, não foi observada qualquer diferença estatisticamente significativa entre os grupos. (tabelas 1 e 2)

Na **epiderme profunda** foi possível observar, em dermatofitoses localizadas, uma diminuição na expressão do **TLR2** na pele lesada comparativamente a área de pele sã do mesmo indivíduo. Já em dermatofitoses extensas, evidenciamos uma menor expressão do TRL2 na pele lesada em relação aos controles saudáveis. (tabelas 3 e 4)

A expressão do **TLR4**, na **epiderme profunda**, foi menor nos indivíduos portadores de dermatofitoses localizadas ou extensas, tanto na pele sã quanto na pele lesada, quando comparados ao grupo controle. Não se observou diferença estatística, na expressão de TRL4 na pele sã e lesada destes indivíduos. (tabelas 3 e 4)

Não se demonstrou predomínio da expressão destes receptores na epiderme superficial ou profunda em nenhum dos grupos estudados. (tabelas 5 e 6)

Os dados descritivos referentes à expressão de TLR2 e TLR4 na epiderme superficial e profunda dos portadores de dermatofitoses e controles se encontram sumarizados nas tabelas 1 a 6. Considere: A%: porcentagem de área marcada (área marcada de epiderme / área total da epiderme X 100); IDO: índice de densidade óptica, subtraído de 255; *p*: significância estatística.

Gráfico 1- Expressão comparativa do TLR2 na pele sã e lesada de indivíduos portadores de dermatofitose extensa e localizada, e em controles sadios, quantificada em porcentagem de área marcada na epiderme profunda e superficial.

Legenda- A%: porcentagem de área marcada (área marcada de epiderme / área total da epiderme X 100); Ext: extensa; Loc:localizada.

Gráfico 2- Expressão comparativa do TLR2 na pele sã e lesada de indivíduos portadores de dermatofitose extensa e localizada, e em controles sadios, quantificada através do IDO na epiderme profunda e superficial.

Legenda- IDO: índice de densidade óptica, subtraído de 255; Ext: extensa; Loc: localizada.

Gráfico 3- Expressão comparativa do TLR4 na pele sã e lesada de indivíduos portadores de dermatofitose extensa e localizada, e em controles sadios, quantificada em porcentagem de área marcada na epiderme profunda e superficial.

Legenda- A%: porcentagem de área marcada (área marcada de epiderme / área total da epiderme X 100); Ext: extensa; Loc:localizada.

Gráfico 4- Expressão comparativa do TLR4 na pele sã e lesada de indivíduos portadores de dermatofitose extensa e localizada, e em controles sadios, quantificada através do IDO na epiderme profunda e superficial.

Legenda- IDO: índice de densidade óptica, subtraído de 255; Ext: extensa; Loc: localizada.

Os achados nesta casuística referente à expressão epidérmica dos TLR 2 e 4 podem ser assim sumarizados:

Expressão do TLR2 na epiderme superficial:

- I. Grupo A (forma extensa): Não houve alteração da expressão comparando-se aos grupos B e C. Não houve diferença na expressão comparativamente entre as áreas de pele sã e lesada do grupo.
- II. Grupo B (forma localizada): Não houve alteração da expressão comparando-se aos grupos A e C. Não houve diferença na expressão comparativamente entre as áreas de pele sã e lesada do grupo.
- III. Grupo C (controle): A expressão foi semelhante aos grupos A e B.

Expressão do TLR2 na epiderme profunda:

- I. Grupo A (forma extensa): A expressão do TLR2 foi menor na área de pele lesada do que em controles (grupo C) (gráfico 1). Não houve diferença na expressão comparativamente entre as áreas de pele sã e lesada do grupo.
- II. Grupo B (forma localizada): Não houve alteração da expressão comparando-se aos grupos A e C. A expressão foi menor na área de pele lesada do que na área de pele sã dos indivíduos deste grupo (gráfico 2).
- III. Grupo C (controle): A expressão foi semelhante ao grupo B.

Expressão do TLR4 na epiderme superficial (gráficos 3 e 4):

- I. Grupo A (forma extensa): Houve menor expressão tanto na área de pele sã quanto lesada comparando-se ao grupo C. Não houve diferença na expressão comparativamente entre as áreas de pele sã e lesada do grupo.
- II. Grupo B (forma localizada): Houve menor expressão tanto na área de pele sã quanto lesada comparando-se ao grupo C. Não houve diferença na expressão comparativamente entre as áreas de pele sã e lesada do grupo.
- III. Grupo C (controle): A expressão do TLR4 foi maior comparando-se aos grupos A e B.

Expressão do TLR4 na epiderme profunda (gráficos 3 e 4):

- I. Grupo A (forma extensa): Houve menor expressão tanto na área de pele sã quanto lesada comparando-se ao grupo C. Não houve diferença na expressão comparativamente entre as áreas de pele sã e lesada do grupo.
- II. Grupo B (forma localizada): Houve menor expressão tanto na área de pele sã quanto lesada comparando-se ao grupo C. Não houve diferença na expressão comparativamente entre as áreas de pele sã e lesada do grupo.

- III. Grupo C (controle): A expressão do TLR4 foi maior comparando-se aos grupos A e B.

Assim com significância estatística observou-se que:

- A. Ocorre diminuição da expressão de TLR4 na epiderme superficial e profunda nos grupos A e B comparando aos controles.
- B. Ocorre diminuição da expressão de TLR2 somente na epiderme profunda na área de pele lesada do grupo A.
- C. A única diferença na expressão dos TLRs 2 e 4 entre a área sã e lesada da epiderme ocorreu na epiderme profunda do grupo B, onde a expressão de TLR 2 foi maior na área sã do que na lesada.

6 DISCUSSÃO

Os queratinócitos são a primeira barreira enfrentada por patógenos invasores, nos últimos anos a sua função como barreira imunológica e mecânica têm sido estabelecida. Um possível mecanismo de interação entre elas foi proposto em estudo recente, e parece ser mediado por TLRs. Aparentemente estes receptores ao reconhecerem o PAMP, sinalizam para diminuir a permeabilidade da barreira física e iniciam a resposta imune inata, a fim de controlar a invasão (Sugita et al., 2007; Yuki et al., 2011).

Após exposição aos dermatófitos ou seus antígenos, os queratinócitos produzem amplo espectro de citocinas, que incluem a IL8 (potente quimiotático de neutrófilos) e a citocina pró-inflamatória TNF α (fator de necrose tumoral alfa) (Nakamura et al., 2002), capazes de destruir os dermatófitos.

Entretanto o comportamento da resposta imunológica e o perfil de citocinas pró-inflamatórias secretado pelos queratinócitos variam conforme a espécie do dermatófito (Mignon et al., 2008), sendo as espécies zoofílicas responsáveis por maior inflamação local (Tani et al., 2007). As infecções por *T. rubrum* tendem a cronicidade e caracterizam-se por lesões pouco inflamatórias, geralmente marcadas pela polarização para uma resposta imune imediata e o não desenvolvimento de resposta celular adequada (Grappel SF et al., 1974). Os casos em estudo representam esta cronicidade, pois apresentaram duração média de 16,29 (2-60) meses no grupo de dermatofitoses extensas e de 18,5 (1-60) meses no grupo de dermatofitoses localizadas.

