

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE DERMATOLOGIA

GRAZIELLE BARBOSA SANTANA

**Análise da resposta imunológica celular da via Th17 em
pacientes portadores de dermatofitose extensa e/ou
persistente causada pelo *Trichophyton rubrum***

São Paulo

2016

GRAZIELLE BARBOSA SANTANA

**Análise da resposta imunológica celular da via Th17 em
pacientes portadores de dermatofitose extensa e/ou
persistente causada pelo *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. Dewton de Moraes Vasconcelos

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Santana, Grazielle Barbosa

Análise da resposta imunológica celular da via Th17 em pacientes portadores de dermatofitose extensa e/ou persistente causada pelo *Trichophyton rubrum* / Grazielle Barbosa Santana. -- São Paulo, 2016.

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

Orientador: Dewton de Moraes Vasconcelos.

Descritores: 1.Imunidade 2.Células Th17 3.Tinha 4.Sistema imunológico
5.Testes imunológicos 6.*Trichophyton*

USP/FM/DBD-225/16

Nome: SANTANA, Grazielle Barbosa

Título: Análise da resposta imunológica celular da via Th17 em pacientes portadores de dermatofitose extensa e/ou persistente causada pelo *Trichophyton rubrum*

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

Programa de: Dermatologia

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico esta tese:

À todos os pacientes que, por consentirem, tornaram este trabalho possível;

Aos meus pais, Amorim e Gilda, pelo amor, pelos ensinamentos, pelas oportunidades, por serem meus exemplos, meus alicerces, minha inspiração;

Aos meus irmãos Gabrielle e Gabriel por serem meu apoio e por completarem a minha vida;

Aos meus amigos parceiros nesta jornada Alana Dias, Thiago Bezerra, Cleiton Alves, Glória Sousa, Yana Rosa, Luciana Bento, Roseli Freitas e Ricardo Spina;

Ao meu amor, André, pelo companheirismo e dedicação, pelo incentivo, pela confiança e por sempre estar ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Dewton de Moraes Vasconcelos por desde cedo ter acreditado em meu trabalho, me proporcionando as oportunidades e ferramentas fundamentais para meu desenvolvimento profissional e pessoal, por ser meu admirável orientador, por me guiar e incentivar para o desenvolvimento deste trabalho.

À Alana dos Santos Dias, pela extrema dedicação, apoio na realização deste projeto, pelo incentivo, por acreditar em meu trabalho, pela amizade, por me inspirar e ensinar a fazer ciência e pelas experiências compartilhadas.

Ao Dr. Thiago Bezerra, pela dedicação ativa no acompanhamento dos pacientes, pela orientação e paciência, pela amizade sincera e por permitir meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Dr. Mauricio Domingues Ferreira, pela amizade, apoio, incentivo e encorajamento, pelas discussões científicas, por acreditar no meu trabalho e me inspirar a fazer ciência.

Ao Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior, por ter me recebido em seu laboratório, pela orientação, dedicação, por acreditar em meu trabalho, por me oferecer as ferramentas fundamentais para meu desenvolvimento profissional e pessoal, por me inspirar e ensinar a fazer ciência.

Aos professores da Banca do Exame de Qualificação: Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior, Dr. Carlos Pelleschi Taborda e Dr. Sandro Rogério de Almeida pelas discussões valiosas, críticas às quais renderam sugestões que contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Paulo Ricardo Criado, por ter me recebido em seu ambulatório, pelo incentivo, transmissão de conhecimentos e convivência acadêmica.

Ao Prof. Dr. Gil Benard, por ter me recebido em seu laboratório, pelo incentivo, colaboração e pela transmissão de conhecimentos e convivência acadêmica.

À Dra. Maria da Glória Teixeira de Sousa, pelo apoio, incentivo, orientação nas discussões científicas, apoio na elaboração da tese.

À Roseli Freitas, por ter sido minha parceira desde o início deste projeto, pela amizade, dedicação, orientação, incentivo e pela troca de conhecimentos científicos.

Ao Cleiton Alves, pela amizade, apoio e incentivo, pela colaboração e transmissão de conhecimentos, por me guiar e incentivar para o desenvolvimento desse trabalho.

À Juliana Ruiz, pela amizade sincera, pelas experiências de bancada e vida compartilhada, pela dedicação, por me inspirar e contribuir para o meu crescimento em todos os aspectos.

Ao Dr. Jorge Kasseb, por todas as colaborações, amizade e apoio científico.

Ao Ricardo Spina, pela dedicação, orientação com os pacientes, por acreditar no meu trabalho, por me inspirar e me ensinar a fazer ciência.

À Iana Rosa Alves de Souza e Dra. Luciana Bento, pela amizade sincera, pelas experiências compartilhadas, por estarem envolvidas diretamente no meu crescimento profissional e pessoal.

À Susana Lima Lessa Lobo e Carolina Freggine, pelo apoio, discussões científicas, amizade, pelas experiências vividas que tanto contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao André Pinto Dias, pela extrema dedicação, apoio, pelo incentivo, por acreditar no meu trabalho, por me inspirar e por ser tão importante nos momentos mais cruciais.

À equipe médica do Ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo acolhimento, ensinamento contínuo, pela oportunidade de aprendizado, pela amizade e por todo o apoio concedido para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos integrantes do Laboratório de Micologia LIM53, por me acolherem e contribuírem para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Daniel Rocha Lopes, pelo incentivo, apoio, pela amizade, pelo tratamento gentil aos pacientes e por permitir meu crescimento profissional e pessoal.

Aos amigos do LIM56, Dr. Alexandre Almeida, Dra. Liã Bárbara Arruda, Dra. Paula Rigato, Soraya Ogusuku, Wanessa Cardoso da Silva, Tatiana Mitiko, Dr. Bosco Christiano Maciel da Silva, pela amizade e apoio direto e indireto no desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria, suporte técnico e limpeza do LIM56 que nos ajudam e apoiam em todos os momentos: Lúcio Martins, Cleber Braff Cardoso, Andersom Gaspar, Luiz Abraão, Edna Reis, Juliana Pisok, Ângelo Tiago, Silvia Maria de Araújo Castro.

Aos meus pais, cujo amor dedicado torna-me uma pessoa cada dia melhor, por me incentivarem, me apoiarem, por serem minha fortaleza, por estarem próximos a mim a cada passo dado em minha vida. Aos meus irmãos Gabrielle e Gabriel que sempre estão em minha vida, me apoiando, me incentivando e torcendo por mim.

Aos familiares de André Pinto Dias, pelo apoio, incentivo, por acreditarem no meu trabalho, pela amizade, pelos eternos aprendizados, em especial ao Carlos Alberto Dias, Roseli Macedo Dias e Selma Pinto.

A todos os pacientes envolvidos neste projeto, que consentiram a essa pesquisa, meu eterno agradecimento.

Em memória, ao João Braguim dos Santos, por todo o seu incentivo e apoio, por acreditar em mim e no meu empenho, sem eles este trabalho não seria possível. Obrigada por todo o aprendizado, amor e carinho, que levarei para sempre.

À Deus, por guiar meus passos em direção ao conhecimento, por colocar pessoas incríveis em minha vida, as quais me proporcionaram e me proporcionam intenso aprendizado.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta tese, meus sinceros agradecimentos.

“A ciência é mais que um corpo de conhecimento, é uma forma de pensar, uma forma cética de interrogar o universo, com pleno conhecimento da falibilidade humana(...)”

Carl Sagan

RESUMO

SANTANA GB. *Análise da resposta imunológica celular da via Th17 em pacientes portadores de dermatofitose extensa e/ou persistente causada pelo Trichophyton rubrum* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Em países tropicais como o Brasil, as micoses superficiais (dermatofitoses) são comumente encontradas. O Dermatofito mais comum é o *Trichophyton rubrum* (*Tr*). Mananas e galactomananas na parede do *Tr* podem suprimir a resposta celular ao fungo. Quanto à resposta imune antifúngica, sabe-se a importância da via Th17. Algumas lectinas do tipo C (CLRs) como o receptor de manose e/ou receptores similares a Toll (TLRs) regulam o equilíbrio entre as vias Th1 e Th17. Nossos objetivos foram obter um extrato antigênico de *Tr* que induza resposta imune celular; quantificar e qualificar a resposta imune de indivíduos controles com lesão branda e de pacientes com dermatofitose extensa e/ou persistente causadas pelo *Tr* e por fim, avaliar a expressão de CLRs em monócitos do sangue periférico nos mesmos grupos. Para tanto, produzimos 11 extratos antigênicos de *Tr*. Pudemos observar na eletroforese em gel de poliacrilamida proteínas com pesos moleculares de aproximadamente 70 kDa e 38 kDa para os extratos fúngicos: Extrato TCA - Meta 1, Extrato tinalizado G1 e Extrato Coca 1. Avaliamos a resposta linfoproliferativa de células mononucleares por incorporação de timidina triciada em controles e pacientes ao peptídeo YIIDTGIDID do fungo *Tr* (Tri R2) e aos extratos antigênicos produzidos em nosso laboratório. Utilizamos como estímulos: PWM, CMA, Tri R2, PMA/Ionicina. Para os ensaios funcionais avaliamos quatro pacientes e 6 indivíduos controles. Para a fenotipagem das células Th17, Th17_{MEM}, Tc17 e Tc17_{MEM} por citometria de fluxo, utilizamos a análise Booleana no software FlowJo X. A avaliação da expressão dos CLRs: CD206 (Receptor de Manose), Dectin 1 e Dectin 2 em monócitos do sangue periférico de controles e pacientes foi efetuada por citometria de fluxo. Dos 11 extratos produzidos de *Tr*, 7 se mostraram bons estimuladores para pelo menos um dos controles analisados, expressos como ponto máximo de índice de estimulação (p.m.I.E.). Dentre eles destacamos: Extrato TCA – Meta 1 (p.m. I.E. = 14,49 em 5 µg/mL), Extrato Tinalizado G1 (p.m.I.E. = 23,00 em 2,5 µg/mL) e Extrato Coca 1 (p.m.I.E. = 173,36 em 0,31 µg/mL). Na avaliação da expressão dos receptores das células Th17 e Tc17 (Th17R e Tc17R, respectivamente) após seis dias de estímulo por: Tri R2, extrato Coca 1 e o extrato TCA - Meta 1, o extrato Coca se mostrou o melhor estimulador para as populações Th17, com a frequência de 8,40% (controle) e 12,30% (paciente 1). Na avaliação da expressão de Th17R e Tc17R por 6 horas ao estímulo por PMA/Iono, todos os controles (n=3) se mostraram responsivos e no grupo de pacientes (n=3) pudemos observar maior frequência para o paciente 1 nas populações Th17 (1,64%) e Th17_{MEM}(3,27%), e para as células Tc17 (10,70%) e Tc17_{MEM} (3,58%). Observamos redução da expressão de CLRs nos pacientes: CD206: média 60,24% (controles) e 21,27% (pacientes), Dectin 1: 22,42% (controles) e 12,06% (pacientes) e Dectin 2: 20,26% (controles) e 4,99% (pacientes). Controles (n=6) e pacientes (n=3). A inovação na produção de extrato antigênico Extrato TCA – Meta 1 encoraja o estudo dos extratos fúngicos, para se obter melhores condições de avaliações imunológicas em pacientes com dermatofitose. Caracterizamos e qualificamos a resposta imune celular frente ao peptídeo TriR2 e aos extratos antigênicos, além de avaliarmos a expressão dos CLRs nesse grupo especial de pacientes.

Descritores: imunidade; células Th17; tinha; sistema imunológico; testes imunológicos; *Trichophyton*.

ABSTRACT

SANTANA GB. *Analysis of the cellular immune response of the Th17 pathway in patients presenting extensive and/or persistent dermatophytosis caused by Trichophyton rubrum.*

[Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

In tropical countries like Brazil, superficial fungal infections (dermatophytosis) are commonly found. The most common dermatophyte is *Trichophyton rubrum* (Tr). Mannans and galactomannans of Tr cell wall can suppress cellular responses to the fungus. Regarding the antifungal immune response, the importance of Th17 pathway is warranted. Some C-type lectins (CLRs) as the mannose receptor and / or Toll-like receptors (TLRs) regulate the balance between Th1 and Th17 pathways. Our objectives were to obtain an antigenic extract of Tr to induce cellular immune response; to quantify and classify the immune response of control subjects with mild injury and patients with extensive and / or persistent dermatophytosis caused by Tr, and finally evaluating the expression of CLRs in peripheral blood monocytes in the same groups. Therefore, we produced 11 antigenic extracts of Tr. Proteins with molecular weights of approximately 70 kDa and 38 kDa were evidenced in polyacrylamide gel electrophoresis for the following fungal extracts: extract TCA - Target 1, Tindalized extract G1 and extract Coca 1. We assessed the lymphoproliferative response of mononuclear cells by tritiated thymidine incorporation in the controls and patients, stimulated by YIIDTGIDID peptide fungus Tr (Tri R2) and the antigenic extracts produced in our laboratory. We used as stimuli: PWM, CMA, Tri R2, and PMA/Iono. For functional assays we evaluated four patients and 6 control individuals. For the phenotyping of Th17 cells, Th17MEM, Tc17 and Tc17MEM by flow cytometry, we used a Boolean analysis performed by FlowJo X software. Evaluation of the expression of CLRs: CD206 (mannose receptor), Dectin 1 and Dectin 2 in peripheral blood monocytes from patients and controls was performed by flow cytometry. Of the 11 extracts produced from Tr, seven proved to be able to stimulate proliferation of peripheral blood mononuclear cells of at least one of the analyzed controls, expressed as peak stimulation index (p.m.I.E.). Among them, were included: extract TCA - Target 1 (pmIE = 14.49 at 5 µg /mL), Tindalized G1 Extract (pmIE = 23,00 at 2.5 µg /mL) and extract Coca 1 (pmIE = 173.36 at 0.31 µg /mL). In the evaluation of the expression of receptors of Th17 cells and Tc17 (Th17R and Tc17R, respectively) after six days of stimulation by: Tri R2, Coca extract and the extract TCA 1 - Meta 1, Coca extract showed to be the best stimulator for Th17 populations, with the frequency of 8.40% (control) and 12.30% (patient 1). In the evaluation of the expression of Th17R and Tc17R after 6 hours of stimulation by PMA / Iono, all controls (n = 3) responded and in the group of patients (n = 3) we observed response more frequently for the patient #1, in Th17 populations (1.64%), Th17_{MEM} (3.27%), Tc17 cells (10.70%) and Tc17MEM (3.58%). We observed a reduction of expression of CLRs in patients: CD206: average 60.24% (controls) and 21.27% (patients), Dectin 1: 22.42% (controls) and 12.06% (patients) and Dectin2: 26% (controls) and 4.99% (patients). Controls (n = 6) and patients (n = 3). Innovation in the production of antigenic extract extract TCA - Target 1 encourages the study of fungal extracts to obtain better conditions of evaluation of the immune response in patients with dermatophytosis. We characterized and qualified the cellular immune response to the TriR2 peptide, to antigen extracts, and evaluated the expression of CLRs in this special group of patients.

Descriptors: immunity; Th17 cells; tinea; immune system; immunologic tests; *Trichophyton*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADEE 3003	Ambulatório de Manifestações Dermatológicas das Imunodeficiências Primárias do Serviço de Dermatologia do HCFMUSP
APC	Células apresentadoras de antígeno
APECED	<i>Autoimmune Poly Endocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy</i>
<i>B. dermatitidis</i>	<i>Blastomyces dermatitidis</i>
BCL10	<i>B-cell lymphoma / leukemia 10</i>
BCR	Receptores de célula B
BSA	Bovine Serum Albumin
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
Ca ²⁺	Cálcio
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CARD9	<i>Caspase recruitment domain-containing protein 9</i>
CCL20	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 20</i>
CCR6	Receptor de quimiocina 6
CD11c	Receptor de C3bi do complemento (CR4)
CD161	Receptor CD161
CD206 / MR	Receptor de manose de monócitos
CD-54	<i>Cluster of Differentiation 54</i> (ICAM-1)
CD-80	<i>Cluster of Differentiation 80</i> (ligante de CD28/CTLA-4)
CLEC-1	Receptor CLEC-1 (do inglês C-lectin type 1)
CLR	Receptor de Lectina do tipo C
CMA	<i>Candida spp.</i>
CO ²	Dióxido de carbono
CTLD	<i>C-type lectin-like domains</i>
CXC	Quimiocina cisteína-aminoácido-cisteína
DCD	Dermatofitose crônica e disseminada

DCs	Células dendríticas
DCs Langerin ⁺	Células dendríticas de Langerhans
DC-SIGN	Receptor DC-SIGN
Dectina-1	Receptor Dectina-1
Dectina-2	Receptor Dectina-2
e cols. / <i>et al.</i>	colaboradores
<i>E. floccosum</i>	<i>Epidermophyton floccosum</i>
EAE	Encefalomielite experimental autoimune
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FcR γ	Receptor gama para a fração cristalizável (Fc) de IgG
FOXP3	<i>Forkhead Box P3</i>
<i>Gate</i>	Região de interesse selecionada
G-CSF	<i>Granulocyte Colony-stimulating factor</i>
<i>H. capsulatum</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HIES	<i>Hyper-Immunoglobulin E Syndrome</i>
I.E.	Índice de Estimulação
IFN-I	Interferon tipo I
IFN γ	Interferon gama
Ig α	Cadeia alfa do receptor de Imunoglobulina do linfócito B (CD79a)
Ig β	Cadeia beta do receptor de Imunoglobulina do linfócito B (CD79b)
IL-(...)	Interleucina (...)
IL-17RA	Receptor de interleucina 17A
IL-17RC	Receptor de interleucina 17C
IMT	Instituto de Medicina Tropical
ITAMs	Motivos de ativação de imunorreceptores baseados em tirosina

I κ B ζ	Fator de transcri \tilde{c} o I κ B ζ
<i>M. canis</i>	<i>Microsporium canis</i>
<i>M. gypseum</i>	<i>Microsporium gypseum</i>
MALT1	Do ingl \tilde{e} s <i>Mucosal associated lymphoid tissue antigen 1</i>
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade do tipo II
Mincle	Receptor Mincle
MoDCs	C \acute{e} lulas dendr \acute{t} icas derivadas de mon \acute{o} citos
MyD88	<i>Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88</i>
NKT	C \acute{e} lula T <i>natural killer</i>
OMS	Organiza \tilde{c} o Mundial da Sa \acute{u} de
PAMPs	Padr \tilde{o} es moleculares associados aos pat \acute{o} genos
PBS	Tamp \tilde{a} o fosfato-salino
PMA	Phorbol Miristil Acetato
PRR	Receptores de reconhecimento de padr \tilde{o} es
PWM	Mit \acute{o} geno Pokeweed
RORC	Fator de transcri \tilde{c} o RORC (do ingl \tilde{e} s <i>Retinoid orphan receptor C</i>)
RORct / RORA	Fator de transcri \tilde{c} o RORct (do ingl \tilde{e} s <i>Retinoid orphan receptor ct</i>)
ROR γ t	Fator de transcri \tilde{c} o ROR γ t (do ingl \tilde{e} s <i>Retinoid orphan receptor gamma t</i>)
RPMI-1640	(do ingl \tilde{e} s Roswell Park Memorial Institute – 1640; meio de cultura para c \acute{e} lulas mononucleares)
SFB	Soro fetal bovino
sp.	Esp \acute{e} cie
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcri \tilde{c} o 3
<i>T. mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
<i>T. tonsurans</i>	<i>Trichophyton tonsurans</i>

<i>T. verrucosum</i>	<i>Trichophyton verrucosum</i>
<i>T. viol</i>	<i>Trichophyton violaceum</i>
Tbet	Fator de transcrição Tbet
Tc	Célula T citotóxica
Tc17	Célula T citotóxica 17
Tc17 _{MEM}	Célula T citotóxica 17 de memória efetora
TCA	Ácido Tricloroacético
TCD4	Linfócitos TCD4
TCD8	Linfócitos TCD8
TCR	Receptores de célula T
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
Th(...)	Célula T auxiliar (...)
Th17 _{MEM}	Célula T auxiliar 17 de memória efetora
TLR(...)	Receptor <i>Toll-like</i> (...)
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Células T reguladoras
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
ZAP70	<i>Zeta-chain-associated protein kinase 70</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

g	Gramma
μg	Micrograma
μm	Micrômetro
mm	Milímetro
μM	Micromolar
mM	Milimolar
M	Molar
μL	Microlitro
mL	Mililitro
mg	Miligrama
ng	Nanograma
kDa	Quilodaltons
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
n / n°	Número
rpm	Rotações por minuto
>	Maior
MHz	Megahertz
V	Volts
pH	Potencial Hidrogeniônico
G	Força Gravitacional
μCi	Microcurie

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Relação dos anticorpos monoclonais utilizados para marcação extracelular das células Th17, Th17 _{MEM} , Tc17 e Tc17 _{MEM}	60
Quadro 2: Relação dos anticorpos monoclonais utilizados para marcação dos receptores de Lectina do tipo C.	62
Quadro 3: Dosagem de Proteínas totais pela técnica de Bradford e dosagem do pH	64
Quadro 4: Índices de estimulação (I.E.) do Extrato TR3 - <i>T. rubrum</i> concentrado, diluído 1 e diluído 2 da cultura de linfócitos de 6 dias.	65
Quadro 5: Concentração de proteínas do extrato tindalizado	66
Quadro 6: Índices de estimulação (I.E.) obtidos após estimulação do pelo Extrato Tindalizado G1 e G2 da cultura de linfócitos de 6 dias.	67
Quadro 7: Concentração de proteínas do extrato obtido por líquido de Coca	68
Quadro 8: Índices de estimulação (I.E.) obtidos após estimulação pelo do Extrato obtido com Líquido de Coca 1 e 2 da em cultura de linfócitos de 6 dias.	69
Quadro 9: Concentração de proteínas do extrato obtido com ácido tricloroacético (TCA) ...	70
Quadro 10: Índices de estimulação (I.E.) obtidas após estimulação do pelo Extrato obtido com TCA - Meta 1, Meta 2 e Meta 3 da cultura de linfócitos de 6 dias.	71
Quadro 11: Concentração de proteínas dos extratos brutos obtidos por extração com TCA .	73
Quadro 12: Índices de estimulação (I.E.) do Extrato com TCA - Bruto 1, Bruto 2 e Bruto 3 da cultura de linfócitos de 6 dias.	73
Quadro 13: Relação do grupo controle	78
Quadro 14: Relação dos pacientes	79
Quadro 15: Avaliação de marcadores de células Th17 e Th17 _{MEM} após estímulo por ativação por antígenos derivados do <i>T. rubrum</i> por 6 dias.	81
Quadro 16: Avaliação de marcadores de células Tc17 e Tc17 _{MEM} após estímulo por ativação por antígenos derivados do <i>T. rubrum</i> por 6 dias.	84
Quadro 17: Valores de frequência (%) das populações de células CD8 ⁻ após estímulo por phorbol Ester (PMA) e ionomicina por 6 horas	85
Quadro 18: Valores de frequência (%) das populações de células CD8 ⁺ após estímulo por phorbol Ester (PMA) e ionomicina por 6 horas	87

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Linfoproliferação de 6 dias com o Extrato TR2 - <i>T. rubrum</i> pós diálise	65
Gráfico 2: Linfoproliferação de 6 dias com o Extrato TR3 - <i>T. rubrum</i> concentrado, diluído 1 e diluído 2	66
Gráfico 3: Linfoproliferação de 6 dias com o Extrato Tindalizado G1	67
Gráfico 4: Linfoproliferação de 6 dias com o Extrato Tindalizado G2	68
Gráfico 5: Linfoproliferação de 6 dias com o Extrato Líquido de Coca 1	69
Gráfico 6: Linfoproliferação de 6 dias com o Extrato Líquido de Coca 2	70
Gráfico 7: Linfoproliferação de 6 dias com o Extrato obtido com TCA - Meta 1	71
Gráfico 8: Linfoproliferação de 6 dias com o Extrato obtido com TCA - Meta 2	72
Gráfico 9: Linfoproliferação de 6 dias com o Extrato obtido com TCA - Meta 3	72
Gráfico 10: Linfoproliferação de 6 dias com o Extrato TCA - Bruto 1	74
Gráfico 11: Linfoproliferação de 6 dias com o Extrato com TCA - Bruto 2	74
Gráfico 12: Linfoproliferação de 6 dias com o Extrato TCA - Bruto 3	75
Gráfico 13: Peptídeo do <i>Trichophyton rubrum</i> (YIIDTGIDID)	76
Gráfico 14: Avaliação de marcadores de células Th17 e Th17 _{MEM} após estímulo por ativação por antígenos derivados do <i>T. rubrum</i> por 6 dias.	82
Gráfico 15: Avaliação de marcadores de células Tc17 e Tc17 _{MEM} após estímulo por ativação por antígenos derivados do <i>T. rubrum</i> por 6 dias.	84
Gráfico 16: Avaliação de marcadores de células Th17, Th17 _{MEM} , Tc17, Tc17 _{MEM} após estímulo por ativação direta da proteína quinase C (PMA/IONO) por 6 horas.	86
Gráfico 17: Receptores da família de Lectinas do tipo C em monócitos do sangue periférico	88

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Manana, polissacarídeo presente na parede celular do *Trichophyton rubrum*27
- Figura 2:** Modelo de diferenciação das células T CD4+ através da utilização de citocinas e condução das vias de fatores de transcrição. Cada um dos quatro subconjuntos de células T CD4+ gera um conjunto único de citocinas que controlam as suas funções biológicas. Verde = citocinas que promovem o desenvolvimento de cada subconjunto específico. Vermelho = citocinas que impedem o desenvolvimento de cada subconjunto particular. As caixas sombreadas abaixo de cada subconjunto = principais fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento e manutenção de cada subconjunto. Ochs, Oukka and Torgerson, 2009....32
- Figura 3: Figura X: IL-17 e suas famílias de receptores.** Seis citocinas da família IL-17A a IL-17F e cinco moléculas da família de IL-17R (IL-17RA a IL-17RE) foram identificadas. Após a ligação de um homodímero de IL-17A ou IL-17F ou heterodímero de IL-17R para (o heterodímero de IL-17RA e IL-17RC), associados ACT1 com IL-17RA e/ou IL-17RC, através dos seus domínios SEFIR. Subsequentemente, os complexos associados com TRAF6, levando à ativação de NF-kB, MAPK-AP-1 e C/EBP. A jusante de IL-17R, TRAF3 também se associa com Act1 para inibir a ativação Act1-TRAF6 mediada por fatores de transcrição. Ativação de ERK-independente Act1 também contribui para a sinalização de IL-17R através de uma molécula desconhecido. Semelhante a sinalização através de IL-17R, IL-17E (IL-25) de ligação a IL-25R (heterodímero de IL-17RA e IL-17RB) resulta na ativação de NF-kB, MAPK-AP-1 e C/EBP via recrutamento de Act1 e TRAF6. IL-17RB, mas não de IL-17RA, contém um motivo de ligação TRAF6 intracelular, que ativa o NF-kB, mas não o AP-1, através de ligação TRAF6. IL-17B e IL-17C ligam a IL-17RB e IL-17RE, respectivamente. No entanto, a transmissão da via de sinalização é desconhecida. O(s) ligante(s) para a IL-17RD é também desconhecido. FNIII, fibronectina III-como domínio; SEFIR, expressão semelhante ao FGF, IL-17R e domínio da família Toll-IL-1R (Iwakura e cols., 2011).34
- Figura 4:** Figura representativa das estruturas e vias de sinalização conhecidos que são utilizados por diferentes CLRs envolvidos na resposta Th17. Vautier et al., 2010.....38
- Figura 5: Extrato do fungo *Trichophyton rubrum*.** Congelado a -80°C, produzido por Domingues, 2007.....46
- Figura 6: Solubilização do extrato de *Trichophyton rubrum* congelado.** Seringa de 20mL, contendo 5g de extrato de *T. rubrum* com água destilada até a marca de 10mL e outra seringa contendo 10mL de solução tampão de refolding e SDS-PAGE 2x conectadas a uma torneira de 3 vias (A). Extrato de *T. rubrum* após procedimento para eluição em torneira de 3 vias (B)..47

Figura 7: Solubilização do extrato congelado de <i>T. rubrum</i>. Alíquota do Extrato TR3 contendo 200 mL de TCA 50% (Ácido Tricloroacético) após ter sido deixado no gelo a 4°C pelo período de 1 hora.	48
Figura 8: <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC nº 28.188. Cultura em meio ágar Batata com cloranfenicol, cultivado com amostra ATCC em placas de Petri com crescimento estático a 25°C.	49
Figura 9: <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC nº 28.188. Cultura em meio ágar Sabouraud com cloranfenicol, cultivado com amostra ATCC em tubos de ensaio, com crescimento estático a 25°C.	50
Figura 10: Extração com Mertiolato Borato. Adição de Mertiolato Borato até a cobertura completa da cultura de <i>T. rubrum</i> em meio ágar Sabouraud com cloranfenicol, cultivado com amostra ATCC em tubos de ensaio, com crescimento estático a 25°C no 10º dia de crescimento.	51
Figura 11: Extração com Ácido Tricloroacético (TCA). Cultura de <i>T. rubrum</i> em meio ágar Batata com cloranfenicol, cultivado com amostra ATCC em placa de Petri em poliestireno descartável 140x15mm, com crescimento estático a 25°C no 12º dia de crescimento.....	52
Figura 12: Extração com Líquido de Coca. Cultura de <i>T. rubrum</i> em meio Czapeck modificado conforme Souza, VM (1993), cultivado com amostra ATCC em garrafas de vidro esterilizadas, com crescimento estático à temperatura ambiente no 20º dia de crescimento. ..	54
Figura 13: Métodos de compensação automática no FlowJo X com esferas magnéticas. A) Gráfico em <i>dotplot</i> demonstrando <i>gate</i> para seleção de esferas magnéticas. B) Histograma exemplificando o método de compensação automática para o fluorocromo FITC-A onde se demonstra a delimitação do pico de esferas negativas (pico esquerdo) e positivas (pico dire	58
Figura 14: Estratégia de análise para caracterização das células Th17 e das células Tc17. As áreas delimitadas (<i>gates</i>) representam as populações consideradas para análise. A purificação da análise foi realizada pela retirada das interferências do laser pelo <i>gate</i> Time (A), possíveis agrupamentos celulares através do <i>gate Singlets</i> (B), e também utilizado um marcador de viabilidade celular Live/DEAD® (C). Para delimitar a população de linfócitos foram utilizados os parâmetros de tamanho (FSC-A) e granulidade (SSC-A) (D) sendo utilizado o recurso <i>Contour Plot</i> para melhor delimitar a população desejada (E). Dentro da população de linfócitos, selecionaram-se as células que expressam a molécula CD3 em sua superfície (F), seguido da seleção de linfócitos T CD8- e T CD8 ^{high} (G) onde foi avaliado a frequência de células Th17 no fenótipo CD3+CD8- e a frequência de células T citotóxicas com o fenótipo CD3+CD8 ^{high} que apresentam a citocina IL-17A ancorada em sua membrana (H). Foram avaliadas também as populações de células CD45RO+ e CD45RO- dentro de cada população	

de célula T (I), analisando a frequência de células T expressando a IL-17A presentes dentro de cada população seguindo os seguintes fenótipos: CD3+CD8-CD45RO+ e CD3+CD8-CD45RO-, CD3+CD8^{high}CD45RO+ e CD3+CD8^{high}CD45RO- (J e K).59

Figura 15: Estratégia de análise dos receptores de Lectina do tipo C. Gráfico de pontos *dot plot* com parâmetros de tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) selecionada a população de monócitos (A) que para delimitação do *gate*, foi utilizado o recurso *Contour Plot* para melhor visualização da população desejada (B). Gate da população com expressão da molécula CD14 (C). Dentro da população CD14+ histogramas demonstrando os receptores de Lectina do tipo C: CD206 (receptor de manose), Dectin 1 e Dectin 2 (D, E e F, respectivamente).61

Figura 16: Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) mostrando a presença das proteínas do fungo *Trichophyton rubrum*, apresentando os dados de peso molecular em kDa (quilodaltons). Observam-se proteínas com pesos moleculares de aproximadamente 70 kDa e 38 kDa para os extratos fúngicos: Extrato com TCA - Meta 1, Extrato tindalizado G1 e Extrato com Líquido de Coca 1 em duplicata nas concentrações: 29 µg/mL, 46,92 µg/mL e 416 µg/mL, respectivamente. PPM = Padrão de Peso Molecular.77

Figura 17: Controles diagnosticados com dermatofitose por *T. rubrum*. Indivíduos controle, imunocompetentes com lesões pontuais que obtiveram melhora clínica após o tratamento instituído. *Tinea pedis*, algo descamativo descamativa (A), *tinea interdigital* (B e D) e *tinea pedis* descamativa (C).79

Figura 18: Pacientes diagnosticados com dermatofitose por *T. rubrum*. Pacientes imunocompetentes com dermatofitose causada pelo *Trichophyton rubrum*. *Tinea corporis* face lateral (A, F e H), *tinea corporis* face frontal (B, D e F), *tinea cruris* (C, E, G, I, J e K). Característica das lesões: Lesão com bordas elevadas hiperemiadas, algo descamativa (A-F), lesão hiperocrômica (G-I, K) e lesão descamativa com bordas bem delimitadas (J).80

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
LISTA DE SÍMBOLOS	15
LISTA DE QUADROS.....	16
LISTA DE GRÁFICOS	17
LISTA DE FIGURAS.....	18
1. INTRODUÇÃO	26
1.1. Infecções cutâneas por dermatófitos.....	26
1.1.1. Hospedeiro	26
1.1.2. Dermatófito	27
1.2. A imunidade na dermatofitose.....	29
1.3. Células Th17.....	30
1.4. Receptores de Lectina do tipo C.....	38
2. OBJETIVOS	42
2.1. Objetivo geral	42
2.2. Objetivos específicos.....	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1. Casuística.....	44
3.1.1. Pacientes.....	44
3.1.2. Controles	45
3.1.3. Coleta de amostra biológica.....	45
3.2. Obtenção do extrato do <i>Trichophyton rubrum</i>	45
3.2.1. 1ª Fase - Solubilização do Extrato Congelado.....	45
3.2.2. 2ª Fase - Diálise.....	46

3.2.3. 3ª Fase - Solubilização do Extrato Congelado	47
3.2.4 Amostra fúngica	48
3.2.5. 4ª Fase - Produção de Meios de Cultura	49
3.2.6. 5ª Fase - Extração com Mertiolato Borato	50
3.2.7. 6ª Fase - Extração com Ácido Tricloroacético (TCA)	51
3.2.8. 7ª Fase - Extração com Líquido de Coca	53
3.2.9. 8ª Fase - Ajuste de pH	55
3.3. Quantificação de proteínas	55
3.4. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida – SDS (SDS-PAGE)	55
3.5. Separação das células mononucleares	55
3.6. Congelamento e descongelamento de células	56
3.7. Cultura e estimulação das células para linfoproliferação	56
3.8. Cultura e estimulação das células para avaliação de moléculas de superfície	57
3.9. Caracterização fenotípica por citometria de fluxo	57
3.9.1. Método de análise	57
3.9.2. Estratégia de análise das células Th17 e Th17 _{MEM} e Tc17 e Tc17 _{MEM}	58
3.9.3. Imunobloqueio	60
3.9.4. Viabilidade Celular	60
3.9.5. Marcação extracelular	60
3.9.6. Estratégia de análise dos receptores de Lectina do tipo C	61
3.9.7. Avaliação dos Receptores de Lectina do tipo C	62
3.9.8. Lise de hemácias e marcação extracelular	62
3.10. Análise de Frequência	62
4. RESULTADOS	64
4.1. Obtenção e padronização dos extratos antigênicos de <i>Trichophyton rubrum</i>	64
4.1.1. Solubilização do extrato de <i>Trichophyton rubrum</i> congelado	64
4.1.1.1. Quantificação de proteínas totais	64
4.1.1.2. Linfoproliferação	64
4.1.1.2.1. Extrato TR2 – pós diálise	64

4.1.1.2.2. Extrato TR3 – concentrado, diluído 1 e diluído 2.....	65
4.1.2. Extratos Tindalizados G1 e G2	66
4.1.2.1. Quantificação de proteínas totais	66
4.1.2.2. Linfoproliferação.....	66
4.1.3. Extratos obtidos com Líquido de Coca 1 e 2	68
4.1.3.1. Quantificação de proteínas totais	68
4.1.3.2. Linfoproliferação.....	68
4.1.4. Extratos obtidos com Ácido Tricloroacético (TCA).....	70
4.1.4.1. Extração Meta 1, Meta 2 e Meta 3	70
4.1.4.1.1. Quantificação de proteínas totais	70
4.1.4.1.2. Linfoproliferação	70
4.1.4.2. Extração Bruto 1, Bruto 2 e Bruto 3.....	73
4.1.4.2.1. Quantificação de proteínas totais.....	73
4.1.4.2.2. Linfoproliferação	73
4.1.5. Curva dose-resposta ao Peptídeo (YIIDTGIDID)	75
4.1.6. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida – SDS (SDS-PAGE).....	76
4.2. Recrutamento dos indivíduos controle e pacientes.....	77
4.3. Cultura e estimulação das células para linfoproliferação	80
4.3.1. Avaliação de marcadores de células Th17 e Th17 _{MEM} após estímulo por ativação por antígenos derivados do <i>T. rubrum</i> por 6 dias analisados por citometria de fluxo	81
4.3.1.1. Análise comparativa entre os pacientes.....	81
4.3.2. Avaliação de marcadores de células Tc17 e Tc17 _{MEM} após estímulo por ativação por antígenos derivados do <i>T. rubrum</i> por 6 dias analisados por citometria de fluxo	83
4.3.2.1. Análise comparativa entre os pacientes.....	83
4.3.3. Avaliação de marcadores de células Th17 e Th17 _{MEM} após estímulo por ativação direta da proteína quinase C (PMA/IONO) por 6 horas analisados por citometria de fluxo	85
4.3.3.1. Análise comparativa entre os pacientes.....	85
4.3.4. Avaliação de marcadores de células Tc17 e Tc17 _{MEM} após estímulo por ativação direta da proteína quinase C (PMA/Iono) por 6 horas analisados por citometria de fluxo	87

4.3.4.1. Análise comparativa entre os pacientes.....	87
4.4. Avaliação dos Receptores de Lectina do tipo C	88
5. DISCUSSÃO	90
6. CONCLUSÃO.....	97
ANEXOS	100
ANEXO A: Ficha Clínica.....	100
ANEXO B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (HCFMUSP)	101
ANEXO C: Aprovação do Comitê de Ética (HCFMUSP).....	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O *Trichophyton rubrum* é um fungo dermatófito antropofílico, capaz de provocar infecções crônicas não inflamatórias na pele, o que poderia facilitar a sua transmissão. As infecções fúngicas localizadas nas camadas superficiais da pele e seus anexos podem ser causadas por dermatófitos, leveduras ou fungos filamentosos não dermatófitos. Em países tropicais como o Brasil é comumente encontrado micoses superficiais (Dermatofitoses) prevalecendo em alto índice comparado às infecções bacterianas. Os dermatófitos apresentam-se em três gêneros patogênicos: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* (Péron *et al.*, 2005; Weitzman and Summerbell, 1995; Havlickova, Czaika and Friedrich, 2008; Rippon JW, 1985).