Os queratinócitos humanos, além de secretarem as citocinas que orquestrarão a resposta imune, secretam peptídeos antimicrobianos, como as catelicidinas e as defensinas, com potencial atividade antifúngica (Mignon et al, 2008). Vários autores demonstraram que a β defensina humana e a catelicidina LL37 são fungistáticas e fungicidas *in vitro* contra o *T. rubrum* e que sua expressão está aumentada *in vivo* na tinha do corpo causada por este fungo (López-Garcia et al, 2006; Jensen et al, 2007).

Importantes para a iniciação e a modulação das respostas adaptativas do sistema imune contra os dermatófitos são as células dendríticas (CD) epidérmicas, especialmente as CL (Célula de Langerhans) (Mignon et al., 2008). Estas células também possuem receptores para padrões moleculares associados a patógenos, denominados receptores de padrões de reconhecimento (PRRs), os quais incluem os receptores "Toll-like" (TLRs) e a família Lectina e Lectina símile, que possuem as tarefas de reconhecerem os patógenos invasores e polarizarem a resposta imune de maneira adequada (Sato et al., 2006; Saijo et al., 2010).

Diversas moléculas já foram descritas como capazes de reconhecer e ligar-se às hifas dos *M. canis* e *T. rubrum*, determinando a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF α (Sato et al., 2006). A fim de regular este efeito imunoestimulador, a fagocitose dos conídios do *T. rubrum* pelos macrófagos induz também à secreção de IL10, uma citocina com propriedades anti-inflamatórias, enquanto outros fatores relacionados com a imunidade protetora como o HLA, os linfócitos CD54 e CD80 (moléculas co-

estimuladoras), o óxido nítrico e a IL12 são suprimidos (Serrano-Gómez et al., 2005).

A supressão destes fatores e a produção de citocinas anti-inflamatórias se dá também pela necessidade de controle da inflamação tissular local, a fim de preservar a arquitetura da pele e também a função de barreira da epiderme. Visto que as citocinas pró-inflamatórias são capazes de aumentar a permeabilidade na estrutura juncional, enquanto as anti-inflamatórias como IL10 e TGF β impedem o rompimento da barreira mecânica (Yuki et al., 2011). Os fungos utilizam, então, esta regulação como mecanismo de evasão, e enquanto os conídeos não são eliminados, as hifas utilizam o macrófago para crescer (Campos et al., 2006).

Além dos queratinócitos e das CD, os neutrófilos são elementos celulares importantes na imunidade inata aos dermatófitos, acumulando-se precocemente, logo após a aderência dos conídios aos corneócitos, durante a fase germinativa. Admite-se que os neutrófilos são, em conjunto com os macrófagos, as células efetoras finais da eliminação da dermatofitose, via resposta inflamatória Th1 (Mignon et al., 2008).

Somados aos fatores relacionados à resposta imune organizada pelo hospedeiro, alguns fatores fúngicos já descritos também são capazes de manipular a resposta imunológica do indivíduo e facilitar a evasão fúngica. Vários estudos apontam para as propriedades imunossupressoras das mananas como responsáveis pela cronicidade da dermatofitose pelo *T. rubrum* na espécie humana (Mignon et al., 2008), um deles ressalta que a

fagocitose de conídeos do *T. rubrum* pelos macrófagos pode ser inibida pelas mananas da parede fúngica e pelo seu exoantígeno (Tani et al., 2007).

As mananas derivadas dos dermatófitos podem inibir ainda a adesão celular de forma DC-SIGN-dependente, ao ICAM3 das células T *naïve*, assim as mananas dos dermatófitos poderiam impedir as interações iniciais entre as CDs e as células T *naïve*, bloqueando a apresentação antigênica e a ativação das células T, e favorecendo o desenvolvimento de infecções extensas ou invasivas causadas pelos dermatófitos (Serrano-Gómez et al., 2005).

Além disto, especula-se que enzimas produzidas pelo fungo possam ser mais ou menos antigênicas, estimulando preferencialmente um dos braços da resposta imune no indivíduo. Semelhante ao que ocorre com a proteína gênica chamada Tri r 4, secretada pelo *T. rubrum*, que tem sua expressão aumentada ao entrar em contato com a queratina e a elastase do hospedeiro, sugerindo que pode se tratar de uma proteína com função de detectar o hospedeiro, ou relacionada a virulência, propriamente dita, capaz de degradar a queratina para invadir. Outras proteínas como a cellobiohydrolase e tioredoxina também foram descritas e relacionadas à virulência (Kaufman et al., 2005).

Vale aqui a ressalva que um mesmo antígeno como Tri r 4, uma peptidase, e Tri r 2, uma subtilase, podem estimular respostas diferentes, dependendo do hospedeiro (Woodfolk et al., 2000). Ainda que existem

enzimas capazes de destruir os PRRs (Maranhão et al., 2007), o que justificaria sua menor expressão nestes casos.

Assim sendo a interação fungo/hospedeiro definirá a resposta imunológica desenvolvida e a evolução da doença. Nosso estudo propôs analisar a expressão dos TLRs nos queratinócitos frente a infecção pelo *T. rubrum*. Já está estabelecida a relevância dos TLRs na defesa antifúngica em geral, e que os mesmos encontram-se expressos em queratinócitos (Nestle et al., 2009), porém nunca se verificou esta expressão em pele de humanos durante a infecção pelo *T. rubrum*.

Neste estudo observamos a expressão de TLR2 e 4 em toda a espessura da epiderme, semelhante ao encontrado na literatura com o uso de anticorpos policlonais. Apesar da variabilidade individual na expressão destes receptores, não se observou diferença estatística ao se comparar a expressão nas camadas superficial e profunda da epiderme nos controles sadios ou nos indivíduos com dermatofitose, como é descrito na literatura em epiderme normal (Baker et al., 2003; Arancibia et al., 2007; Begon et al., 2007).

Evidenciamos aqui uma menor expressão de TLR 2 e 4 nos indivíduos com dermatofitose quando comparados aos controles sadios. Hipotetizou-se que isto possa se dever a imunomodulação realizada pelo fungo com a finalidade de evadir da resposta imune do hospedeiro. Na parede do *T. rubrum* são encontrados β 1,2 manosideo, quitina, fosfolipomanana, glucuronoxylomanana, manana, galactomanana e β glucana, sendo a última

capaz de aumentar a expressão dos TLRs, incluindo 2 e 4. Acredita-se que as moléculas capazes de serem reconhecidas pelos TLRs, aumentando sua expressão, encontrem-se protegidas na parede celular do fungo e somente sejam reconhecidas em homogeneizados, onde a estrutura do fungo não é preservada. Assim somente moléculas capazes de inibir a resposta imune do fungo como as mananas seriam reconhecidas, em mecanismo de evasão desenvolvido pelo fungo (García-Madrid et al., 2011).

O estudo de García-Madrid et al. (2011) verificou ainda que ao serem expostos ao conídeo íntegro ocorreria uma diminuição na expressão dos TLRs, em especial TLR2 e 6, e dos peptídeos antimicrobianos já relacionados a expressão dos TLRs em trabalhos anteriores. Não foi observada, entretanto, a diminuição na expressão do TLR4 (García-Madrid et al., 2011).