1.1. Infecções cutâneas por dermatófitos

1.1.1. Hospedeiro

A susceptibilidade às dermatofitoses é variável. A infecção por dermatófitos ocorre pelo contato direto com seres humanos, animais ou solo contaminado. Os dermatófitos, principalmente o gênero *Trichophyton sp.*, além de causar lesões cutâneas, também podem provocar processos profundos invadindo a derme, a hipoderme e órgãos. A utilização de corticóides de uso sistêmico ou local em hospedeiros comprometidos, leva às dermatofitoses assumirem características aberrantes com localizações até viscerais provocadas principalmente por *T. rubrum*, *T. violaceum* e *T. verrucosum*. Podemos citar o granuloma tricofítico de Majocchi, uma inflamação no folículo (foliculite) e perifoliculite granulomatosa, com nódulos e placas infiltradas, comumente provocadas pelo *T. rubrum* (Campos, 2004).

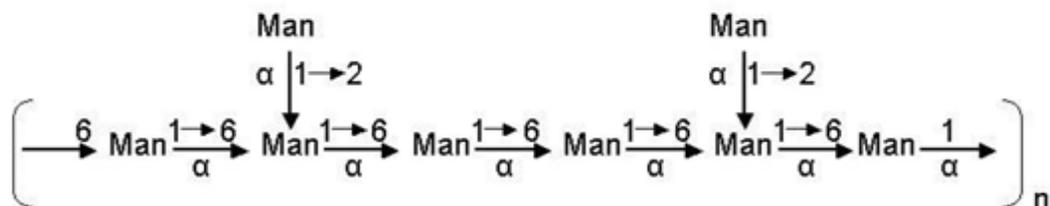
É essencial enfatizar que os dermatófitos causam infecções independentes do estado imunológico do paciente. Situações ou condições clínicas dos pacientes como: uso constante de sapatos fechados, áreas de dobras do corpo, o atrito nestas áreas (interdígito, regiões inguinal e submamária) auxiliam as condições ideais de temperatura e hidratação para a instalação de uma infecção dermatofítica ou até mesmo fatores cutâneos como: calor, umidade, abrasão, composição lipídica da pele ou até mesmo à tensão de dióxido de carbono na superfície da pele, podem predispor ao desenvolvimento da dermatofitose aguda ou crônica. (Campos, 2004; Calderon RA, 1989; King e cols., 1975).

Além destes fatores, temos ainda patologias ou procedimentos terapêuticos que podem interferir na imunidade do indivíduo determinando assim os fatores sistêmicos, indicando maior susceptibilidade a esta infecção em indivíduos portadores de doenças como Diabetes *Mellitus*, doença vascular periférica, síndrome de *Cushing*, terapia com corticosteróides, alterações hematológicas e predisposição genética. Para melhor discernimento destas relações parasito-hospedeiro nas infecções dermatofíticas, faz-se necessário o estudo destes fatores juntamente com as características do fungo patogênico e aspectos imunológicos do paciente (Peres *et al.*, 2010; Campos, 2004).

1.1.2. Dermatófito

Fatores relacionados ao fungo também contribuem para o desenvolvimento da infecção. Se faz necessário o estudo específico a cada espécie de dermatófito no que diz respeito ao estímulo da resposta imune pois, esta indução da imunidade varia de acordo com cada espécie fúngica. Organismos como *T. rubrum* causam infecções crônicas ou recidivantes, já outros fungos induzem resistência à reinfecção (MacGregor, Hamilton and Hay, 1992; Vermout e cols., 2008).

Como a parede do *T. rubrum* é composta por dois tipos de polissacarídeos (mananas e galactomananas) (Figura 1), os ensaios de linfoproliferação demonstraram a supressão da resposta celular por diversos antígenos e mitógenos *in vitro* devido à presença destas mananas (Ning *et al.*, 2002).



A manana tem estrutura linear constituída de unidades de manoses α -(1→6) ligadas entre si, e unidades de manoses α -(1→2) ligadas à cadeia lateralmente.

Figura 1: Manana, polissacarídeo presente na parede celular do *Trichophyton rubrum*

Trichophyton rubrum expressa glicoproteínas em sua parede celular que são reconhecidas por Dectina-1, um receptor específico para β -glucanas da família de receptores de Lectina do tipo C (CLRs), resultando na indução de altos níveis de TNF, IL-6 e IL-23 levando células T naïve à diferenciação em células Th17 e por consequência, produção de IL-17. A sinalização por esta via também induz a clivagem de pró-IL-1 β em IL-1 β madura por Caspase-1 acionado por NLRP3 e NLRP4. Alternativa para produção de IL-1 β , é o processamento por Caspase-8 formando um complexo CARD9, BCL10 e MALT1 (Gladiator *et al.*, 2013).

Segundo Mignon e cols. (2008) e Woodfolk (2005) as infecções por dermatófitos induzem resposta imune específica humoral e celular, sendo a resposta protetora contra os dermatófitos mediada principalmente por reação de hipersensibilidade do tipo tardia, caracterizada pela ação dos macrófagos como células efetoras, com atividade elevada de citocinas-chave do polo de resposta Th1 (linfócitos T auxiliares tipo 1) como interleucina 12 (IL-12) e interferon gama (IFN γ). Dessa forma, a interação fungo/hospedeiro – que inclui a espécie do fungo, a espécie do hospedeiro, sua capacidade de resposta imune e a modulação dessa resposta pelo parasita – exercerá influência no grau de reação inflamatória, que definirá a apresentação clínica e a duração da lesão.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) os dermatófitos prevalecem em 25% da população mundial, sendo que 30 a 70% dos adultos sejam portadores assintomáticos, aumentando esta incidência conforme a idade. No Brasil o *Trichophyton rubrum* aparece com maior incidência nas regiões sul e sudeste, em segundo lugar na região nordeste perdendo apenas para *Trichophyton tonsurans*, enquanto que especificamente em São Paulo, sua prevalência é de 80% nos casos de infecções cutâneas (tinea pedis, tinea unguium, tinea corporis e tinea cruris) e 33,2% se tratando de onicomicoses (Peres *et al.*, 2010).

Em um estudo realizado por Chinelli e colaboradores (2003), no período de 1992-2002, foram detectadas seis espécies de dermatófitos na cidade de São Paulo: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis*, *E. floccosum*, *T. tonsurans* e *M. gypseum*.

Em São Paulo a prevalência de dermatófitos é de 18,2% da população analisada, onde predomina o *T. rubrum* com 80% dos casos e *T. mentagrophytes* em 20%. Mesmo se isolarmos apenas as onicomicoses, *T. rubrum* ainda prevalece afetando tanto crianças como adultos em 33,2% dos casos identificados, seguidos por *T. mentagrophytes* com 6,3%. Em comparação com a cidade de Fortaleza as onicomicoses afetam 12,99% das dermatofitoses, onde o *T.*

rubrum prevalece com 9,04%, seguido por *T. tonsurans* (2,54%) e *T. mentagrophytes* (1,41%) (Peres, *et al.*, 2010). Observa-se que o *T. rubrum* representa uma tendência não só no Brasil como mundialmente, como relatado por Ruiz & Zaitz (2001).

1.2. A imunidade na dermatofitose

O reconhecimento dos patógenos fúngicos pelas células da imunidade inata é um evento primordial para estabelecer os mecanismos de defesa do hospedeiro e, portanto a proteção a micoses. A identificação de moléculas microbianas denominadas padrões moleculares associadas aos patógenos (PAMPs) como: lipopolissacarídeos, resíduos de manose e ácidos teicóicos é realizado por receptores de reconhecimento de padrões (PRR), que em sua maioria estão localizados na superfície das células da imunidade inata do hospedeiro, como por exemplo, os receptores da família das Lectinas do tipo C (CLRs) e os receptores *Toll-like receptors* (TLRs) que possuem papel essencial na interação a patógeno e iniciação da resposta inflamatória, estando presentes principalmente em macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (Mora-Montes *et al.*, 2011; Cruvinel, *et al.*, 2010; Araújo, *et al.*, 2009; Bártholo & Bártholo, 2009).

Além dos CLRs os fungos também são reconhecidos por receptores do tipo Toll: TLR2, TLR4, TLR7 e TLR9. MyD88 depende da sinalização via Toll expressas por células dendríticas, potencializadas por IL-12 (e/ou IFN-I). Além disso, MyD88 é necessária para a geração de resposta Th17 específica a *B. dermatitidis* por TLR ou receptor IL-1/IL-18, que também é MyD88-dependente (Gladiator *et al.*, 2013). Ainda não é compreendido o grau de impacto da sinalização via TLR ou CLR, mas acredita-se que exista um balanço entre estes diferentes caminhos para promover a regulação da resposta imunológica pelas vias Th1 e Th17 (Tesmer *et al.*, 2008).

Estudo realizado em pacientes com dermatofitose crônica quanto a expressão dos receptores TLR2 e TLR4 em lesões cutâneas por imunohistoquímica, demonstraram a expressão reduzida de sinalização do receptor TLR4 na epiderme de pacientes com dermatofitose localizada e em pacientes com dermatofitose disseminada em relação a indivíduos saudáveis e a expressão de TLR2 foi preservada na epiderme dos três grupos estudados. Estes dados podem indicar a causa da cronicidade destas lesões, visto que a

sinalização por TLR4 é responsável pelo recrutamento de neutrófilos e indução da produção de citocinas inflamatórias (Oliveira, CB *et al.*, 2015).

Os mecanismos protetores contra fungos dermatofíticos são mediados principalmente por células. Pacientes que apresentavam esta imunidade prejudicada desenvolveram infecções fúngicas extensas e recorrentes na pele, no couro cabeludo, unhas e mucosas (Staughton, 1990; Hunziker & Brun, 1980; Kaaman, 1978). Estudos mostraram que a fagocitose de conídios de *T. rubrum* por macrófagos murinos resultou numa diminuição significativa na expressão de suas moléculas de superfícies como MHC-II, CD-80 e CD-54 ao mesmo tempo em que estes mesmos macrófagos foram capazes de secretar altos níveis de TNF- α e IL-10. Este grupo também mostrou que a fagocitose do fungo por macrófagos murinos foi diminuída quando o receptor de manose foi bloqueado (Campos *et al.*, 2006). Recentemente, Sousa *et al.* (2015) mostraram que os fagócitos (neutrófilos e macrófagos) de pacientes com dermatofitose crônica e disseminada (DCD) apresentaram a capacidade funcional diminuída quando comparados ao grupo controle, bem como a secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-6) também estava diminuída quando comparados ao grupo controle. Em adição, foi demonstrado que a citocina IL-1 β tem um papel protetor no modelo experimental de *T. rubrum*; uma vez que a falta sinalização de IL-1 β promove o desenvolvimento de hifas no interior de macrófagos (Yoshikawas FSY *et al.* 2015).

1.3. Células Th17

A resposta imune adquirida conta com as células T e B como principais responsáveis pela regulação da imunidade, sendo ativadas por receptores de células T (TCRs) e receptores de células B (BCRs). A ativação destes receptores associa-se com moléculas de sinalização como CD3 ou imunoglobulina α (Ig α) e imunoglobulina β (Ig β), com os motivos de ativação de imunorreceptores baseados em tirosina (ITAMs) em seu citoplasma. O sinal de ativação induz a fosforilação de resíduos específicos de tirosina na ITAMs e recrutamento posterior da tirosina quinases Syk ou ZAP70 ao ITAMs fosforilado. Além de linfócitos, células *natural killer* e células da linhagem mielóide (mastócito, macrófago, neutrófilo e células dendríticas) também expressam receptores que traduzem seus sinais através das ITAMs e regulam funções celulares na imunidade inata (Hara *et al.*, 2007).

Células T naïve podem se diferenciar em células T efetoras a partir de um estímulo específico. Células Th1 são caracterizadas pela produção de interferon- γ (IFN- γ) diferenciando-se a partir do estímulo por IL-12, possuindo fator de transcrição Tbet e induz a imunidade mediada por células contra patógenos intracelulares. Células Th2 diferenciam-se pelo estímulo de IL-4, possuem fator de transcrição GATA3 e estimulam a imunidade humoral contra helmintos. Células Th17 são caracterizadas por produzirem IL-17, possuem fator de transcrição ROR γ t (camundongos) e RORC (humanos), sendo importantes na defesa contra bactérias extracelulares e fungos. IL-6 e IL-23 induzem uma pequena quantidade de IL-17 e são potencializadas na presença de IL-1 β . ROR γ t é dependente do transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3), fosforilado pela ativação por IL-6 e IL-23 (Figura 2) (Vautier *et al.*, 2010; Tesmer *et al.*, 2008).

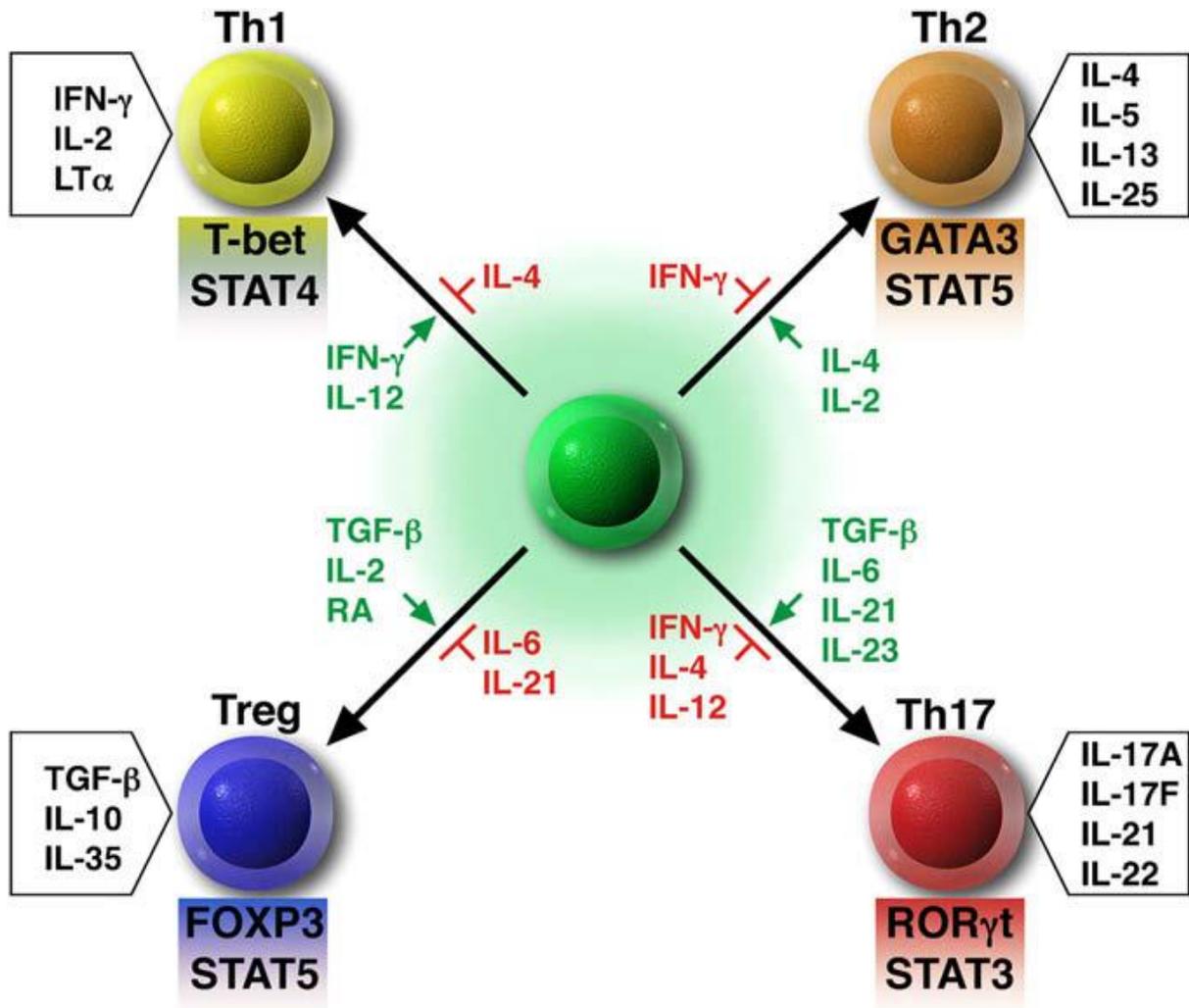


Figura 2: Modelo de diferenciação das células T CD4+ através da utilização de citocinas e condução das vias de fatores de transcrição. Cada um dos quatro subconjuntos de células T CD4+ gera um conjunto único de citocinas que controlam as suas funções biológicas. Verde = citocinas que promovem o desenvolvimento de cada subconjunto específico. Vermelho = citocinas que impedem o desenvolvimento de cada subconjunto particular. As caixas sombreadas abaixo de cada subconjunto = principais fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento e manutenção de cada subconjunto. Ochs, Oukka and Torgerson, 2009.