Na casuística do nosso estudo verificamos, inicialmente na camada superficial da epiderme, uma diminuição na expressão do TLR4, mas não do TLR 2. O que pode se justificar por tratar-se de estudo, *in vivo*, enquanto García-Madrid et al. (2011) estudaram queratinócitos em cultura de células, onde não se tem preservada a arquitetura da epiderme. Esta diminuição foi verificada ao se comparar os controles sadios com os indivíduos com dermatofitose, em todas as formas clínicas em estudo. Não houve diferença no comportamento dos pacientes com dermatofitose extensa ou localizada neste grupo (gráficos 3 e 4). Talvez uma maior casuística possa demonstrar uma diferença no comportamento destas duas apresentações ou ainda

talvez a maior extensão de lesão em um dos grupos possa estar relacionada a diferença na ativação de outros receptores, já relacionados a imunomodulação em doenças fúngicas como DC-SIGN e dectin-2 (Serrano-Gómez et al., 2005; Sato et al., 2006).

Embora não seja o objetivo deste estudo identificar a molécula do *T. rubrum* capaz de ser reconhecida e diminuir a expressão destes receptores, especula-se que enzimas proteolíticas e as mananas do *T. rubrum* possam estar envolvidas, em analogia à modulação da resposta imune, via TLRs, que ocorre através de moléculas como a fosfolipomanana e a glucuronoxylomanana, na infecção por *Candida sp.* e *Cryptococcus neoformans*, respectivamente (Netea et al., 2003; Romani, 2004; Willment, Brown, 2008).

Todavia é consenso que a imunomodulação desencadeada por dermatófitos depende não apenas das moléculas fúngicas apresentadas no curso da infecção, mas também da maneira como são detectados pelo hospedeiro (Mignon et al., 2008). O zymosan, derivado da parede celular das leveduras, por exemplo, embora seja um indutor de citocinas pró-inflamatórias, foi recentemente identificado como indutor de CDs reguladoras da tolerância imunológica, via TLR2 e Dectin 1 e mediando à liberação da IL10 (Dillon et al., 2006).

Esta tentativa de conter o dano tissular explica a preservação da expressão do TLR 2 na epiderme superficial, a fim de limitar a inflamação e preservar a estrutura da epiderme. Em um estudo experimental, *in vitro*

ocorre aumento da expressão destes receptores após estímulo com agonistas, diminuindo a permeabilidade da junção dermo-epidérmica, avaliada indiretamente através da resistência transepitelial elétrica, sendo os resultados interpretados como manutenção da integridade da barreira mecânica (Yuki et al., 2011) Observou-se, neste caso, aumento da função de barreira epidérmica imediatamente após estímulo dos TLRs 1-6 e 9, cerca de 3 horas após, coincidindo com o período de maior adesão do conídeo do *Trichopyton rubrum*. Especial atenção foi dado ao TLR 2, pela localização preferencialmente na camada granulosa, e verificou-se que sua inibição aumenta a permeabilidade da barreira cutânea e que o aumento de sua expressão coincide com aumento de moléculas presentes na estrutura juncional como ocludina e claudina (Yuki et al., 2011).

A persistência do estímulo do TLR2 pode, entretanto, possibilitar a propagação na pele e invasão do dermatófito, com a produção de IL10 e diminuição da resposta adaptativa protetora Th1 (Lilic et al., 1996; Lilic, Gravenor, 2001).

Em candidíase, como dito anteriormente, esta incompleta resposta Th1 ocorre pela inadequada diferenciação das células dendríticas a partir dos monócitos. Embora ambas sejam capazes de polarizar as células T *naïve* para Th1, observou-se em estudo experimental que monócitos após fagocitarem leveduras não são capazes de se diferenciar em CD, diferenciando-se em macrófagos. Enquanto as pseudo-hifas induzem a

diferenciação de monócitos em células dendríticas, com fenótipo atípico e baixa capacidade de induzir Th1 (Nisini et al., 2007).

O β -glucan também tornaria os monócitos infectados incapazes de se diferenciarem em células dendríticas funcionais para apresentação do antígeno às células T. Sua localização na parede celular de hifas, mas não na de leveduras reforça a hipótese de sua participação na evasão do sistema imune (Nisini et al., 2007).

Em modelos experimentais de candidíase disseminada a menor expressão do TLR4 diminui as citocinas liberadas pelos queratinócitos e a proteína inflamatória macrofágica (MIP 2), levando ao recrutamento deficiente de macrófagos, contudo não se alteram a capacidade fungicida dos fagócitos e a liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF α e IL 1 β , sendo as últimas citocinas dependentes do TLR2 (Netea et al., 2004b).

Acumula-se então, evidências que o TLR4 ativa a produção de citocinas inflamatórias e recrutamento de neutrófilos, enquanto o TLR2 induz resposta Th2 (Netea et al., 2004b).

Em analogia ao que ocorre na candidíase a diminuição da expressão na epiderme superficial principalmente de TLR4 poderia diminuir a produção de citocinas inflamatórias e o recrutamento de neutrófilos, justificando a o aspecto pouco inflamatório das lesões por *T rubrum*. E ainda a manutenção da resposta Th2, induzida por TLR2, seria inefetiva para destruição do fungo e explicaria a cronicidade e a extensão das lesões.

Embora nesta amostra não tenha sido possível demonstrar diferença na expressão na epiderme superficial dos TLR 2 e 4, o que poderia justificar a apresentação clínica como dermatofitose localizada ou extensa. Talvez um aumento na casuística possa confirmar ou descartar esta hipótese, o que não foi possível até o momento por se tratar de estudo realizado no nosso hospital, o qual é um centro de encaminhamento de casos de alta complexidade, com restrição à livre e espontânea demanda de indivíduos com clínica de dermatofitose, sem tratamento prévio, e sem comorbidades associadas.

Outro dado observado nesta amostra, ainda na epiderme superficial, é que não houve diferença na expressão dos TLRs 2 e 4, comparativamente entre as áreas sã e lesada, nos indivíduos com dermatofitose, analisando os grupos de maneira independente. Isto torna menos provável que fatores fúngicos, exclusivamente, possam ser responsáveis por esta imunodepressão, considerando que ao exame histoquímico comprovou-se a ausência de fungos ou partes deles, bem como a conservação da arquitetura da epiderme na área sã destes indivíduos.

Na epiderme profunda onde se encontra na literatura expressão preferencial dos TLRs 2 e 4, encontramos uma diminuição da expressão dos TLRs 2 e 4, comparativamente aos controles sadios (Baker et al., 2003; Begon et al., 2007).

Novamente não houve diferença na expressão destes receptores ao se comparar indivíduos com dermatofitose extensa e localizada, provavelmente

não se encontrando na expressão dos TLRs 2 e 4 a justificativa para maior extensão da lesão em alguns casos.

Considerando que a resposta imune do indivíduo construa-se em um balanço entre um padrão Th1/Th2 de resposta, e que o TLR 2 relacione-se a perfis Th2, que são ineficientes na resposta antifúngica, foi interessante observar no nosso estudo, que nas camadas profundas da epiderme também o TLR2 se encontrou menos expresso, pois uma persistência no predomínio de resposta Th2 poderia resultar em lesões invasivas e crônicas, com inibição da resposta Th1 efetiva e aumento de citocinas anti-inflamatórias para controlar o dano tissular.

Além disto, em candidíase existe um estímulo a resposta Th17 de memória, via TLR2 (Bourgeois et al., 2010). E ainda ativação das células Treg, via IL10, o que pode suprimir a resposta inflamatória facilitando a ocorrência de candidíase disseminada, mas também pode ser benéfica em mucosas onde existe o comensalismo. Assim é essencial que haja equilíbrio (Weindl et al., 2010).