Estudos realizados em camundongos mostraram que a combinação de TGF-β e IL-6 estimula a diferenciação de células T naíve em células Th17 pela indução do fator de transcrição RORγt, ocorrendo a potencialização desta indução com a combinação de TNF-α e IL-1β, mostrando que ações conjuntas de diversas proteínas podem levar a diferentes expressões, já que se sabe que a função do TGF-β é inibir a maioria das células T pela indução de FOXP3 a expressar atividade Treg quando estão em altas doses, ocorrendo diferenciação em Th17 quando TGF-β está em doses baixas. Outro estudo mostrou que Tregs podem se converter em

células Th17 na presença de IL-6, mas não possuem a capacidade de supressão da resposta pela via Th17 (Tesmer *et al.*, 2008; Okamoto *et al.*, 2010).

A ativação da via Th1 por IFN- γ ou IL-4 da via Th2 podem inibir a via Th17 tanto em camundongos quanto em humanos, mas IL-17 não parece inibir as vias Th1 e Th2, explicando uma das formas como TGF- β promove a diferenciação em Th17, por suprimir IFN- γ e IL-4 (Tesmer *et al.*, 2008). IL-6 regula a expressão de IL-21, podendo a IL-21 substituir parcialmente a IL-6 durante a diferenciação da via Th17 e ambas regulam a expressão do receptor de IL-23. IL-23 juntamente com TGF- β induzem expressão de ROR γ t e conseqüentemente IL-17. Ainda não se sabe qual o papel da IL-21 na diferenciação da via Th17 (Tesmer *et al.*, 2008). A produção de IL-23 através da sinalização por dectina-1 mostrou que esta citocina possui a capacidade de converter populações de células Treg a produzir IL-17 e a sinalização por esta mesma via induz a produção de IL-17 em células T γ δ , potencializando esta resposta substancialmente na presença de IL-23 (Vautier *et al.*, 2010).

Brucklacher-Waldert e colaboradores (2010) demonstraram que as células Th17 devem sua plasticidade a presença de citocinas que interferem na diferenciação destas células como: IL-12 que induz a produção de IFN- γ e IL-23 que induz o aumento da produção de IL-17A.

As células Th17 expressam o receptor de quimiocina CCR6 tanto em humanos quanto em camundongos, que desempenha um importante papel no recrutamento de células T em muitas doenças inflamatórias como: psoríase, doenças inflamatórias intestinais, asma alérgica e artrite reumatóide. CCL20 se liga ao receptor CCR6 expresso nas células Th17, que é regulado positivamente por IL-17 em células estromais, permitindo que as células Th17 atraiam células Th1 para o local da inflamação. IL-17A e IL-17F produzidas por células Th17 estão intimamente relacionadas possuindo um receptor em comum (IL-17RA e IL-17RC), são citocinas heterodiméricas com potentes efeitos inflamatórios desempenhando um papel muito importante não só no desenvolvimento de doenças auto-imunes, mas também na defesa do hospedeiro contra bactérias (Tesmer *et al.*, 2008; Saijo, *et al.*, 2010).

A IL-17A e IL-17F formam um heterodímero na superfície das células Th17 e sugere-se que possa servir como um ligante para o receptor de IL-17 nas APC's para prolongar a sinalização de citocinas em aglomerados de células endoteliais e pode fornecer um sinal de transmigração através do endotélio vascular. Células que foram selecionadas com base na expressão de IL-17A na superfície, geraram células clones Th17 e Th1/17, nunca Th1.

Th17 e resistência a encefalomielite experimental auto-imune (EAE). A função de células T intrínsecas de I κ B ζ foi claramente demonstrada pela resistência à EAE do Rag2^{-/-} de camundongos em que gene Nfkbiz^{-/-} foram transferidos de células TCD4⁺ (Okamoto, *et al.*, 2010).

Foi relatado que IL-17F juntamente com a IL-17A são importantes para a defesa do hospedeiro contra *Staphylococcus aureus* e *Citrobacter rodentium*. IL-17A e IL-17F induzem células do sistema imunológico e as células epiteliais a produzirem diversas citocinas pró-inflamatórias e peptídeos antimicrobianos que protegem o hospedeiro contra infecções bacterianas. IL-17A induzida por G-CSF e quimiocinas CXC (cisteína-aminoácido-cisteína), também desempenha papel importante na defesa contra a infecção por *C. albicans*, pois IL-17RA de células Th17 deficientes de camundongos e IL-23p19 também de camundongos deficientes, mostraram um aumento da suscetibilidade à candidíase das mucosas. No entanto a participação e o mecanismo de defesa do hospedeiro, na utilização das citocinas IL-17A e IL-17F produzidas pelas células Th17 ainda permanece não elucidado. Também foi relatado que β -glucano ativado em DCs promove a diferenciação de células Th17 e que mananas de *Candida spp.* induzem a diferenciação de células Th17 através da ativação do MR. Os indutores das células Th17 *in vivo* após a infecção com *C. albicans* ainda é um caso obscuro (Saijo, *et al.*, 2010).

Foi estudada a importância da IL-17 em infecções por *C. albicans* usando camundongos deficientes em IL-17R α ou IL-23p19. Camundongos deficientes de IL-17 α , mas não de IL-17F, são mais suscetíveis à infecção sistêmica com *C. albicans*. Tem sido proposto que estas diferenças são devido ao funcionamento dessas citocinas entre diferentes configurações imunológicas. Uma ligação entre resposta de suscetibilidade fúngica e Th17 também foi feita em seres humanos, várias mutações humanas, resultando em doenças imunológicas como: APECED (*Autoimmune Poly Endocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy*) e HIES (*Hyper-Immunoglobulin E Syndrome*) e anulação da resposta caracterizada por Th17 que são associadas com candidíase mucocutânea crônica (Drummond, *et al.*, 2011).

Enquanto alguns estudos fazem um forte argumento para o benéfico efeito de Th17 durante infecções fúngicas, outros estudos apresentaram dados convincentes de que as respostas da via Th17 podem ser prejudiciais na imunidade antifúngica, exacerbando o processo inflamatório. Também foi argumentado que Th17 só pode ser exigido no controle a infecções fúngicas em locais específicos como mucosa oral (Drummond, *et al.*, 2011).

Diferentes subgrupos de células dendríticas atuam na diferenciação e ativação de células T helper. Dois destes subgrupos foram caracterizados: células dendríticas (DCs) residentes no linfonodo e células dendríticas migratórias que transportam antígenos que são capturados nos tecidos periféricos pela drenagem dos linfonodos. As DCs migratórias da pele, incluindo células de Langerhans da epiderme, podem ser classificadas como: DCs Langerin⁺ ou DCs cutâneas da derme Langerin⁻, mas estes subconjuntos possuem papéis opostos na polarização de células T em modelos de candidíase cutânea. Foi observado que, enquanto as células de Langerhans parecem ser necessárias e suficientes para o desenvolvimento da resposta Th17, as DCs Langerin⁺ da derme são requisitadas para indução de diferenciação em células Th1 e inibem as células de Langerhans e DCs clássicas da derme a promover resposta pela via Th17. Essas ações correlacionam-se com a produção de IL-6, IL-1 β e IL-23 ou IL-12 e IL-27 respectivamente, o que sugere ter uma função de imunoregulação em vez de função imunoativadora, observada em outros modelos. A ação combinada desses subconjuntos de DCs na apresentação de antígeno às células T é muito complexa por sua variação dependente do tecido onde se encontra o patógeno (Gladiator *et al.*, 2013).

Células dendríticas que ainda são células imaturas (MoDCs) são DCs do tipo migratório. Elas diferenciam-se em monócitos inflamatórios Ly6C^{hi} que saem da medula óssea expressando CCR2 com regulação positiva de MHC classe II e expressão de CD11c ao entrar no sítio da inflamação. As MoDCs acumulam-se rapidamente em resposta a infecções fúngicas, semelhantes às DCs residentes no tecido, transportando antígenos do local da inflamação para drenagem nos linfonodos. Apesar da eficiência das MoDCs durante infecções fúngicas, elas não possuem a capacidade de apresentação do peptídeo antigênico carregado no complexo MHC para ativação das células T no sítio de drenagem dos linfonodos, sendo a responsabilidade pela apresentação do antígeno atribuída às DCs residentes nos linfonodos. Observou-se que durante a aspergilose pulmonar e histoplasmose, as MoDCs são essenciais na indução da ativação e expansão de células T, não ficando elucidado apenas o impacto sobre a polarização da resposta antígeno específico das células T (Gladiator *et al.*, 2013).

As vias Th1 e Th17 coexistem durante a maioria das infecções fúngicas, sendo equilibradas não somente pelo estímulo natural dos PRRs que o fungo expõe, mas também por características específicas do tecido onde se encontra o patógeno, como foi observado nas respostas de células T para *Candida albicans* onde se observa um equilíbrio entre as respostas Th1 e Th17 nas infecções cutâneas, porém o predomínio somente da via Th1 durante a infecção sistêmica por *Candida spp.* Essa resposta depende totalmente dos fagócitos polimorfonucleares

neutrófilos, fato observado nos casos de neutropenia, seja de causa genética ou adquiridas. Em contraste, durante a candidíase orofaríngea as células Th1 não podem ser detectadas, ocorrendo somente diferenciação exclusiva em Th17 (Gladiator *et al.*, 2013).

Respostas pela via Th17 são protetoras quando equilibradas com a resposta via Th1, pois sua atividade desordenada pode levar a inflamação desequilibrada (Tesmer *et al.*, 2008). Para que ocorra a diferenciação de células T naïve em células Th17 efetoras, necessita-se da presença de citocinas específicas que variam conforme o microambiente, dependendo das diferentes populações de DCs residentes em diferentes tecidos. A resposta Th17 inicia-se na pele e tecidos de mucosa, mas nunca no baço, e mostrou-se estritamente dependente de IL-6, que inclusive se faz necessária para exercer efeito inibitório sobre o TGF- β e ácido retinóico, que são produzidos por DCs CD103⁺ nos tecidos de mucosa. Esses mecanismos específicos nos tecidos que se iniciam pela via Th17 ainda não foram testadas frente a infecções fúngicas até o presente momento (Gladiator *et al.*, 2013).

As células T reguladoras (Tregs) também contribuem no desenvolvimento da resposta Th17, promovendo a diferenciação de células Th17 na resposta a *C. albicans* pelo consumo de IL-2, que parece ter um efeito inibitório sobre as células Th17. Tregs possuem um papel na manutenção da tolerância e homeostase imunológica, podendo também se converter em células produtoras de IL-17, participando assim da imunidade contra fungos (Gladiator *et al.*, 2013).

IL-17 pode ser produzida por células TCD8⁺ e em alguns casos por: células T *natural killer* (NKT), neutrófilos e eosinófilos (Tesmer *et al.*, 2008). Estímulos com β -glucana altamente purificada através do receptor dectina-1 demonstraram a capacidade de diferenciação de células TCD4⁺ em Th17 e Th1, além do direcionamento do desenvolvimento de anticorpos e respostas pelas células TCD8⁺ (Vautier *et al.*, 2010). Os requisitos necessários para diferenciação de células TCD8⁺ efetoras secretoras de IL-17 (Tc17) parecem ser semelhantes ao das células Th17. Células TCD8⁺ e duplo-negativas podem servir como uma fonte alternativa de IL-17 em resposta a *B. dermatitidis*, *H. capsulatum* e *C. albicans*. Sugere-se que as células Tc17 mediem a proteção por infecções fúngicas em camundongos deficientes de células TCD4⁺ (Gladiator *et al.*, 2013).

Com o aumento da incidência de micoses por todo o mundo e a falta de vacinas contra qualquer patógeno fúngico, cria-se uma necessidade de desenvolvimento de novas estratégias de tratamentos antifúngicos. A longevidade das células Th17 e Tc17 podem ser aplicadas nesses

projetos de vacinas, por possuírem este pré-requisito potencial. Estratégias de imunização utilizando o efeito protetor de células T, em particular células Th17, estabelecem um novo paradigma para o desenvolvimento de vacinas para uso em humanos (Gladiator *et al.*, 2013).

1.4. Receptores de Lectina do tipo C

Os CLRs possuem a capacidade de reconhecer uma grande variedade de PAMPs e ligantes endógenos incluindo proteínas e lipídios. Alguns dos receptores ligados a membrana são capazes de induzir sinalizações intracelulares através de motivos de sinalização (ITAM) ou indiretamente por moléculas adaptadoras (FcR γ), resultando desde o estímulo em respostas celulares a indução de expressão gênica. Os CLRs foram divididos em 17 famílias, mas podemos destacar: Dectina-1, Dectina-2, Mincle, DC-SIGN, CLEC-1 e CD161, receptores envolvidos na resposta pela via Th17 (Figura 4) (Vautier *et al.*, 2010).

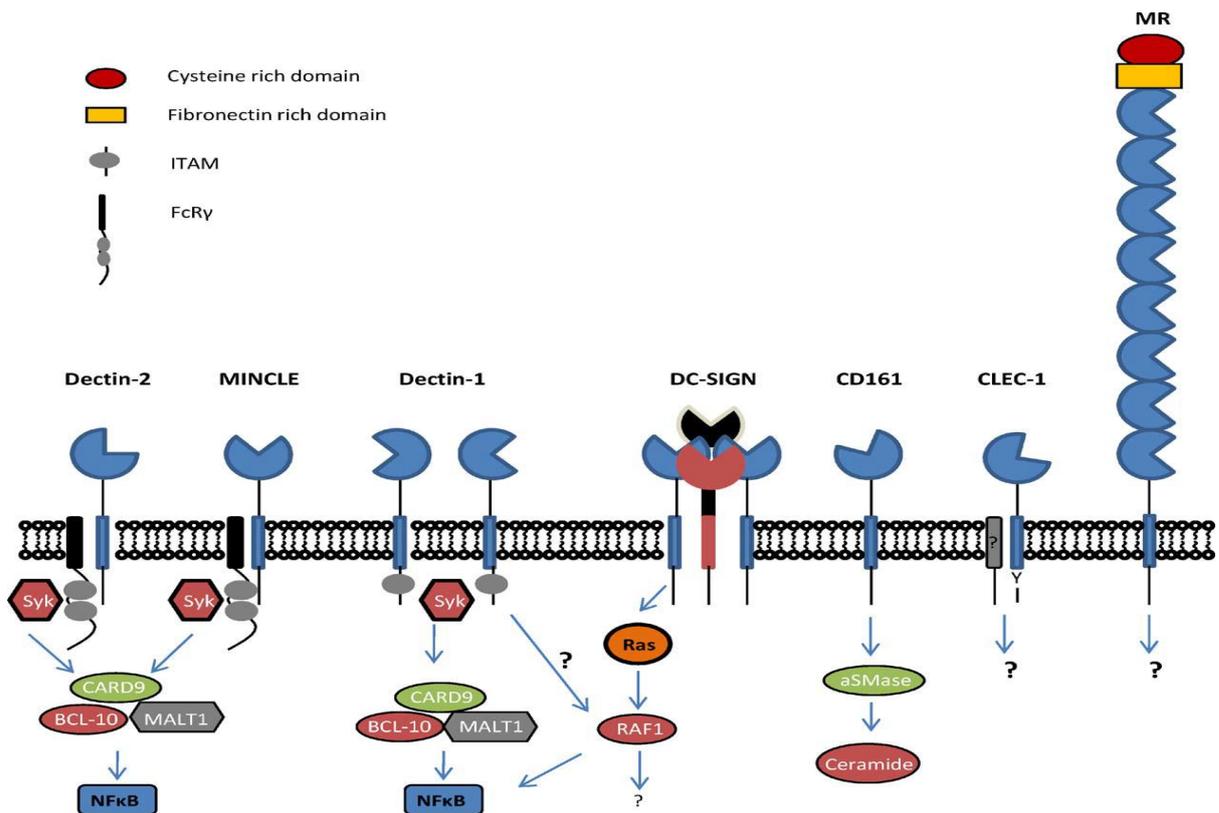


Figura 4: Figura representativa das estruturas e vias de sinalização conhecidos que são utilizados por diferentes CLRs envolvidos na resposta Th17. Vautier *et al.*, 2010.

A Lectina do tipo C Induzível pelo macrófago (Mincle) é uma proteína transmembrana do tipo II, expressa principalmente por macrófagos e células dendríticas. Assim como dectina-

2, Mincle possui um único CTLD extracelular, uma curta cauda citoplasmática e associa-se com o adaptador FcR γ para acionar sinalização intracelular através da via Syk/CARD9, reconhecendo ligantes endógenos e exógenos como células necróticas, fungos e micobactérias incluindo: *Saccharomyces*, *Candida* e *Malassezia*, preferencialmente estes últimos fungos. Mincle induz uma variedade de respostas celulares, induzindo a expressão de TNF, MIP-2, KC, IL-10 e IL-6. Camundongos nocaute de Mincle mostraram susceptibilidade a infecções por *Candida spp.*; bloqueando-se a função do receptor Mincle com anticorpos *in vivo* foi encontrada uma redução no recrutamento de neutrófilos e citocinas inflamatórias em resposta à morte de células por necrose (Vautier *et al.*, 2010).

Em resposta ao ataque dos fungos, o receptor de manose (CD206) pode induzir a ativação de NFkB e na produção de várias citocinas como: IL-12, IL-8, IL-1 β , IL-6 e fator de estimulação de colônia de granulócito e macrófago (GM-CFS), podendo também realizar uma função imunossupressora quando certos patógenos fúngicos são reconhecidos, inibindo assim a produção de citocinas inflamatórias (Willment *and* Brown, 2007).

Dectina-1 é uma proteína transmembrana tipo II, expressa em células mielóides (monócitos/macrófagos, células dendríticas e neutrófilos) e em várias populações de linfócitos. O motivo de ativação do imunorreceptor baseado em tirosina (ITAM) medeia à sinalização de Dectina-1 levando a diferentes caminhos de sinalização, incluindo mediações por Syk/CARD9 e Raf-1 quinase. Ainda não está elucidado como dectina-1 conduz o desenvolvimento da resposta via Th17, embora se saiba que Syk/CARD9 e Raf-1 quinase são caminhos de sinalização, além da fosfolipase C- γ 2, o que permite que este receptor estimule IL-1 β , IL-6 e IL-23 e iniba IL-12, que são citocinas importantes na resposta celular. Polimorfismos no gene humano de dectina-1 (Tyr238X) resultam na falta de expressão do receptor dectina-1, de modo que indivíduos homozigóticos são susceptíveis a infecção mucocutânea fúngica por *Candida spp.*, possuindo falhas na produção de citocinas incluindo IL-17, alterando assim a capacidade de resposta celular ao fungo. Este polimorfismo também foi associado à diminuição da incidência da doença enxerto *versus* hospedeiro ligado a colonização por *Candida spp.* nestes pacientes (Vautier *et al.*, 2010).

Dectina-2 é um receptor transmembrana tipo II da família dos CLRs, expresso predominantemente em macrófagos teciduais, células dendríticas e monócitos inflamatórios. Este receptor possui um CTLD (*C-type lectin-like domains*) ligado a um açúcar clássico que reconhece de modo Ca²⁺ dependente estruturas de manose expressos em ácaros, fungos e

micobactérias, tais como: *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Microsporium audouinii*, *Trichophyton rubrum*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*. Desempenha também um papel na tolerância na indução de UV (ultravioleta) através do reconhecimento de ligantes endógenos não identificados de células T CD4⁺ CD25⁺. Este receptor não possui motivos de sinalização tradicionais, por ter uma cauda citoplasmática curta, dectina-2 se associa com o adaptador FcR γ contendo ITAM e pode desencadear sinalização intracelular através de Syk/CARD9, podendo induzir uma variedade de respostas celulares, incluindo a produção de eicosanóides, citocinas e quimiocinas (Vautier *et al.*, 2010).

Estudos mostraram pela primeira vez a avaliação da resposta celular a *Candida albicans* sinalizada por dectina-2 provando que esta sinalização contribui para a indução das citocinas TNF, IL-6, IL-1 β e IL-23 em células dendríticas estimuladas por partículas fúngicas. É importante ressaltar que a sinalização por Syk/CARD9 desempenha um papel substancial no desenvolvimento da resposta Th17 e Th1 em infecções por *Candida albicans* em camundongos, embora para esta última resposta seja também necessário o receptor dectina-1. Outro estudo demonstrou que camundongos deficientes em dectina-2 são capazes de reconhecer α -mananas fúngicas, essenciais na resistência a infecção por *Candida albicans*. Baseado nesses resultados, Robinson *et al.* (2009) propuseram que dectina-1 e dectina-2 são responsáveis por quase toda a sinalização dependente de Syk/CARD9 induzida em resposta a estes patógenos fúngicos (Vautier *et al.*, 2010).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a resposta imunológica celular da via Th17 específica ao *Trichophyton rubrum* em pacientes portadores de dermatofitose extensa e/ou persistente.

2.2. Objetivos específicos

- A. Obter um extrato antigênico de *Trichophyton rubrum* e avaliar sua capacidade de indução de resposta celular “*in vitro*”, por meio da quantificação da resposta linfoproliferativa de células mononucleares do sangue periférico, comparando-o com outros estímulos inespecíficos *Pokeweed* [PWM] e *Candida ssp.* [CMA].
- B. Quantificar e qualificar a resposta imune celular “*in vitro*”, da resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos do grupo controle e do grupo de pacientes portadores de dermatofitose extensa e/ou persistente ao peptídeo YIIDTGIDID do fungo *T. rubrum* e ao extrato antigênico, utilizando como controles positivos o mitógeno *Pokeweed* [PWM] e *Candida ssp.* [CMA].
- C. Avaliar a expressão dos receptores de Lectina do tipo C: CD206 (Receptor de Manose), Dectin 1 e Dectin 2 em monócitos do sangue periférico de indivíduos do grupo controle e do grupo de pacientes portadores de dermatofitose extensa e/ou persistente.
- D. Quantificar a secreção das seguintes citocinas: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-21, IL-23, IFN- γ , TNF- α e TGF- β , por células mononucleares de sangue periférico estimulado por PWM, CMA, peptídeo YIIDTGIDID do fungo *T. rubrum* e o extrato antigênico de *T. rubrum*.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Casuística

3.1.1. Pacientes

Analisamos 4 pacientes do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) com dermatofitose causada pelo *Trichophyton rubrum*, que apresentaram comportamento de doença de forma atípica, onde foram levados em consideração os seguintes critérios:

- Tempo da doença;
- Localização atípica;
- Extensão;
- Disseminação;
- Recrudescência;
- Refratário ao tratamento.

Para cada paciente foi aplicado uma Ficha Clínica (Anexo A) para caracterização dos mesmos e dos critérios de exclusão, sendo eles:

- Doença de base que esteja associada à doença;
- Uso de corticóides ou qualquer medicação imunossupressora;
- Menores de 18 anos de idade;
- Gestantes;
- Imunodeficiência primária ou secundária conhecida;
- Dermatofitose causada por outros dermatófitos que não o *Trichophyton rubrum*.

Para identificação do dermatófito foi realizado um raspado da lesão para diagnosticar a presença de filamentos de dermatófitos. Havendo positividade o material biológico foi cultivado em meio ágar Batata pelo período de 15 dias para identificação da espécie. Os pacientes selecionados foram acompanhados no Ambulatório de Imunodeficiências Primárias (ADEE 3003) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.1.2. Controles

Foram avaliados 6 indivíduos controles diagnosticados com dermatofitose pelo fungo *Trichophyton rubrum* com lesões brandas sem grandes extensões, que realizaram tratamento pelo ambulatório do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) e obtiveram melhora clínica com o tratamento instituído.

Foram utilizados os mesmos critérios de exclusão do grupo de pacientes acrescentando as onicomicoses. Para o diagnóstico do dermatófito foi utilizado o mesmo critério de exclusão do grupo de pacientes.

3.1.3. Coleta de amostra biológica

Após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B) pelo paciente e o indivíduo controle ou seu representante legal, foi coletado o material biológico (sangue periférico) pela parte da manhã na coleta de rotina do seguimento dos pacientes. Foram coletados 5 mL de sangue em EDTA (para caracterização dos receptores de Lectina do tipo C por citometria de fluxo) e 63 mL de sangue em heparina para os ensaios funcionais. O projeto tem a aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP (CAPPesq) sob o nº de protocolo 855/00 (Anexo C).

3.2. Obtenção do extrato do *Trichophyton rubrum*

3.2.1. 1ª Fase - Solubilização do Extrato Congelado

Foi utilizada uma amostra fúngica (20g) liofilizada que estava armazenada a uma temperatura de -80°C, na qual foi cultivada em meio Czapeck e extraída com Líquido de Coca (Souza, VM 1993), proveniente de um projeto anterior realizado em nosso laboratório (Bressani *et al.*, 2011) (Figura 5).



Figura 5: Extrato do fungo *Trichophyton rubrum*. Congelado a -80°C , produzido por Domingues, 2007.

Para solubilização do extrato foi adicionado 25mL de PBS e homogeneizado em vórtex. O material foi então armazenado em geladeira à 4°C pelo período de 24 horas. Após este período o extrato foi levado ao vórtex, não obtendo ainda a solubilidade desejada. Adicionou-se então, mais 75mL de PBS e levado ao vórtex por 2 minutos. O extrato então foi dividido em 4 tubos de polietileno do tipo Falcon (25mL em cada tubo). Um tubo foi apoiado em um Becker contendo gelo e levado ao Sonicador *Sonic Desmembrator* (Quigley - Rochester Inc.) a 80 MHz em 4 fases: 1ª fase: 4 períodos de 1 minuto com intervalo de 20 segundos. 2ª fase: 4 períodos de 5 minutos com intervalo de 20 segundos. 3ª fase: 4 períodos de 15 minutos com intervalo de 20 segundos. 4ª fase: 4 períodos de 30 minutos com intervalo de 1 minuto. 5ª fase: 6 períodos de 30 minutos com intervalo de 1 minuto. Todas as fases a 80 MHz com o cuidado da temperatura da amostra. Após todo este processo, não obtivemos a solubilidade do extrato fúngico, contendo ainda "grumos". Partimos então para maceração mecânica com pistilo de porcelana e duas filtragens em filtro Millipore com poro de $22\ \mu\text{m}$ para deixar a amostra translúcida. Este extrato foi chamado de **Extrato TR1**.

3.2.2. 2ª Fase - Diálise

A fim de aumentar a concentração de proteínas no Extrato 1 *T. rubrum*, a amostra foi passada para uma membrana de diálise e deixada na estufa a 30°C por 40 horas com o volume inicial de 32,5 mL. Após este período o extrato foi filtrado em filtro Millipore com poro de $22\ \mu\text{m}$ (**Extrato TR2 - pós diálise**).

3.2.3. 3ª Fase - Solubilização do Extrato Congelado

Da mesma amostra liofilizada armazenada a -80°C , foi retirada uma alíquota de 5 gramas de extrato, colocada em uma seringa de 20 mL e completada com água destilada até a marca de 10 mL. Em outra seringa de mesmo volume, foi adicionado 10 mL de solução tampão de refolding e SDS-PAGE 2x inibidor de protease (Composição: Tris HCl 0,1 M pH 6,8; SDS 2%; Uréia 10M; PMSF 0,002M; *Bromphenol Blue* 0,01%) (Figura 6A). As duas seringas foram encaixadas em uma torneira de 3 vias para permitir uma livre passagem de uma seringa para a outra, livre de perdas, de modo a se obter uma suspensão homogênea que depois foi transferida para um tubo do tipo Falcon e aquecida a 70°C em banho-maria por 15 minutos (Figura 6B).

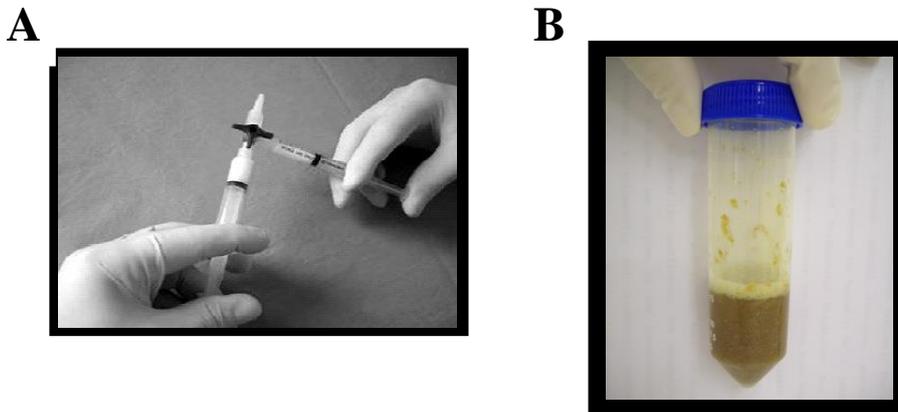


Figura 6: Solubilização do extrato de *Trichophyton rubrum* congelado. Seringa de 20mL, contendo 5g de extrato de *T. rubrum* com água destilada até a marca de 10mL e outra seringa contendo 10mL de solução tampão de refolding e SDS-PAGE 2x conectadas a uma torneira de 3 vias (A). Extrato de *T. rubrum* após procedimento para eluição em torneira de 3 vias (B).

O material foi distribuído em tubos de polipropileno tipo Eppendorf e centrifugados a $11.337 \times G$ por 3 minutos. Recuperado o sobrenadante e passado para um tubo do tipo Falcon para dosagem de concentração de proteínas (**1ª alíquota**). Este extrato foi chamado de **Extrato TR3** – 1ª alíquota. Em uma alíquota do Extrato TR3 foi adicionado 200mL de TCA 50% (Ácido Tricloroacético), deixado no gelo a 4°C pelo período de 1 hora (neste período a solução muda sua coloração de verde escuro para amarelo) (Figura 7). A amostra foi distribuída em tubos tipo Eppendorf e centrifugadas em centrífuga refrigerada a 4°C a $26.295 \times G$ por 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuscitado com 240 μL de NaOH 1M e 80 μL de tampão Borato de Sódio 0,1M pH 7,5 (Composição: glicerol 50%; NaCl 0,05M; *Phenol Red* 16mg/mL). Nesse momento a solução passou para a cor alaranjada. Separou-se uma alíquota

para dosagem de concentração de proteínas (**2ª alíquota**) e o extrato foi armazenado em geladeira a 4°C por 24 horas. Para retirar todos os reagentes utilizados para precipitação de proteínas, foi realizada lavagem da 2ª alíquota com Acetona ((CH₃)₂ CO) peso molecular 58,08. Em um tubo do tipo Falcon foi adicionado 5 mL do Extrato TR3 - 2ª alíquota e 45 mL de Acetona, centrifugado a 1.409 x G por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi aquecido com um secador de cabelos, com o ar quente voltado para a parede do tubo do tipo Falcon, até formar um pó tônico. Este pó foi dissolvido com 500 µL de água destilada e levado ao vórtex. O material foi colocado na centrífuga e dado um "spin" (colocado na velocidade máxima e centrifugado por 10 segundos). Esse material foi passado para um tubo tipo Eppendorf (**Extrato TR3 –concentrado**). Na parede do tubo do tipo Falcon, foi adicionado 500 µL de água destilada para "limpar" o tubo, levado ao vórtex e a centrífuga e dado um "spin" (**Extrato TR3 –diluído 1**). Ambas as amostras foram filtradas em filtro Millipore poro 0,22µm (Schleicher & Schuell) para esterilização. Durante a filtragem do extrato concentrado, percebeu-se que havia muito material no filtro. Adicionamos então nesse mesmo filtro, 1 mL de PBS 1x obtendo então um **Extrato TR3 – diluído 2**. Na filtragem do extrato diluído, o filtro absorveu todo o material. Adicionou-se então 1 mL de PBS 1x. Todas as amostras tiveram dosadas as concentrações de proteínas.



Figura 7: Solubilização do extrato congelado de *T. rubrum*. Alíquota do Extrato TR3 contendo 200 mL de TCA 50% (Ácido Tricloroacético) após ter sido deixado no gelo a 4°C pelo período de 1 hora.

3.2.4 Amostra fúngica

Todos os protocolos a seguir, foram realizados a partir da amostra fúngica de *Trichophyton rubrum* ATCC nº 28.188 (Figura 8).

***Trichophyton rubrum*
ATCC 28188 - Anverso**



***Trichophyton rubrum*
ATCC 28188 - Verso**

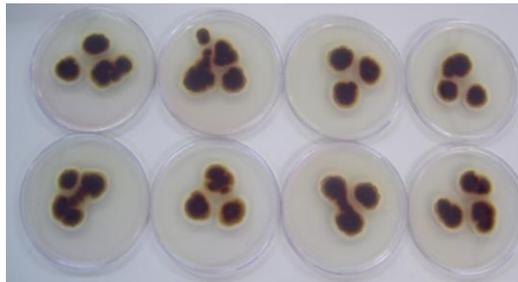


Figura 8: *Trichophyton rubrum* ATCC nº 28.188. Cultura em meio ágar Batata com cloranfenicol, cultivado com amostra ATCC em placas de Petri com crescimento estático a 25°C.

3.2.5. 4ª Fase - Produção de Meios de Cultura

Ágar Sabouraud: Foram preparados 5 litros de meio de cultura utilizando: 100g Glicose (D-glicose Anidra (Dextrose) - Synth); 50g de Peptona (Bacto™ Peptone (BD)); 500 mg Cloranfenicol (dissolvido em álcool 96%). Foi dissolvida a Glicose com a Peptona em 1 litro de água destilada fria em um balão de vidro, logo após foram acrescentados os 4 litros restantes de água destilada aquecida e homogeneizada. O preparo desse meio foi realizado em água fervente dentro da auto-clave onde foi adicionado o Ágar. O meio foi então autoclavado a 120°C por 20 minutos.

Ágar Batata: Foram preparados 3 litros de meio de cultura utilizando: 117 g de Ágar Batata - Difco™ Potato Dextrose Agar (BD) e diluído em 3 litros de água destilada aquecida para homogeneização e esterilização em auto-clave a 120°C por 20 minutos.

3.2.6. 5ª Fase - Extração com Mertiolato Borato

Preparação de 1 litro de Mertiolato Borato: Solução de Timerosal, segundo Standard & Kaufman (1982) na concentração de 1:5000; 1 g de Etil Mercúrio salicilato de sódio (Sigma); 1,4 g de Borato de Sódio e 1 litro de água destilada. Essa solução foi armazenada em geladeira. A partir da amostra fúngica de *Trichophyton rubrum* ATCC n° 28.188, foi feito repique em 150 tubos de ensaio contendo Ágar Sabouraud com cloranfenicol (Figura 9) e 150 tubos de ensaio contendo Ágar Batata com cloranfenicol e deixados em temperatura ambiente. Foi adicionado Mertiolato Borato em temperatura ambiente, no 10º, 15º e 20º dia de crescimento fúngico, em uma quantidade que cobrisse todo o meio de cultura juntamente com os micélios (Figura 10). Os tubos foram armazenados no escuro à temperatura ambiente por 24 horas. Após este período cada amostra foi filtrada e armazenada em frasco âmbar e mantidas em geladeira a 4°C. Foram feitas alíquotas para dosagem da concentração de proteínas e todo o procedimento foi realizado em capela de segurança biológica. Para certificação de pureza, antes da adição do Mertiolato Borato, foi feita uma lâmina de cada cultura para análise microscópica.



Figura 9: *Trichophyton rubrum* ATCC n° 28.188. Cultura em meio ágar Sabouraud com cloranfenicol, cultivado com amostra ATCC em tubos de ensaio, com crescimento estático a 25°C.



Figura 10: Extração com Merteolato Borato. Adição de Merteolato Borato até a cobertura completa da cultura de *T. rubrum* em meio ágar Sabouraud com cloranfenicol, cultivado com amostra ATCC em tubos de ensaio, com crescimento estático a 25°C no 10º dia de crescimento.

3.2.7. 6ª Fase - Extração com Ácido Tricloroacético (TCA)

A partir da amostra fúngica de *Trichophyton rubrum* ATCC n° 28.188, foi feito repique em quatro placas de Petri de poliestireno descartáveis de 140x15mm contendo meio de cultura ágar Batata com cloranfenicol e deixadas em crescimento por 12 dias em estufa a 25°C (Figura 11). Os micélios foram transferidos para uma peneira para retirada do excesso de ágar aderido à base micelial. A massa micelial vermelha foi transferida para 2 frascos tipo Erlenmeyer contendo 200 mL de caldo Batata cada um e deixados em agitação por 3 dias a 37°C. Todo o material foi dividido em tubos do tipo Falcon, centrifugados em centrífuga refrigerada a 4°C a 1.948 x G por 15 minutos. O sobrenadante foi retirado e separado do pellet. O pellet foi reservado para utilização na 2ª fase deste protocolo.



Figura 11: Extração com Ácido Tricloroacético (TCA). Cultura de *T. rubrum* em meio ágar Batata com cloranfenicol, cultivado com amostra ATCC em placa de Petri em poliestireno descartável 140x15mm, com crescimento estático a 25°C no 12º dia de crescimento.