Na periferia da lesão em indivíduos com dermatofitose localizada ocorre maior expressão de TLR2 do que na área propriamente lesada do mesmo indivíduo, especula-se que isto caracterize uma tentativa de controlar o dano tissular e manter íntegra a barreira mecânica para limitar a extensão da lesão.

Experimentalmente a literatura demonstra que o principal braço eferente da resistência imunológica à infecção fúngica é o linfócito T, que

não sofre influência pela administração de anticorpos específicos. Aparentemente, a cinética da resposta imune em seres humanos seria similar: durante a infecção observa-se o desenvolvimento tanto de reação cutânea de hipersensibilidade tardia à tricofitina, quanto resposta blastogênica dos linfócitos T com a evolução para cura, relacionando-se a cronicidade à resposta imune celular incompleta semelhante ao que ocorre na *Tinea imbricata* (Hay et al, 1983).

Em um estudo brasileiro observou-se que assim como o *Aspergillus* e a *Candida*, o *Paracoccidioides brasiliensis* através dos TLRs 2 e 4, pode utilizar o sistema imune do hospedeiro para garantir sua sobrevivência. Através de interação com TLR4 em neutrófilos, invade a célula e evita o sistema imune do hospedeiro (Acorci-Valério et al., 2010).

As diversas formas de ativação do sistema imune, nos diferentes tempos da invasão fúngica, a diversidade de moléculas presentes na parede fúngica, capazes de ativar de modo diferente o sistema imune são fatores que em parte, explicam a complexidade desta interação patógeno/hospedeiro, onde aparentemente o comportamento do fungo e do sistema imune do hospedeiro é ainda mais complexo, dependendo do delicado equilíbrio entre a imunomodulação, tolerância e resposta inflamatória. Assim ainda existem diversas questões não elucidadas nesta cascata de eventos imunes entre o hospedeiro e o agente fúngico.

7 CONCLUSÕES

Concluiu-se que a expressão dos TLRs 2 e 4 nos queratinócitos dos doentes portadores de dermatofitoses encontra-se diminuída em relação ao grupo controle, independente da apresentação clínica.

Assim pode-se afirmar baseado nos achados desta casuística que:

1. **Não houve qualquer diferença estatisticamente significativa ao compararmos os indivíduos com dermatofitose localizada e extensa entre eles.** O aumento da casuística e a investigação de novos receptores envolvidos pode ser realizada para definir a razão de alguns indivíduos evoluírem para forma extensa e outros não, sem que haja nenhuma imunodepressão primária ou secundária associada.
2. **Em relação ao grupo controle encontramos a expressão de TLR4 diminuída tanto na epiderme superficial quanto profunda.** Assim encontram-se comprometidas tanto a resposta imunológica inata quanto a celular efetiva. Não foi o objetivo deste estudo identificar a molécula fúngica capaz de orquestrar esta imunomodulação ou outros PRRs que possam estar envolvidos na evolução clínica para cura ou cronicidade destas lesões.
3. **Ainda em relação ao grupo controle a expressão de TLR 2 encontra-se diminuída apenas na epiderme profunda em dermatofitoses extensas.** A manutenção da expressão do TLR2 nos mesmos níveis de indivíduos normais, na epiderme superficial, permitirá a manutenção da adesão entre os

corneócitos e da barreira cutânea, impedindo assim a disseminação e a invasão do fungo.

A diminuição da expressão de TLR2 e TLR4 requer posterior estudo da expressão gênica para elucidar se ocorre por consumo ou pela presença de sinalização inibitória.

4. **A comparação da expressão de TLR 4 na epiderme sã e lesada dos indivíduos com dermatofitose localizada ou extensa não evidenciou nenhuma diferença.** A diminuição do TLR 2 e 4 tanto em área lesada quanto em área sadia, indiferentemente, pode sugerir que fatores da imunidade do indivíduo sejam mais importantes que fatores relacionados a imunomodulação local exercida pelo fungo, já que não há na pele sã fungos íntegros ou parte deles, ou qualquer alteração estrutural da epiderme que justifique esta diminuição na expressão
5. **No grupo com dermatofitose localizada houve menor expressão de TLR2 na epiderme lesada do que na sã dos indivíduos.** O que se explica pela necessidade de preservar a resposta Th2 na área periférica à lesão, impedindo assim o dano tecidual que poderia facilitar a disseminação e invasão do dermatófito, justificando assim o aspecto limitado destas lesões.
6. Não houve predomínio da expressão destes receptores na epiderme superficial ou profunda em qualquer um dos grupos.

Assim o presente estudo é pioneiro *in vivo*, na avaliação da expressão dos TLRs 2 e 4 em indivíduos com dermatofitose. Recentemente dois outros estudos experimentais foram publicados, um deles em cultura de células onde se verificou também a diminuição da expressão do TLR2 quando exposto a conídeos de *T. rubrum* íntegros, mas não houve alteração na expressão do TLR4 nesta casuística, possivelmente porque a arquitetura da epiderme e a co-estimulação com outros receptores possam estar envolvidas.

8 PERSPECTIVAS

A identificação dos fatores envolvidos na resposta imune do indivíduo frente aos dermatófitos poderá permitir não somente o conhecimento exato da fisiopatogenia da infecção fúngica, mas também o desenvolvimento de agonistas para uso terapêutico que possam facilitar o tratamento desta infecção.

Assim permanecem algumas dúvidas:

(i) Quais elementos do dermatófito são capazes de modular a expressão dos TLRs 2 e 4?

(ii) Quais são os outros PRRs envolvidos na resposta imune ao dermatófito que possam justificar as várias nuances da mesma doença?

Anexo I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1.NOME DO PACIENTE:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO:..... Nº APTO:

BAIRRO:..... CIDADE:.....

CEP:.....TELEFONE: DDD (.....).....

2.RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO:..... Nº..... APTO:

BAIRRO: CIDADE:.....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “Análise da expressão dos receptores toll-like 2 e 4 nos queratinócitos nos doentes portadores de dermatofitoses localizadas e dermatofitoses extensas causadas por *Trichophyton rubrum*.”

2. PESQUISADOR: Prof. Dr. Paulo Ricardo Criado.

CARGO/FUNÇÃO: Médico, LIM 53 HC-FMUSP.

UNIDADE DO HCFMUSP: LIM-53 Departamento de Dermatologia.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO RISCO MÍNIMO **x** RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses

**III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE
OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA
CONSIGNANDO:**

1. Justificativas e os objetivos da pesquisa:

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa clínica, que tem como objetivo o estudo da resposta do sistema de defesa do organismo humano (sistema imune) frente à infecção por fungos na pele (dermatofitoses).

Antes de tomar uma decisão é importante que você compreenda porque esta pesquisa clínica está sendo realizada e o que ela envolverá. Por favor, leia com atenção este documento, faça as perguntas que desejar e pense bem antes de concordar.

Sinta-se à vontade para perguntar sobre quaisquer dúvidas ou para pedir maiores informações ao seu médico antes de tomar uma decisão sobre sua participação. Se, após a leitura destas informações, você não concordar em participar da pesquisa, não haverá qualquer prejuízo quanto ao seu tratamento.

Se você escolher participar, você poderá retirar seu consentimento a qualquer momento e deixará de participar do estudo, sem que haja qualquer prejuízo quanto à continuidade de seu tratamento pelo mesmo hospital, devendo apenas informar ao médico responsável o motivo que o levou a se retirar do estudo.

O objetivo deste estudo é verificar a resposta do sistema de defesa do organismo humano (sistema imune) frente à infecção por fungos na pele (dermatofitoses), através da realização de biópsias (retirada de fragmento de pele) na área doente e em área vizinha sã para fins comparativos, tais amostras serão posteriormente analisadas. É importante ressaltar que a realização destas biópsias se dará exclusivamente para realização deste protocolo, não sendo este procedimento habitual para diagnóstico e tratamento de dermatofitoses.

- 2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais:**

Se você decidir participar e assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, você responderá a um questionário sobre sua doença e, após, será submetido ao exame para micose (estudo micológico), que será colhido por raspagem da pele obtendo-se escamas para o exame. Confirmada a presença de fungos, procederemos à retirada de fragmentos de pele para estudos.

- 3. Desconfortos e riscos esperados:**

Uma vez que será feita, raspagem para pesquisa de fungos você poderá experimentar o leve desconforto momentâneo deste processo. A coleta de amostras de pele para biópsia causará desconforto, dor e ardor moderados e transitórios devido a perfuração da pele com agulha e injeção local de substância a fim de realizarmos anestesia. Após a retirada de fragmento de pele será realizada sutura que poderá

ocasionar coceira e dor leve nos sete dias seguintes, com formação de crosta e posterior cicatrização, deixando no local algumas vezes mancha escurecida transitória ou cicatriz discreta transitória ou definitiva. Em alguns poucos casos, dependendo da característica individual de cicatrização, poderá haver demora na cicatrização e até mesmo desenvolvimento de infecção local, que deverá ser tratada com antibiótico tópico ou sistêmico. Caso estes desconfortos lhe ocorram de maneira intensa, você poderá procurar o a médica Cristiane Beatriz de Oliveira, para tratamento, sem custo algum.

4. Benefícios que poderão ser obtidos:

Uma vez se descobrindo que seu problema de pele representa uma micose serão adotados procedimentos de tratamento para abreviar o tempo da doença. O estudo desta freqüente doença algumas vezes de difícil resolução definitiva e ainda com aspectos pouco estudados pela medicina poderá contribuir para o melhor manejo da mesma.

5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo:

A biópsia de pele se dará para realização deste estudo, não se tratando de procedimento habitualmente necessário para o diagnóstico de sua doença. A não realização da mesma não acarretará prejuízo ao seu tratamento; caso você decida não participar deste estudo; seu médico poderá informá-lo.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas:

Você tem o direito de questionar o médico responsável pelo acompanhamento de seu caso a qualquer momento, no sentido de esclarecer todas as dúvidas decorrentes do estudo em questão, sejam elas relacionadas com os riscos, benefícios ou quaisquer outros assuntos ligados a este estudo e com o tratamento da doença que o afete. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos e deveres durante a participação no estudo, você deve esclarecê-los com o seu médico.

2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência:

Você poderá retirar seu consentimento, a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que haja qualquer prejuízo quanto à continuidade de seu tratamento pela mesma instituição, devendo apenas informar ao médico responsável o motivo que o levou a abandonar o estudo, para que esta informação conste na avaliação global dos resultados obtidos com todos os pacientes.

O médico responsável também poderá solicitar que você seja excluído do estudo se você a qualquer momento apresentar um dos critérios de exclusão.

3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade:

Em hipótese alguma você terá sua identidade divulgada para outras pessoas ou entidades, além daquelas que participam efetivamente do acompanhamento deste estudo. Estarão, também, mantidas em sigilo todas as informações obtidas e que estejam relacionadas com a sua privacidade e não será possível sua identificação através de fotografias.

4. Disponibilidade de assistência no HC-FMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa:

Em caso de eventuais danos à sua saúde, o Hospital das Clínicas da FMUSP ficará a sua disposição, tanto para realização de exames, bem como de internação em caso de alguma gravidade.

5. Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa:

Em caso de eventuais danos à sua saúde, o Hospital das Clínicas da FMUSP ficará a sua disposição para os procedimentos adequados, sem qualquer ônus de sua parte.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Cristiane Beatriz de Oliveira

Telefone celular 24 horas: 034 99762362

Dr. Paulo Ricardo Criado

Telefone celular 24 horas: 8121-2837

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, de de 20 .

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Assinatura do pesquisador

Anexo II**PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS**

Análise da Expressão dos Receptores Toll-like 2 e 4 nos Queratinócitos nos Doentes Portadores de Dermatofitoses Localizadas e Dermatofitoses Extensas

NOME DO PACIENTE:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:..... **SEXO :** M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:...../...../.....

Grupo Étnico: Branco ☐, Negro ☐, Amarelo ☐.

Profissão:.....

Natural de:.....

ENDEREÇO:..... **Nº**..... **APTO:**.....

BAIRRO:..... **CIDADE:**.....

CEP:..... **TELEFONE:** DDD (.....).....

Questionário:

1. Antecedentes de Atopia:

- **pessoais:** Rinite ☐, Asma ☐, Dermatite Atópica ☐
- **familiares:** Rinite ☐, Asma ☐, Dermatite Atópica ☐
- **Pai:** Rinite ☐, Asma ☐, Dermatite Atópica ☐
- **Mãe:** Rinite ☐, Asma ☐, Dermatite Atópica ☐

2. Presença de Imunodeficiência Primária: Sim ☐, Não ☐

3. Presença de Imunodeficiência Secundária: Sim ☐, Não ☐

HIV: Não ☐; diabetes melito: Não ☐; doença de Cushing: Não ☐; uso de drogas imunossupressoras: Não ☐; hepatopatia crônica: Não ☐; nefropatia crônica: Não ☐.

4. Gestação: Sim ☐, Não ☐

5. Déficit intelectual ou de cognição: Sim ☐, Não ☐

6. Micológico direto:

- (borda ativa): _____
- (centro da lesão): _____
- (pele aparentemente sã): _____

7. Cultura para fungos positiva (borda ativa):

Sim: *T. rubrum* ☐ _____

Outros: _____

8. Número de segmentos corporais acometidos pela dermatofitose:
Quais? _____

Assinalar extensão das lesões

9. Dados de História e Tempo de Evolução:

10. Presença de Prurido: Sim ☐; Não ☐.

11. Fotografia das Lesões: Sim ☐; Não ☐.

12. Fotografia da Cultura para Fungos: Sim ☐; Não ☐.

13. Tratamentos anteriores: Sim ☐; Não ☐.

14. Realização de biópsia:

- (borda ativa): Sim ☐; Não ☐ Data: __/__/__
- (centro da lesão): Sim ☐; Não ☐ Data: __/__/__
- (pela aparentemente sã): Sim ☐; Não ☐ Data: __/__/__

- Descrição de anátomo-patológico corado pela hematoxilina-eosina:

- Descrição de anátomo-patológico corado pelo PAS:

- Descrição de análise imuno-histoquímica:

Anexo 3

Descrição das lâminas dos portadores de dermatofitoses em estudo,
coradas pela hematoxilina-eosina e PAS