A 1ª fase deste protocolo consistiu na obtenção do antígeno secretado-excretado, realizado em 3 processos distintos: **A)** Em um tubo do tipo Falcon, foi adicionado 4 volumes de Etanol absoluto a -20°C (40 mL) e 10 mL do sobrenadante, agitado e incubado por 18 horas no *freezer* -20°C para precipitação de proteínas. Após este período o material foi centrifugado em centrífuga refrigerada a 4°C a 453 x G por 15 minutos, desprezado o sobrenadante e o pellet ressuspenso com 1 mL de PBS 1x e esterilizado por filtração 0,22 µm e reservado para dosagem de concentração de proteínas. **B)** Foi adicionado 1/10 do volume de TCA 50% gelado, agitado e deixado em banho de gelo por 1 hora, centrifugado, o sobrenadante drenado em filtro de papel. O pellet foi dissolvido em 500 µL de solução tampão carbonato pH 9,0 0.1M. **C)** Armazenado em geladeira a 4°C.

2ª fase: Em uma seringa de 20 mL adicionou-se 10 gramas do *pellet* e completou-se com água destilada até a marca de 10 mL. Em outra seringa de mesmo volume, foram adicionados 10 mL de solução tampão de *refolding* e SDS-PAGE 2x inibidor de protease (Composição: Tris HCl 0,1 M pH 6,8; SDS 2%; Uréia 10M; PMSF 0,002M; *Bromphenol Blue* 0,01%). As duas seringas foram encaixadas em uma torneira de 3 vias para homogeneização da

suspensão, que depois foi transferida para um tubo do tipo Falcon, aquecida a 70°C em banho-maria por 15 minutos. O material foi distribuído em tubos tipo Eppendorf e centrifugados a 11.337 x G por 3 minutos. Recuperado o sobrenadante, esse foi passado para um tubo do tipo Falcon para dosagem de proteínas (**Solução 1**). Com uma alíquota da solução 1, adicionou-se 1 mL de solução de TCA 50%, deixado em banho de gelo por 1 hora. A solução mudou da cor verde escuro para amarelo. A amostra foi distribuída em tubos tipo Eppendorf, centrifugadas a 26.295 x G por 2 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C e o sobrenadante desprezado. O pellet foi ressuspenso com 240 µL de NaOH 1M e 80 µL de solução tampão Borato de Sódio 0,1M pH 7,5 (Composição: glicerol 50%; NaCl 0,05M; *Phenol Red* 16mg/mL). A solução mudou para a cor alaranjada. Nesse momento foi reservada uma alíquota para dosagem de proteínas (**Solução 2**). Em um tubo do tipo Falcon contendo 5 mL da solução 2, foi adicionado 45 mL de Acetona ((CH₃)₂ CO) peso molecular 58,08, centrifugado a 1.409 x G por 10 minutos, o sobrenadante desprezado e o *pellet* aquecido com um secador de cabelos, com o ar quente voltado para a parede do tubo do tipo Falcon, até formar um pó tônico. Este pó foi dissolvido em 500 µL de água destilada e levado ao vórtex. O material foi colocado na centrífuga e dado um "spin". O material foi transferido para tubos tipo Eppendorf, sendo reservada uma alíquota para dosagem de concentração de proteínas (**Solução 3**) e armazenado em geladeira a 4°C.

3.2.8. 7ª Fase - Extração com Líquido de Coca

Preparo para 1 litro de meio Czapeck: 2 g de NaNO₃ (Riedell); 1 g de K₂HPO₄ (Vetec); 0,5 g de MgSO₄ (Intermat); 0,5 g de KCl (Vetec); 0,01 g de FeSO₄ (Synth); 15 g de Maltose (Vetec); 15 g de Dextrose (Vetec) e 10 g de Triptona (Oxoid). Os ingredientes foram dissolvidos em água destilada aquecendo em banho-maria. Foram adicionados 200 mL de meio Czapeck modificado em 8 garrafas de vidro, que foram esterilizadas em auto-clave juntamente com o meio de cultura, a 120°C por 20 minutos, pH entre 6,8 e 7,0. As garrafas foram armazenadas em temperatura ambiente e devidamente lacradas.

Em capela de segurança biológica, foi repicada em cada garrafa uma alíquota do fungo *Trichophyton rubrum* ATCC n° 28.188, lacradas e deixadas em bancada à temperatura ambiente pelo período de 20 dias (Figura 12). Após este período, para comprovação de pureza, foi retirada uma gota de cada garrafa e transferida para tubos contendo meio ágar Batata com cloranfenicol e deixadas em temperatura ambiente por 15 dias.



Figura 12: Extração com Líquido de Coca. Cultura de *T. rubrum* em meio Czapeck modificado conforme Souza, VM (1993), cultivado com amostra ATCC em garrafas de vidro esterilizadas, com crescimento estático à temperatura ambiente no 20º dia de crescimento.

Com as amostras puras aplicou-se o protocolo conforme Souza, VM (1993). O micélio foi filtrado, separando o macerado e o filtrado. O macerado foi lavado três vezes com água destilada e três vezes com álcool 96% e deixado secar em estufa a 37°C por 48 horas. Após este período o material foi triturado e pesado em balança analítica, contendo 40 g de extrato. A tricofitina foi extraída com Líquido de Coca (0,5 g de NaCl; 0,275 g de NaHCO₃; 100 mL de água destilada) segundo Costa (1960), adicionada a uma concentração peso x volume de 10%. Adicionou-se então 4 mL de Líquido de Coca para 40 g de extrato fúngico, armazenado em frasco âmbar e mantido a 4°C durante sete dias. A seguir foi centrifugado a 990 x G por 10 minutos, o sedimento desprezado e o sobrenadante armazenado em geladeira a 4°C por 7 dias. Após este período, o filtrado foi alíquotado em garrafas de vidro, devidamente identificadas e armazenadas em geladeira a 4°C (**Extrato com Líquido de Coca 1**). Após este período foram retirados 10 mL do Extrato com Líquido de Coca 1 e adicionados quatro volumes de Etanol absoluto a -20°C, agitado e incubado por 18 horas no *freezer* -20°C para precipitação de proteínas. Após este período o material foi centrifugado em centrífuga refrigerada a 4°C a 453

x G por 15 minutos, reservado o sobrenadante e o *pellet* ressuspenso com 1 mL de PBS 1x e esterilizado por filtração em filtro de poro de 0,22 µm (**Extrato com Líquido de Coca 2**).

3.2.9. 8ª Fase - Ajuste de pH

A dosagem do pH foi realizada por meio do pHmetro Quimis, onde o balanceamento do pH foi realizado com: NaOH 1M para alcalinização e HCl 1N para acidificação.

3.3. Quantificação de proteínas

As concentrações de proteínas foram quantificadas pela técnica de Bradford (Souza & Gambale, 1993). Para curva padrão foi utilizado BSA (Bovine Serum Albumin) seguindo as diluições conforme protocolo - Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit (Thermo Scientific).

3.4. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida – SDS (SDS-PAGE)

Os extratos produzidos de *Trichophyton rubrum* foram misturados com tampão de amostra q.s.p. 1x *loading buffer* – 2x (Tris/HCl pH 6,8 100mM; SDS 4%; Azul de *Bromofenol* 0,2%; Glicerol 20%; antes do uso foi adicionado di-tiotreitol q.s.p. 200mM (estoque: 1 M armazenado a -20°C)) e fervido a 76°C por 5 minutos. Em placas Mini protean III – BioRad, aplicou-se o gel de resolução no aparato, adicionando água Milli-Q até nivelar o gel. Após a polimerização, a água foi retirada e deixada para secar com papel de filtro. Aplicou-se então o gel de empacotamento e inserimos o pente. Com o aparelho de eletroforese já contendo o tampão de corrida (Tris 250 mM; glicina pH 8,3 2,5M; SDS 1%) foi realizada a corrida eletroforética (100 V a 200 V).

3.5. Separação das células mononucleares

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram obtidas através da coleta de sangue periférico em tubo heparinizado, diluído em solução salina isotônica estéril em proporção 1:1 (volume a volume) e posteriormente passada para um tubo cônico tipo Falcon contendo Ficoll Hypaque de densidade 1.076 (GE Healthcare, Brasil) (Ficoll-Hypaque) na proporção 1:3 (Böyum, 1968). Esses tubos contendo o sangue a ser processado foram centrifugados a 867 x G por 20 minutos. Após o período de centrifugação, o anel composto por

células mononucleares foi aspirado e passado para um tubo cônico contendo meio enriquecido estéril (RPMI-1640 com 10% soro humano AB) e foram lavadas duas vezes em centrífuga a 453 x G por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e as células foram ressuspensas em 1 mL do meio enriquecido, retirando-se 20 µL de células para contagem em câmara de Neubauer e avaliou-se a viabilidade e a concentração celular com a coloração azul de Tripán (0,4%).

3.6. Congelamento e descongelamento de células

As células dos pacientes e controles foram congeladas para realização de ensaios posteriores. O processo de congelamento foi realizado após as células serem lavadas a 453 x G por 10 minutos e ressuspensas por gotejamento em solução contendo 50% de soro fetal bovino (SFB), 40% de RPMI e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). O material foi transferido para criotubos acondicionados em *container* contendo álcool isopropílico (Mr. Frost Nalgene® Nunc.) e diretamente levados ao freezer -80°C.

O descongelamento destas células foi realizado por imersão do criotubo em banho-maria a 37°C e em seguida ressuspensão com 10mL de RPMI a 10% de SFB, lavado duas vezes a 453 x G por 10 minutos, o *pellet* ressuspensão em 1 mL e determinada viabilidade por meio da contagem de células coradas pelo Azul de Tripán (0,4%) em Câmara de Neubauer.

3.7. Cultura e estimulação das células para linfoproliferação

As células mononucleares dos pacientes e dos controles foram cultivadas em microplacas de fundo plano de 96 orifícios, a uma densidade de 2×10^5 /mL em meio RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro humano AB, L-glutamina e estimuladas pelo mitógeno Pokeweed (PWM, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) na concentração de 5 µg/mL sendo utilizado como controle positivo da resposta linfoproliferativa, pelo antígeno metabólico de *Candida sp.* (CMA, Greer Laboratories, EUA) na concentração de 5 µg/mL, pelo extrato de *T. rubrum* (10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/ml e 0,62 µg/ml) inicialmente e pelo peptídeo do *T. rubrum* (YIIDTGIDID) a partir da concentração mãe de 750 mM nas diluições de 120 mM; 60 mM; 30 mM; 15 mM (Invitrogen Corporation, EUA), durante seis dias em estufa a 37°C e 5% de CO². Cerca de 18 horas antes do tempo previsto para o término do cultivo (144 horas), foram adicionados $3,7 \times 10^{-2}$ mBq (1 µCi) de timidina tritiada (³H-TdR) (Amersham International, UK), diluída em meio de cultura (RPMI-1640). Ao final da incubação as células

foram coletadas em membrana de fibra de vidro (Wallac) através de um coletor de células (Cell Harvester, Perkin Elmer, EUA). Depois de secos, os níveis do radioisótopo incorporados na membrana foram quantificados com o auxílio de um contador de radiação beta (Wallac Micro Beta 1450, Maryland, EUA). Os resultados das culturas foram apresentados pela média aritmética das triplicatas dos poços estimulados, divididos pela medida aritmética das triplicatas não estimuladas e expressos como índice de estimulação (I.E.).

3.8. Cultura e estimulação das células para avaliação de moléculas de superfície

As células mononucleares do grupo de pacientes e do grupo controle foram cultivadas em placas de fundo plano com 24 orifícios, a uma densidade de 2×10^6 /mL em meio RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro humano AB, L-glutamina e estimuladas com PMA e Ionomicina na concentração de 50 ng/mL e 1 μ g/mL, respectivamente, por poço pelo período de 6 horas, estimuladas também pelo peptídeo do *T. rubrum* (YIIDTGIDID) a partir da concentração mãe de 750mM na diluição de 1/12,5 (Invitrogen Corporation, EUA) e o extrato fúngico durante 6 dias, em estufa à 37°C e 5% CO². Em cada poço foi adicionado 0,4 μ L das moléculas co-estimulatórias CD28 e CD49d, incluindo a condição basal. Após este período, as células foram coletadas para marcação extracelular e a avaliação das moléculas de superfície foi realizada por citometria de fluxo. Foram utilizados dois poços a mais para cada indivíduo, nos estímulos pelo peptídeo do *T. rubrum* e os extratos fúngicos para posterior coleta de sobrenadante.

3.9. Caracterização fenotípica por citometria de fluxo

3.9.1. Método de análise

Para análise de frequência de células Th17 e das células Tc17 foram utilizadas células não marcadas com fluorocromos para ajuste de voltagem dos *lasers* no citômetro e em seguida realizada a compensação (subtração da interferência de uma cor na outra) onde são utilizadas microesferas marcadas com os anticorpos monoclonais a serem utilizados nos ensaios. A partir do *gate* (região de interesse selecionada) com as microesferas (Figura 13A) delimita-se dois picos (negativo e positivo) para cada fluorocromo (Figura 13B).

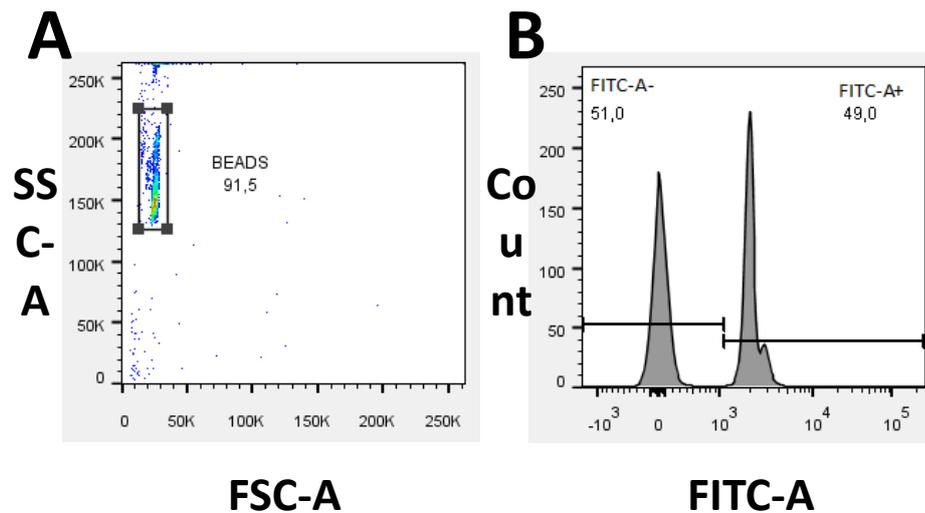


Figura 13: Métodos de compensação automática no FlowJo X com esferas magnéticas. A) Gráfico em *dotplot* demonstrando *gate* para seleção de esferas magnéticas. B) Histograma exemplificando o método de compensação automática para o fluorocromo FITC-A onde se demonstra a delimitação do pico de esferas negativas (pico esquerdo) e positivas (pico direito).

3.9.2. Estratégia de análise das células Th17 e Th17_{MEM} e Tc17 e Tc17_{MEM}

Foram retiradas as possíveis interferências e oscilações do *laser* (Time), possíveis agrupamentos celulares (*Singlet's*) e utilizado o fluorocromo Live/DEAD® como um marcador de viabilidade celular (Figura 14 A, B e C respectivamente). A caracterização das células Th17, Th17_{MEM}, Tc17 e Tc17_{MEM} foram obtidas através da seleção da população de linfócitos obtidos pelos parâmetros de tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) (Figura 14D) onde para delimitação do *gate* foi utilizado o recurso *Contour Plot* para melhor visualização das populações celulares (Figura 14E). Após delimitar a população de linfócitos, segue-se a análise pela expressão da proteína de superfície celular CD3 (Figura 14F) seguida da seleção de linfócitos T CD8- e T CD8+ (Figura 14G) avaliando em cada população o ancoramento da citocina IL-17A na molécula IL-17F presente na membrana dos linfócitos T (Figura 14H), formando assim um heterodímero. Foi avaliado também o ancoramento da citocina IL-17A nas células CD45RO+ e CD45RO- (Figura 14 I, J e K) dentro de cada população de células T, tanto negativa quanto positiva de maior intensidade para CD8 (Brucklacher-Waldert *et al.*, 2010). Foi utilizada a análise Booleana do programa FlowJo X para os seguintes fenótipos: CD3+CD8-IL-17A+CD161+CCR6+ para as células Th17; CD3+CD8-CD45RO+IL-17A+CD161+CCR6+ para as células Th17_{MEM}; CD3+CD8+IL-17A+CD161+CCR6+ para as células Tc17; CD3+CD8+CD45RO+IL-17A+CD161+CCR6+ para as células Tc17_{MEM}.