	Pele lesada	Pele sã	Grupo
Paciente 1	DPV PAS: N	Normal PAS: N	DL
Paciente 2	DPV PAS: N	Normal PAS: N	DL
Paciente 3	DPV PAS: N	Normal PAS: N	DL
Paciente 4	DP PAS: N	Normal PAS: N	DL
Paciente 5	DPV/DPig PAS: N	Normal PAS: N	DL
Paciente 6	MSF PAS: hifas na córnea	Normal PAS: N	DL
Paciente 7	DPV PAS: N	Normal PAS: N	DL
Paciente 8	MSF PAS: hifas na córnea	Normal PAS: N	DL

Paciente 1	MSF PAS: hifas na córnea	Normal PAS: N	DE
Paciente 2	DPV PAS: N	Normal PAS: N	DE
Paciente 3	MSF PAS: hifas na córnea	Normal PAS: N	DE
Paciente 4	Espongiose PAS: N	Normal PAS: N	DE
Paciente 5	DPV PAS: N	Normal PAS: N	DE
Paciente 6	DPV PAS: N	Normal PAS: N	DE
Paciente 7	MSF PAS: hifas e esporos numerosos	Normal PAS: N	DE

Considere DE: pacientes com dermatofitose extensa, DL: pacientes com dermatofitose localizada, N: negativo, DPV: dermatite perivascular, DP: dermatite psoriasiforme, MSF: micose superficial filamentosa, DPig: derrame pigmentar

Nota: Todos os pacientes incluídos como controles apresentavam epiderme com estrutura conservada após coloração com hematoxilina-eosina.

10 BIBLIOGRAFIA

Acorci-Valério MJ, Bordon-Graciani AP, Dias-Melicio LA, de Assis Golim M, Nakaira-Takahagi E, de Campos-Soares AM. Role of TLR2 and TLR4 in human neutrophil functions against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Scand J Immunol*. 2010; 71(2):99-108.

Allen DE, Snyderman R, Meadows L, Pinnell SR. Generalized *Microsporium audouinii* infection and depressed cellular immunity associated with a missing plasma factor required for lymphocyte blastogenesis. *Am J Med*. 1977; 63(6): 991-1000.

Almeida SR. Immunology of dermatophytosis. *Mycopathologia*. 2008; 166(5-6):277-83.

Arancibia SA, Beltrán CJ, Aguirre IM, Silva P, Peralta AL, Malinarich F, Hermoso MA. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol Res*. 2007; 40(2):97-112.

Baker BS, Ovigne JM, Powles AV, Corcoran S, Fry L. Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: modulation of TLR expression in chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol*. 2003; 148(4):670-9.

Baldo A, Tabart J, Vermout S, Mathy A, Collard A, Losson B, Mignon B. Secreted subtilisins of *Microsporium canis* are involved in adherence of arthroconidia to feline corneocytes. *J Med Microbiol*. 2008; 57(9):1152-6.

Baroni A, Orlando M, Donnarumma G, Farro P, Iovene MR, Tufano MA, Buommino E. Toll-like receptor 2 (TLR2) mediates intracellular signalling in

human keratinocytes in response to *Malassezia furfur*. *Arch Dermatol Res*. 2006; 297(7):280-8.

Begon E, Michel L, Flageul B, Beaudoin I, Jean-Louis F, Bachelez H, Dubertret L, Musette P. Expression, subcellular localization and cytokinin modulation of Toll-like receptors (TLRs) in normal human keratinocytes: TLR2 up-regulation in psoriatic skin. *Eur J Dermatol*. 2007; 17(6):497-506.

Berk SH, Penneys NS, Weinstein GD. Epidermal activity in annular dermatophytosis. *Arch Dermatol*. 1976; 112(4):485-8.

Blake JS, Dahl MV, Herron MJ, Nelson RD. An immunoinhibitory cell wall glycoprotein (mannan) from *Trichophyton rubrum*. *J Invest Dermatol*. 1991; 96(5):657-61.

Bourgeois C, Majer O, Frohner IE, Tierney L, Kuchler K. Fungal attacks on mammalian hosts: pathogen elimination requires sensing and tasting. *Current Opinion in Microbiology*. 2010; 13(4):401-8.

Brouta F, Descamps F, Vermout S, Monod M, Losson B, Mignon B. Humoral and cellular immune response to a *Microsporum canis* recombinant keratinolytic metalloprotease (rMEP3) in experimentally infected guinea pigs. *Med Mycol*. 2003; 41(6):495-501.

Cairns JA, Walls AF. Mast cell tryptase is a mitogen for epithelial cell. Stimulation of IL-8 production and intercellular adhesion molecule-1 expression. *J Immunol*. 1996; 156(1):275-83.

Calderon RA. Immunoregulation in dermatophytosis. *Crit Rev Microbiol*. 1989; 16(5):339-68.

Campos MR, Russo M, Gomes E, Almeida SR. Stimulation, inhibition and death of macrophages infected with *Trichophyton rubrum*. *Microbes Infect*. 2006; 8(2):372-9.

Cassone A. Fungal vaccines and vaccination: problems and perspectives. In: Brown GD, Netea MG, editors. Immunology of fungal infections. Heidelberg: Springer, 2007. :465-85.

Chai LYA, Kullberg BJ, Vonk AG, Warris A, Cambi A, Latgé J-P, Joosten LAB, Van Der Meer JWM, Netea MG. Modulation of toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 responses by *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity*. 2009; 77(5):2184-92.

Criado PR, Oliveira CB, Dantas KC, Takiguti FA, Benini LV, Vasconcellos C. Micoses superficiais e os elementos da resposta imune. *An Bras Dermatol*. 2011; 86(4):726-31.

Cristofaro P, Opal SM. Role of Toll-like receptors in infection and immunity: clinical implications. *Drugs*. 2006; 66(1):15-29.

Custódio ATN. Análise de imagens de imunohistoquímica da placenta e do pulmão usando segmentação e descritores de forma. Universidade de Pernambuco. Recife-Novembro de 2009. Disponível www.poli.br.

de Moraes-Vasconcelos D, Orii NM, Romano CC, Iqueoka RY, Duarte AJ. Characterization of the cellular immune function of patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *Clin Exp Immunol*. 2001; 123(2):247-53.

Dillon S, Agrawal S, Banerjee K, Letterio J, Denning TL, Oswald-Richter K et al. Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J Clin Invest*. 2006; 116(4):916-28.

Diniz SN; Normizo R; Cisalpino PS; Teixeira MM; Brown GD; Mantovani A; Gordon S; Reis LF, and Dias AA. PTX3 function as an opsonin for the dectin1-dependent internalization of zymosan by macrophages. *J Leukoc Biol*. 2004; 75 (4): 649-56.

Ermertcan AT, Öztürk F, Gündüz K. Toll-like receptors and skin. *JEADV*. 2011; 25(9):997-1006.

Ferreira KS, Bastos KR, Russo M, Almeida SR. Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and pulmonary dendritic cells induces Interleukin10 production and Toll-like receptor 2 expression: possible mechanisms of susceptibility. *J Infect Dis*. 2007; 196(7):1108-15.

Ferreira-Nozawa MS, Silveira HCS, Ono CJ, Fachin AL, Rossi A, Martinez-Rossi NM. The pH signaling transcription factor PacC mediates the growth of *Trichophyton rubrum* on human nail in vitro. *Med Mycol*. 2006; 44(7):641-5.

Findling JW, Tyrrel JB, Aron DC, Fitzgerald PA, Young CW, Sohnle PG. Fungal infections in cushing's syndrome. *Ann Intern Med*. 1981; 95(3):392.

García-Madrid LA, Huizar-López M del R, Flores-Romo L, Islas-Rodríguez AE. *Trichophyton rubrum* manipulates the innate immune functions of human keratinocytes. *Cent Eur J Biol.* 2011; 6(6): 902-10.

Godoy-Martinez P, Nunes FG, Tomimori-Yamashita J, Urrutia M, Zaror L, Silva V, Fischman O. Onychomycosis in Sao Paulo, Brazil. *Mycopathologia.* 2009; 168(3):111-6.

Grappel SF, Bishop CT, Blank F. Immunology of Dermatophytes and Dermatophytosis. *Bacteriological reviews.* 1974; 38(2):222-50.

Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses.* 2008; 51(4):2-15.

Hay RJ, Calderon RA, Mackenzie CD. Experimental dermatophytosis in mice: correlation between light and electron microscopic changes in primary, secondary and chronic infections. *Br J Exp Pathol.* 1988; 69(5):703-16.

Hay RJ, Reid S, Talwat E, Macnamara K. Immune responses of patients with *Tinea imbricata*. *Br J Dermatol.* 1983; 108(5):581-6.

Hay RJ. Chronic dermatophyte infections. I. Clinical and mycological features. *Br J Dermatol.* 1982; 106(1):1-7.

Hay RJ. Dermatophytosis and other superficial mycosis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and practice of infectious diseases.. 4th ed. New York: Churchill Livingstone, 1995: 2375-86.

Jensen JM, Pfeiffer S, Akaki T, Schröder JM, Kleine M, Neumann C, Proksch E, Brasch J. Barrier function, epidermal differentiation, and human beta-defensin 2 expression in *tinea corporis*. *J Invest Dermatol*. 2007; 127(7):1720-7.

Jones HE, Reinhardt JH, Rinaldi MG. Acquired immunity to dermatophytes. *Arch Dermatol*. 1974; 109(6): 840-8.

Jouault T, Ibata Ombetta S, Takeuchi O, Trinel PA, Sacchetti P, Lefebvre P, Akira S, Poulain D. *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll like receptors. *J Infect Dis*. 2003; 188(1):165-72.

Kang SS, Kauls LS, Gaspari AA. Toll-like receptors: applications to dermatologic disease. *J Am Acad Dermatol*. 2006; 54(6):951-83.

Kaufman G, Berdicevsky I, Woodfolk JÁ, Horwitz BA. Markers for host-induced gene expression in *Trichophyton* dermatophytosis. *Infect Immun*. 2005; 73(10):6584-90.

Kawai K, Shimura H, Minagawa M, Ito A, Tomiyana K, Ito M. Expression of functional toll-like receptor 2 on human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci*. 2002; 30(3):185-94.

Keogh B, Parker AE. Toll-like receptors as targets for immune disorders. *Trends Pharmacoll Sci*. 2011; 32(7):435-42.

King RD, Khan HA, Foye JC, Greenberg JH, Jones HE. Transferrin, iron, and dermatophytes. I. Serum dermatophyte inhibitory component definitively identified as unsaturated transferrin. *J Lab Clin Med.* 1975; 86(2):204-12.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT (Eds). Tratado de Micologia Médica Lacaz. p. 252-352, p. 918-997. 9ª Ed. Sarvier Ed. de Livros Médicos Ltda. São Paulo. 2002.

Léchenne B, Reichard U, Zaugg C, Fratti M, Kunert J, Boulat O, Monod M. Sulphite efflux pumps in *Aspergillus fumigatus* and dermatophytes. *Microbiology.* 2007;153(Pt 3):905-13.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 1996; 86(6):973-83.

Leng W, Liu T, Li R, Yang J, Wei C, Zhang W, Jin Q. Proteomic profile of dormant *Trichophyton rubrum* conidia. *BMC Genomics.* 2008; 9:303. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/9/303>. 11 páginas.

Li M, Chen Q, Shen Y, Liu W. *Candida albicans* phospholipomannan triggers inflammatory responses of human keratinocytes through Toll-like receptor 2. *Exp Dermatol.* 2009.18(7):603-10.

Li Y, Chen J, Wan MJ, Lai, W, Zheng Y, Li MR, Chen RZ, Li XX. The immune response of human keratinocytes to *Trichophyton rubrum* conidia is partially mediated by toll-like receptor 2, 4, dectin-1 e cytokines. *J South Med Univ.* 2011; 31(4): 678-81.

Lilic D, Cant AJ, Abinun M, Calvert JE, Spickett GP. Chronic mucocutaneous candidiasis: I. Altered-antigen stimulated IL-2, IL-4, IL-6 and IFN-gamma production. *Clin Exp Immunol*. 1996; 105(2):205-12.

Lilic D, Gravenor I. Immunology of chronic mucocutaneous candidiasis. *J Clin Pathol*. 2001; 54(2):81-3.

López-García B, Lee PH, Gallo RL. Expression and potential function of cathelicidin antimicrobial peptides in dermatophytosis and *tinea versicolor*. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 57(5):877-82.

MacGregor JM, Hamilton A, Hay RJ. Possible mechanisms of immune modulation in chronic dermatophytosis – an *in vitro* study. *Br J Dermatol*. 1992; 127: 233 – 8.

Maranhão FC, Paião FG, Martinez-Rossi NM. Isolation of transcripts over-expressed in human pathogen *Trichophyton rubrum* during growth in keratin. *Microb Pathog*. 2007; 43(4):166-72.

Martinez LR, Casadevall A. Specific antibody can prevent fungal biofilm formation and this effect correlates with protective efficacy. *Infect Immun*. 2005; 73(10):6350-62.

McInturff JE, Modlin RL, Kim J. The role of toll-like receptors in pathogenesis and treatment of dermatological disease. *J Invest Dermatol*. 2005; 125(1):1-8.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997; 388(6640):394-7.

Mignon B, Tabart J, Baldo A, Mathy A, Losson B, Vermout S. Immunization and dermatophytes. *Curr Opin Infect Dis*. 2008; 21(2):134-40.

Mignon BR, Coignoul F, Leclipteux T, Focant C, Losson BJ. Histopathological pattern and humoral immune response to a crude exoantigen and purified keratinase of *Microsporum canis* in symptomatic and asymptomatic infected cats. *Med Mycol*. 1999;37(1):1-9.

Miller LS, Modlin RL. Toll-like receptors in the skin. *Semin Immunopathol*. 2007; 29(1):15-26.

Miller LS, Sørensen OE, Liu PT, Jalian HR, Eshtiaghpour D, Behmanesh BE, Chung W, Starner TD, Kim J, Sieling PA, Ganz T, Modlin RL. TGF- α regulates TLR expression and function on epidermal keratinocytes. *J Immunol*. 2005; 174(10):6137-43.

Nakamura Y, Kano R, Hasegawa A, Watanabe S. Interleukin-8 and tumor necrosis factor alpha production in human epidermal keratinocytes induced by *Trichophyton mentagrophytes*. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002; 9(4):935-7.

Nestle FO, Di Meglio P, Qin J-Z, Nickoloff BJ. Skin Immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9:679-691.

Netea MG, Van der Graaf C, Van der Meer JWM, Kullberg BJ. Recognition of fungal pathogens by toll-like receptors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004a; 23(9):672-6.