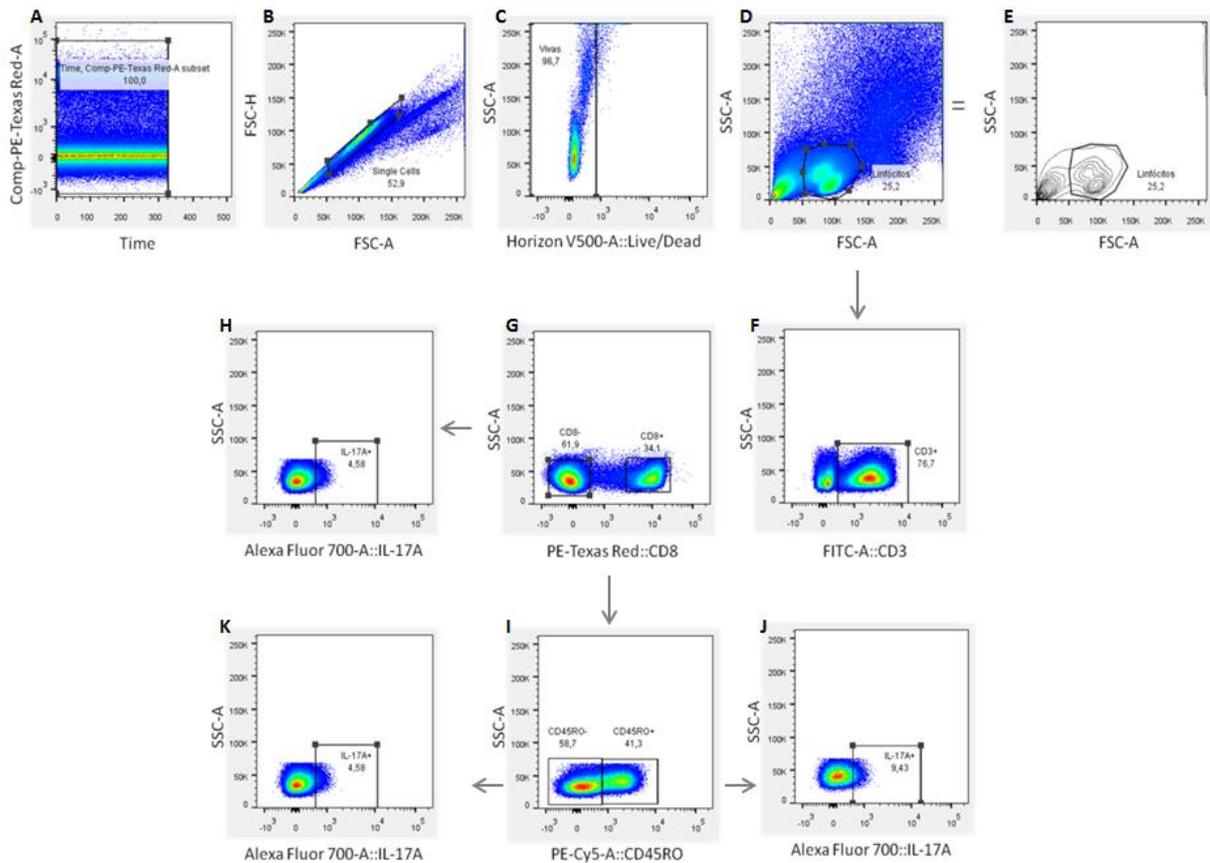


Figura 14: Estratégia de análise para caracterização das células Th17 e das células Tc17. As áreas delimitadas (*gates*) representam as populações consideradas para análise. A purificação da análise foi realizada pela retirada das interferências do laser pelo *gate* Time (A), possíveis agrupamentos celulares através do *gate* Singlets (B), e também utilizado um marcador de viabilidade celular Live/DEAD® (C). Para delimitar a população de linfócitos foram utilizados os parâmetros de tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) (D) sendo utilizado o recurso *Contour Plot* para melhor delimitar a população desejada (E). Dentro da população de linfócitos, selecionaram-se as células que expressam a molécula CD3 em sua superfície (F), seguido da seleção de linfócitos T CD8- e T CD8^{high} (G) onde foi avaliado a frequência de células Th17 no fenótipo CD3+CD8- e a frequência de células T citotóxicas com o fenótipo CD3+CD8^{high} que apresentam a citocina IL-17A ancorada em sua membrana (H). Foram avaliadas também as populações de células CD45RO+ e CD45RO- dentro de cada população de célula T (I), analisando a frequência de células T expressando a IL-17A presentes dentro de cada população seguindo os seguintes fenótipos: CD3+CD8-CD45RO+ e CD3+CD8-CD45RO-, CD3+CD8^{high}CD45RO+ e CD3+CD8^{high}CD45RO- (J e K).

3.9.3. Imunobloqueio

As células retiradas da cultura foram lavadas com salina tamponada com fosfato (PBS) 1% BSA a 453 x G por 5 minutos e realizado imunobloqueio com solução de 20 µL de imunoglobulina intravenosa na concentração 100 mg/mL em 500 µL de solução salina isotônica e posteriormente incubadas por 20 minutos a 4°C na ausência de luz. Após o tempo de incubação foram lavadas a 453 x G por 5 minutos e desprezado o sobrenadante por inversão.

3.9.4. Viabilidade Celular

Para determinar a viabilidade celular, as células foram marcadas em sua superfície com o fluorocromo Live/DEAD®, incubado por 30 minutos a 4°C na ausência de luz. Após o período de incubação as células foram lavadas a 453 x G por 5 minutos e desprezado o sobrenadante por inversão.

3.9.5. Marcação extracelular

As células foram marcadas com anticorpos CD3, CD8, CD45RO, IL-17A, CD161 e CD196 e incubadas por 30 minutos a 4°C na ausência de luz. Após o tempo de incubação foram lavadas a 453 x G por 5 minutos e ressuspensas com 500 µL de PBS com 100 µL de paraformaldeído para fixação das células (Quadro 1).

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Fabricante	Volume de uso
Anti-CD3	APC-Cy7	mouse	BD Pharmingen	5µL
Anti-CD8	Texas Red	mouse	BD Biosciences	0,63µL
Anti-CD45RO	FITC	mouse	BD Biosciences	5µL
Anti-IL-17A	Alexa Fluor 700	mouse	BD Pharmingen	1µL
Anti-CD196	PE-Cy7	mouse	BD Biosciences	0,31µL
Anti-CD161	PE-Cy5	mouse	BD Biosciences	2,5µL

Quadro 1: Relação dos anticorpos monoclonais utilizados para marcação extracelular das células Th17, Th17_{MEM}, Tc17 e Tc17_{MEM}

3.9.6. Estratégia de análise dos receptores de Lectina do tipo C

A caracterização dos receptores de Lectina do tipo C foi obtida através da seleção da população de monócitos obtidos pelos parâmetros de tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) (Figura 15A) onde para delimitação do *gate* foi utilizado o recurso *Contour Plot* para melhor visualização das populações celulares (Figura 15B) e pela expressão da proteína de superfície celular CD14 (Figura 15C) e a partir desta população histogramas dos receptores: CD206 (receptor de manose), Dectin 1 e Dectin 2 (Figura 15 D, E e F, respectivamente) com o *gate* dividindo a população negativa (esquerda) da população positiva (direita).

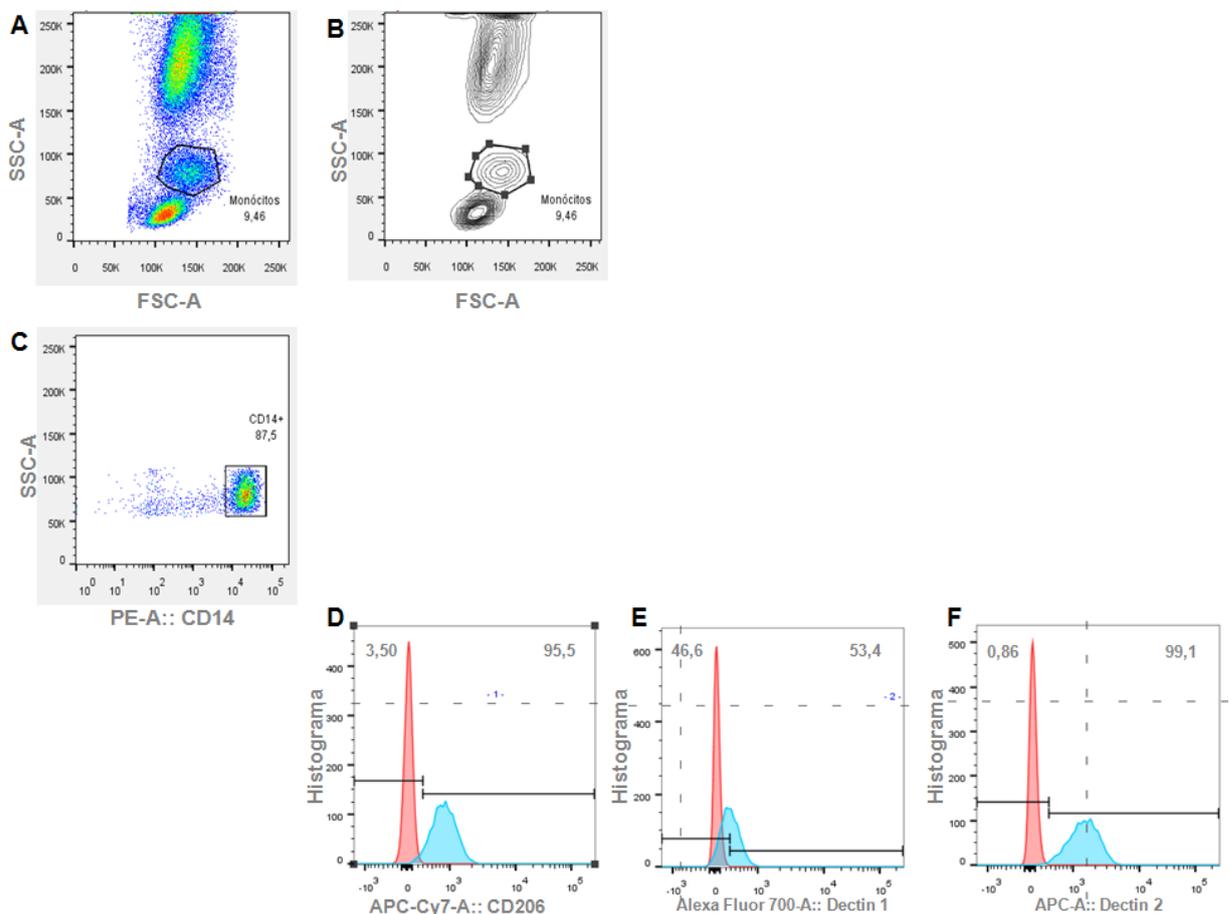


Figura 15: Estratégia de análise dos receptores de Lectina do tipo C. Gráfico de pontos *dot plot* com parâmetros de tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) selecionada a população de monócitos (A) que para delimitação do *gate*, foi utilizado o recurso *Contour Plot* para melhor visualização da população desejada (B). Gate da população com expressão da molécula CD14 (C). Dentro da população CD14+ histogramas demonstrando os receptores de Lectina do tipo C: CD206 (receptor de manose), Dectin 1 e Dectin 2 (D, E e F, respectivamente).

3.9.7. Avaliação dos Receptores de Lectina do tipo C

Foram coletados 4 mL de sangue periférico em tubo EDTA de pacientes e controles, para avaliação dos receptores de Lectina do tipo C onde as células foram caracterizadas pelos fenótipos: CD14+CD206+, CD14+Dectin1+ e CD14+Dectin2+ (Quadro 2) para ensaio por citometria de fluxo e FMO para CD206, Dectin 1 e Dectin 2 para determinação dos *gates*.

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Fabricante	Volume de uso
Anti-CD14	PE	mouse	BD Pharmingen	1µL
Anti-CD206	APC-Cy7	mouse	BD Pharmingen	0,15µL
Anti-Dectin1	Alexa Fluor 700	mouse	BD Pharmingen	2,5µL
Anti-Dectin2	APC	mouse	BD Pharmingen	1,25µL

Quadro 2: Relação dos anticorpos monoclonais utilizados para marcação dos receptores de Lectina do tipo C.

3.9.8. Lise de hemácias e marcação extracelular

Foi realizada a marcação de anticorpos monoclonais em 70 µL de sangue total, incubados por 20 minutos em temperatura ambiente na ausência de luz. Para lise de hemácias, após o período de incubação foi adicionado 250 µL de solução de lise *OptiLyse® C* (BECKMAN COULTER) e incubado por mais 20 minutos em temperatura ambiente na ausência de luz. Realizada lavagem a 453 x G por 5 minutos foi adicionado 750 µL de solução isotônica e incubada por 15 minutos, temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após este período foram realizadas duas lavagens com 1 mL de PBS. Para fixação, as células foram ressuspensas com 500 µL de solução isotônica com 100 µL de paraformaldeído.

3.10. Análise de Frequência

Para a expressão da frequência (%) de cada população celular, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{frequência da população estudada}}{100} \times \text{n}^\circ \text{ de células da população de linfócitos(monócitos)}$$

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção e padronização dos extratos antigênicos de *Trichophyton rubrum*

4.1.1. Solubilização do extrato de *Trichophyton rubrum* congelado

4.1.1.1. Quantificação de proteínas totais

A dosagem de proteínas totais foi quantificada pela técnica de Bradford (Quadro 3).

Extratos	Conc. Proteína	Volume final
Extrato TR1	5 µg/mL	65 mL
Extrato TR2 - pós diálise	36,22 µg/mL	12,5 mL
Extrato TR3		
1ª alíquota	205 µg/mL	20 mL
2ª alíquota	171 µg/mL	5 mL
concentrado	1.952,5 µg/MI	470 mL
diluído 1	174,8 µg/mL	950 mL
diluído 2	23,38 µg/mL	1 mL

Quadro 3: Dosagem de Proteínas totais pela técnica de Bradford e dosagem do pH

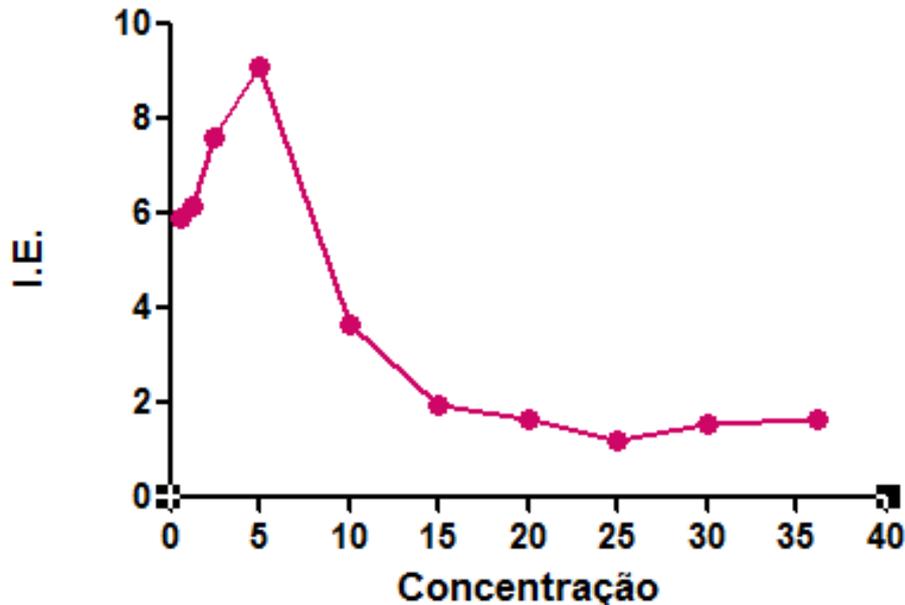
4.1.1.2. Linfoproliferação

4.1.1.2.1. Extrato TR2 – pós diálise

Para avaliação da linfoproliferação celular frente ao Extrato TR2 – pós diálise, foi utilizada a seguinte curva de concentração: 36,22 µg (PURO), 30 µg, 25 µg, 20 µg, 15 µg, 10 µg, 5 µg, 2,5 µg, 1,25 µg e 0,75 µg. O índice de estimulação (I.E.) para as respectivas concentrações foram de: 1,68; 1,55; 1,23; 1,65; 1,94; 3,68; 9,11; 7,61; 6,15 e 5,9. Considerando, um I.E., acima de 3 como responsivo, observa-se que o Extrato TR2 – pós diálise possui a capacidade de indução de linfoproliferação nas concentrações que variam de 10 µg/mL a 0,62

$\mu\text{g/mL}$ conforme cultura realizada com um indivíduo controle imunocompetente e sensibilizado ao *T. rubrum* pelo período de 6 dias (Gráfico 1).

Gráfico 1: Linfoproliferação de 6 dias com o Extrato TR2 - *T. rubrum* pós diálise



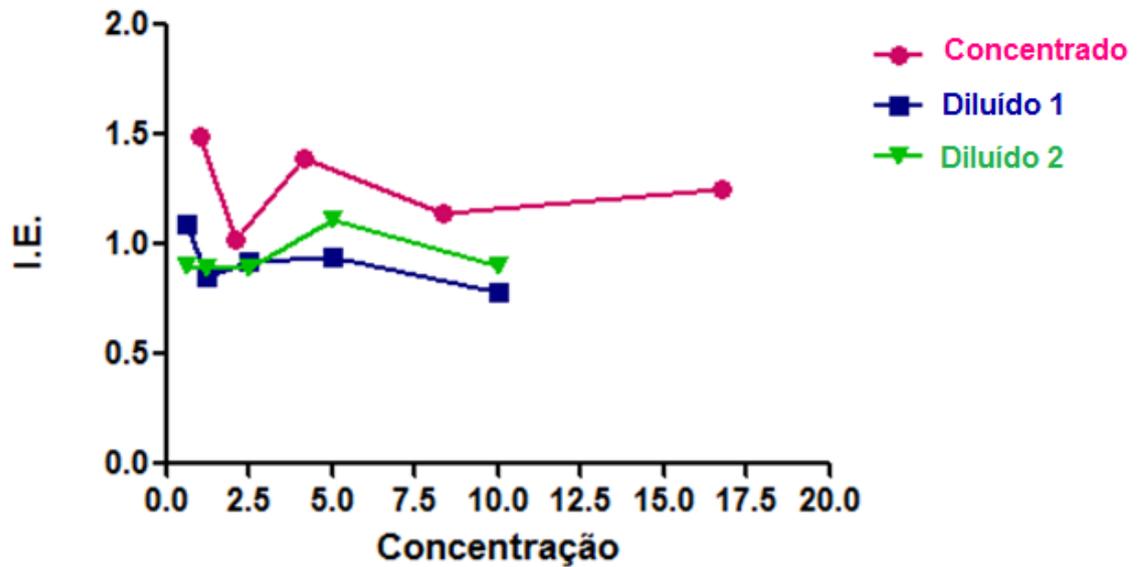
4.1.1.2.2. Extrato TR3 – concentrado, diluído 1 e diluído 2

Neste experimento foram analisados os seguintes extratos: Extrato TR3 - concentrado, diluído 1 e diluído 2, com uma curva de concentração em diluição seriada variando de $10 \mu\text{g/mL}$ a $0,62 \mu\text{g/mL}$. Os I.E., para cada concentração em cada extrato foram expressos no Quadro 4. Observa-se que independente da concentração utilizada, os extratos não se mostraram bons estimuladores obtendo-se, um I.E., abaixo de 3 (Gráfico 2).

Índice de Estimulação (I.E.)					
Extrato TR3 - <i>T. rubrum</i>	Concentração				
	10 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	2,5 $\mu\text{g/mL}$	1,25 $\mu\text{g/mL}$	0,62 $\mu\text{g/mL}$
concentrado	1,25	1,14	1,39	1,02	1,49
diluído 1	0,78	0,94	0,92	0,85	1,09
diluído 2	0,90	1,11	0,89	0,89	0,90

Quadro 4: Índices de estimulação (I.E.) do Extrato TR3 - *T. rubrum* concentrado, diluído 1 e diluído 2 da cultura de linfócitos de 6 dias.

Gráfico 2: Linfoproliferação de 6 dias com o Extrato TR3 - *T. rubrum* concentrado, diluído 1 e diluído 2



4.1.2. Extratos Tindalizados G1 e G2

4.1.2.1. Quantificação de proteínas totais

Extratos	Concentração de Proteína	Volume final	pH
Extrato Tindalizado G1	77,64 µg/mL	45 mL	7,3
Extrato Tindalizado G2	128,84 µg/mL	45 mL	7,1

Quadro 5: Concentração de proteínas do extrato tindalizado

4.1.2.2. Linfoproliferação

Conforme dados de I.E. representados no Quadro 6, o Extrato Tindalizado G1 obteve, um I.E. considerado positivo, para as todas as concentrações em relação ao indivíduo controle 1 e nas concentrações 5 µg/mL, 2,5 µg/mL e 0,31 µg/mL em relação ao indivíduo controle 2 (Gráfico 3).