Netea MG, Van der Meer JWM, Kullberg BJ. Toll-like receptors as an escape mechanism from the host defense. *Trends Microbiol*. 2004b; 12(11):484-8.

Netea MG, Warris A, Van der Meer JW, Fenton MJ, Verver-Janssen TJ, Jacobs LE, Andresen T, Verweij PE, Kullberg BJ. *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition during germination through loss of toll-like receptor-4-mediated signal transduction. *J Infect Dis*. 2003; 188(2):320-6.

Nisini R, Torosantucci A, Romagnoli G, Chiani P, Donati S, Gagliardi MC, Teloni R, Sargentini V, Mariotti S, Iorio E, Cassone A. β -glucan of *Candida albicans* cell wall causes the subversion of human monocyte differentiation into dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2007; 82(5): 1136–42.

Peres NTA, Maranhão FCA, Rossi A, Martinez-Rossi NM. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. *An Bras Dermatol*. 2010; 85(5):657-67.

Pivarcsi A, Bodai L, Réthi B, Kenderessy-Szabó A, Koreck A, Széll M, Beer Z, Bata-Csörgö Z, Magócsi M, Rajnavölgyi E, Dobozy A, Kemény L. Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int Immunol*. 2003; 15(6):721-30.

Rippon JW. The changing epidemiology and emerging patterns of dermatophyte species. *Curr Top Med Mycol*. 1985; 1:208-34.

Roeder A, Kirschning CJ, Rupec RA, Schaller M, Korting HC. Toll-like receptors and innate antifungal responses. *Trends Microbiol.* 2004; 12(1): 44-9.

Romani L. Immunity to fungal infections. *Nature Reviews Immunology.* 2004; 4(1):1-23.

Saijo S, Ikeda S, Yamabe K, Kakuta S, Ishigame H, Akitsu A et al. Dectin-2 recognition of α -mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. *Immunity.* 2010; 32(5):681-91.

Sato K, Yang XL, Yudate T, Chung JS, Wu J, Luby Phelps K et al. Dectin 2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses. *J Biol Chem.* 2006; 281(50):38854-66.

Seebacher C, Bouchara JP, Mignon B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia.* 2008; 166(5-6):335-52.

Serrano-Gómez D, Leal JA, Corbí AL. DC-SIGN mediates the binding of *Aspergillus fumigatus* and keratinophylic fungi by human dendritic cells. *Immunobiology.* 2005; 210(2-4):175-83.

Shervin WK, Ross TH, Rosenthal CM, Petrozzi JW. An immunosuppressive serum factor in widespread cutaneous dermatophytosis. *Arch Dermatol.* 1979; 115(5):600-4.

Shiraki Y, Ishibashi Y, Hiruma M, Nishikawa A, Ikeda S. Cytokine secretion profiles of human keratinocytes during *Trichophyton tonsurans* and *Arthroderma benhamiae* infections. *J Med Microbiol.* 2006; 55(Pt 9):1175-85.

Siqueira ER, Ferreira JC, Maffei CML, Candido RC. Occurrence of dermatophyte, in nails, feet and hands of university students. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006; 39(3):269-71.

Slunt JB, Taketomi EA, Woodfolk JA, Hayden ML, Platts-Mills TA. The immune response to *Trichophyton tonsurans*: distinct T cell cytokine profiles to a single protein among subjects with immediate and delayed hypersensitivity. *J Immunol.* 1996; 157(11):5192-7.

Song PI, Park Y-M, Abraham T, Harten B, Zivony A, Neparidze N, Armstrong CA, Ansel JC. Human keratinocytes express functional CD14 and toll-like receptor 4. *J Invest Dermatol.* 2002; 119(2):424-32.

Sugita K, Kabashima K, Atarashi K, Shimauchi T, Kobayashi M, Tokura Y. Innate immunity mediated by epidermal keratinocytes promotes acquired immunity involving Langerhans cells and T cells in the skin. *Clin Exp Immunol.* 2007; 147(1):176-83.

Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol.* 2004; 16(1): 3–9.

Tani K, Adachi M, Nakamura Y, Kano R, Makimura K, Hasegawa A, kanda N, Watanabe S. The effect of dermatophytes on cytokine production by human keratinocytes. *Arch Dermatol Res.* 2007; 299(8):381-7.

Uehara A, Sugawara S, Tamai R, Takada H. Contrasting responses of human gingival and colonic epithelial cells to lipopolysaccharides, lipoteichoic acids and peptidoglycans in the presence of soluble CD14. *Med Microbiol Immunol*. 2001; 189(4):185-92.

Vasconcelos DM, Collanieri AC, Santi TN, Bressani VO. O sistema imunológico e a pele. In Belda Jr W, Di Chiacchio N, Criado PR. Tratado de Dermatologia. São Paulo. Atheneu, 2010. v 1 cap 2 29-53.

Vermout S, Tabart J, Baldo A, Mathy A, Losson B, Mignon B. Pathogenesis of dermatophytosis. *Mycopathologia*. 2008; 166(5-6):267-75.

Wagner DK, Sohnle PG. Cutaneous defenses against dermatophytes and yeasts. *Clin Microb Rev*. 1995; 8(3):317-35.

Wang JE, Warris A, Ellingsen EA, Jørgensen PF, Flo TH, Espevik T, Solberg R, Verweij PE, Aasen AO. Involvement of CD14 and toll-like receptors in activation of human monocytes by *Aspergillus fumigatus* Hyphae. *Infection and Immunity*. 2001; 69(4):2402–6.

Weindl G, Wagener J, Schaller M. Epithelial Cells and Innate Antifungal Defense. *J Dent Res*. 2010; 89(7):666-75.

Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev*. 1995; 8(2):240-59.

Willment JA, Brown GD. C type lectin receptors in antifungal immunity. *Trends Microbiol*. 2008;16(1):27-32.

Woodfolk JA, Platts-Mills TA. The immune response to dermatophytes. *Res Immunol*. 1998; 149(4-5):436-45.

Woodfolk JA, Sung SS, Benjamin DC, Lee JK, Platts-Mills TA. Distinct human T cell repertoires mediate immediate and delayed-type hypersensitivity to the *Trichophyton* antigen, Tri r 2. *J Immunol*. 2000; 165(8):4379-87.

Woodfolk JA, Wheatley LM, Piyasena RV, Benjamin DC, Platts-Mills TA. *Trichophyton* antigens associated with IgE antibodies and delayed type Hypersensitivity. Sequence homology to two families of serine proteinases. *J Biol Chem*. 1998; 273(45):29489-96.

Yamasaki K, Kanada K, Macleod DT, Borkowski AW, Morizane S, Nakatsuji T, Cogen AL, Gallo RL. TLR2 expression is increased in rosacea and stimulates enhanced serine protease production by keratinocytes. Disponível em: www.jidonline.org (*J invest dermatol* advance online publication, 25 de November 2010).

Yuki T, Yoshida H, Akazawa Y, Komiya A, Sugiyama Y, Inoue S. Activation of TLR2 Enhances Tight Junction Barrier in Epidermal Keratinocytes. *J Immunol*. 2011; 187(6):3230-7.

Zhao J, Wu X. *Aspergillus fumigatus* antigens activate immortalized human corneal epithelial cell via Toll-like receptors 2 and 4. *Curr Eye Res.* 2008; 33(5): 447-54.