Quanto ao Extrato Tindalizado G2 observamos que, apenas o indivíduo controle 1 obteve, I.E., considerados positivos para todas as concentrações testadas em relação ao indivíduo controle 2 (Gráfico 4).

Índice de Estimulação (I.E.)							
Extrato Tindalizado	Controle	Concentração					
		10 µg/mL	5 µg/mL	2,5 µg/mL	1,25 µg/mL	0,62 µg/mL	0,31 µg/mL
G1	1	8,68	15,38	23,00	3,66	9,18	11,22
	2	2,63	5,55	8,70	0,99	2,58	3,20
G2	1	3,35	5,93	3,07	3,21	5,51	4,93
	2	2,20	0,92	0,49	0,64	0,62	0,73

Quadro 6: Índices de estimulação (I.E.) obtidos após estimulação do pelo Extrato Tindalizado G1 e G2 da cultura de linfócitos de 6 dias.

Gráfico 3: Linfoproliferação de 6 dias com o Extrato Tindalizado G1

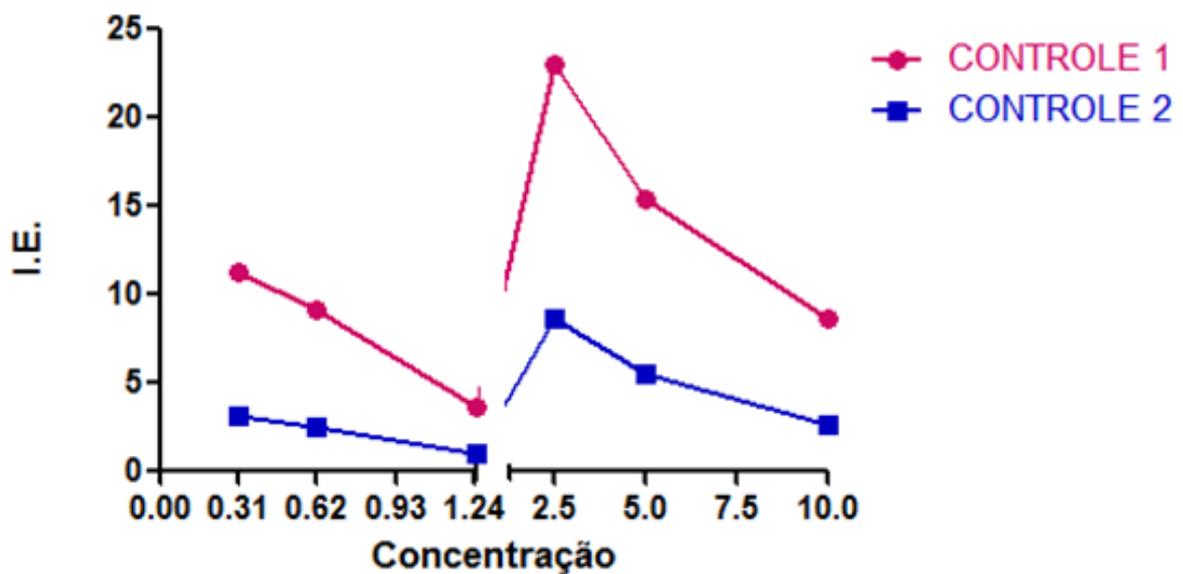
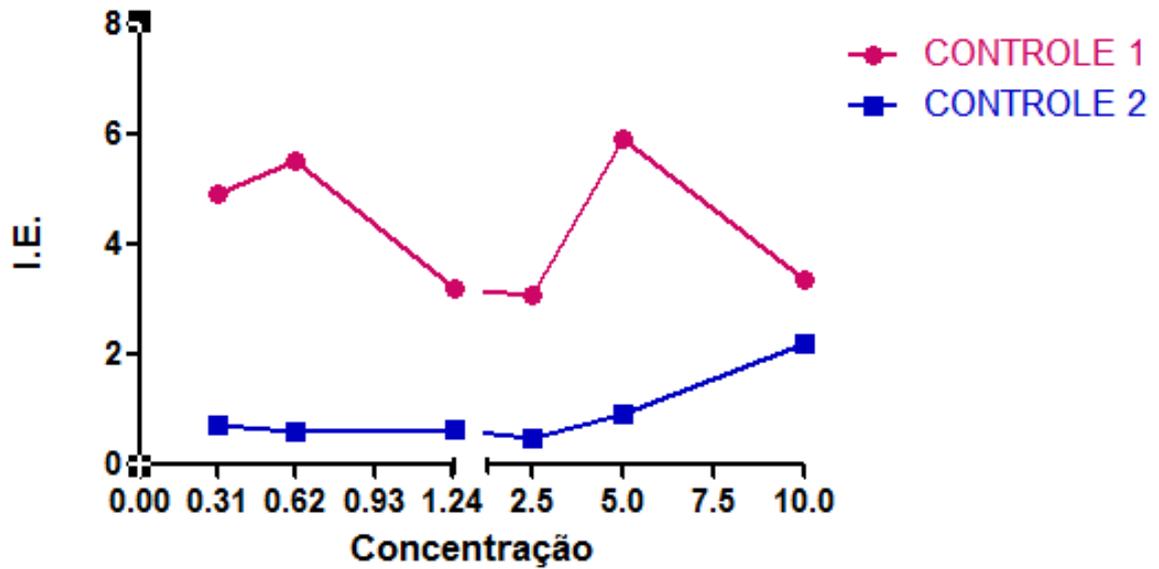


Gráfico 4: Linfoproliferação de 6 dias com o Extrato Tindalizado G2

4.1.3. Extratos obtidos com Líquido de Coca 1 e 2

4.1.3.1. Quantificação de proteínas totais

Extratos	Concentração de Proteína	Volume final	pH
Extrato com Líquido de Coca 1	52 µg	1 mL	7,5
Extrato com Líquido de Coca 2	69,32 µg	1 mL	6,8

Quadro 7: Concentração de proteínas do extrato obtido por líquido de Coca

4.1.3.2. Linfoproliferação

Podemos observar no Quadro 8 que o Extrato com Líquido de Coca 1 obteve altos I.E., tanto para o indivíduo controle 1 quanto para o indivíduo controle 2, mostrando-se um extrato com boa capacidade de indução de proliferação (Gráfico 5 e 6).

Índice de Estimulação (I.E.)							
Extratos	Controle	Concentração					
		10 µg/mL	5 µg/mL	2,5 µg/mL	1,25 µg/mL	0,62 µg/mL	0,31 µg/mL
Líquido de Coca 1	1	104,17	169,49	161,08	122,14	123,98	173,36
	2	23,77	58,11	25,13	31,92	51,77	58,14
Líquido de Coca 2	1	10,00	11,01	9,00	3,29	2,29	5,59
	2	2,50	1,36	1,24	0,65	0,45	1,26

Quadro 8: Índices de estimulação (I.E.) obtidos após estimulação pelo do Extrato obtido com Líquido de Coca 1 e 2 da em cultura de linfócitos de 6 dias.

Gráfico 5: Linfoproliferação de 6 dias com o Extrato Líquido de Coca 1

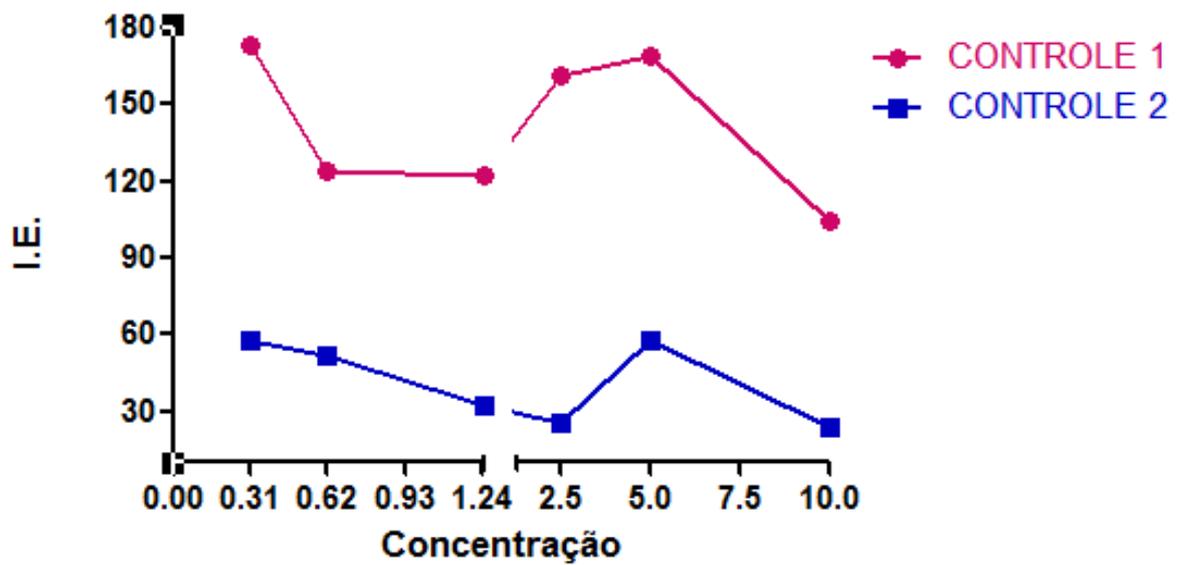
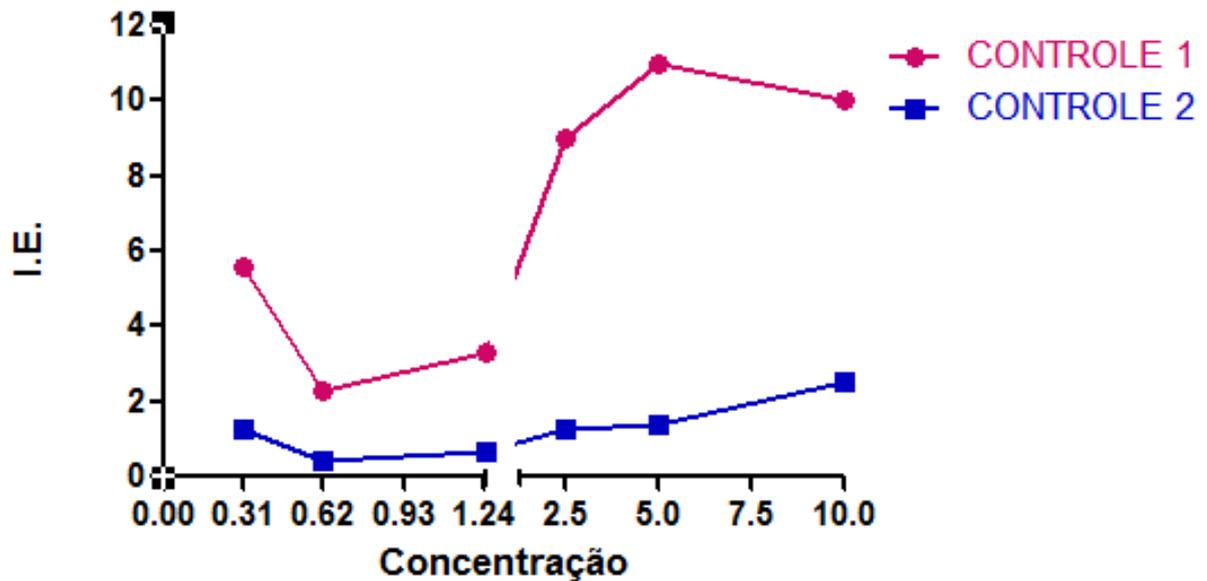


Gráfico 6: Linfoproliferação de 6 dias com o Extrato Líquido de Coca 2

4.1.4. Extratos obtidos com Ácido Tricloroacético (TCA)

4.1.4.1. Extração Meta 1, Meta 2 e Meta 3

4.1.4.1.1. Quantificação de proteínas totais

Extratos	Concentração de Proteína	Volume final	pH
Extrato com TCA - Meta 1	58,44 µg/mL	50 mL	7
Extrato com TCA - Meta 2	233,96 µg/mL	1 mL	7,2
Extrato com TCA - Meta 3	89,8 µg/mL	45 mL	7,5

Quadro 9: Concentração de proteínas do extrato obtido com ácido tricloroacético (TCA)

4.1.4.1.2. Linfoproliferação

Para este ensaio foram utilizados 2 indivíduos controles imunocompetentes e sensibilizados pelo *T. rubrum* para linfoproliferação de 6 dias com os extratos: Meta 1, Meta 2 e Meta 3. Os I.E. demonstrados (Quadro 10) indicando, os I.E., para cada concentração em cada extrato fúngico. Nota-se que houve uma tendência de comportamento nos 3 extratos analisados onde, o extrato Meta 1 se mostrou melhor respondedor entre as concentrações de 2,5 µg/mL a

10 µg/mL em relação ao indivíduo controle 1, e 5 µg/mL e 10 µg/mL em relação ao indivíduo controle 2 (Gráfico 7).

Os extratos Meta 2 e Meta 3 não alcançaram, um I.E., acima de 3 para os 2 indivíduos controles, o que significa dizer que estes extratos não demonstraram a capacidade de indução de resposta linfoproliferativa (Gráfico 8 e Gráfico 9).

Índice de Estimulação (I.E.)							
Extrato com TCA	Controle	Concentração					
		10 µg/mL	5 µg/mL	2,5 µg/mL	1,25 µg/mL	0,62 µg/mL	0,31 µg/mL
Meta 1	1	6,55	14,49	4,59	2,08	1,78	2,24
	2	4,92	8,62	1,61	1,14	1,34	1,24
Meta 2	1	2,14	1,1	1,25	1,6	1,05	1,69
	2	1,9	0,6	0,94	1,06	0,79	1,02
Meta 3	1	1,56	0,65	2,16	1,97	2,58	0,94
	2	1,17	0,59	1,2	1,48	1,94	0,6

Quadro 10: Índices de estimulação (I.E.) obtidas após estimulação do pelo Extrato obtido com TCA - Meta 1, Meta 2 e Meta 3 da cultura de linfócitos de 6 dias.

Gráfico 7: Linfoproliferação de 6 dias com o Extrato obtido com TCA - Meta 1

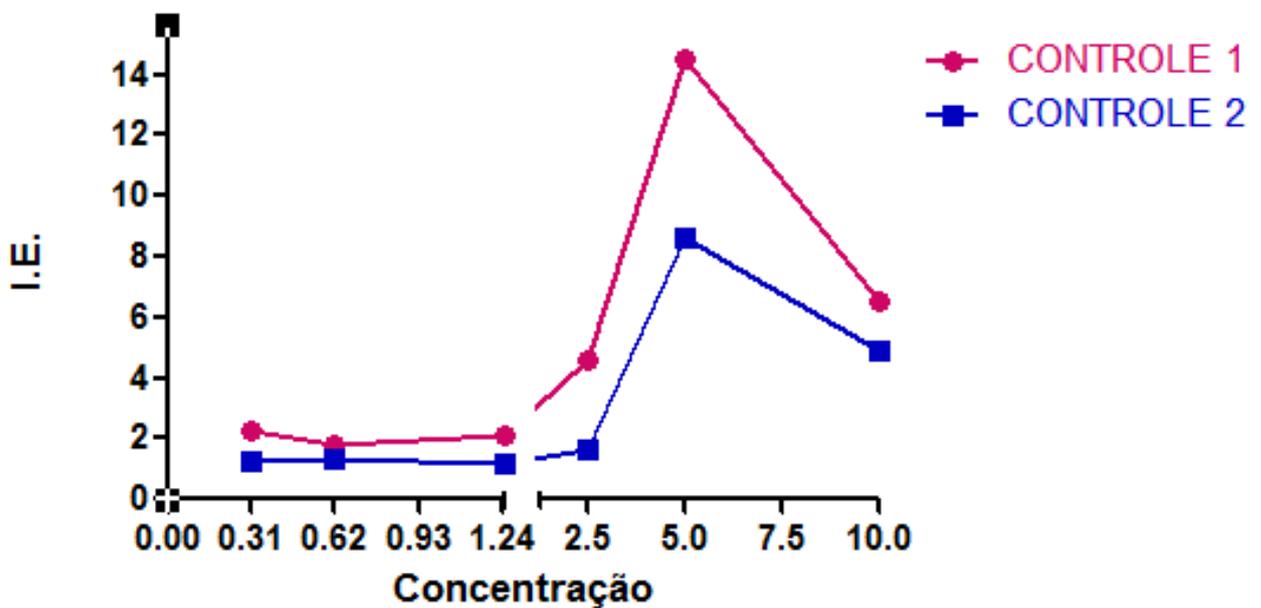


Gráfico 8: Linfoproliferação de 6 dias com o Extrato obtido com TCA - Meta 2

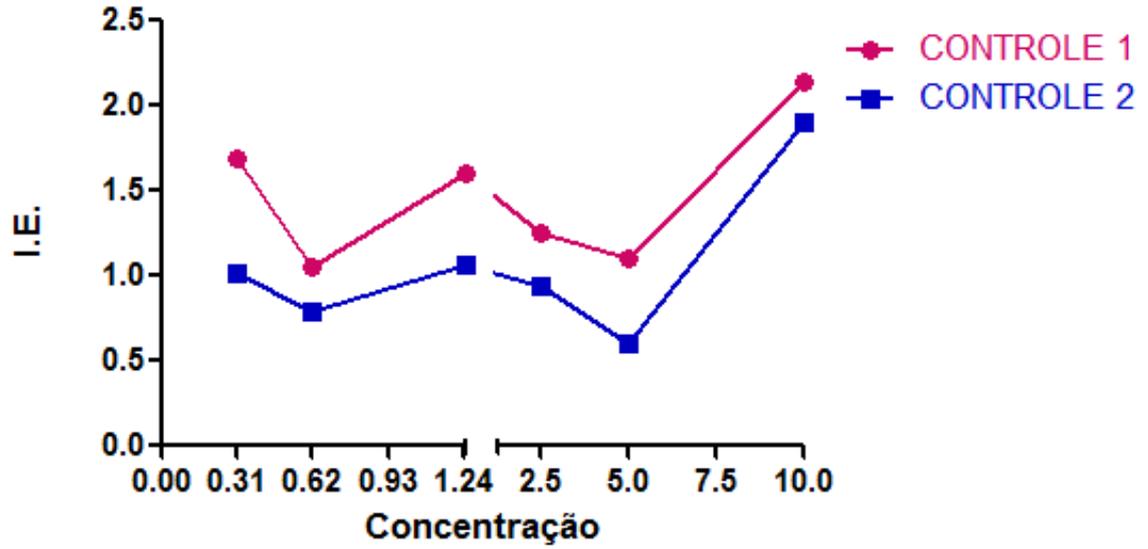
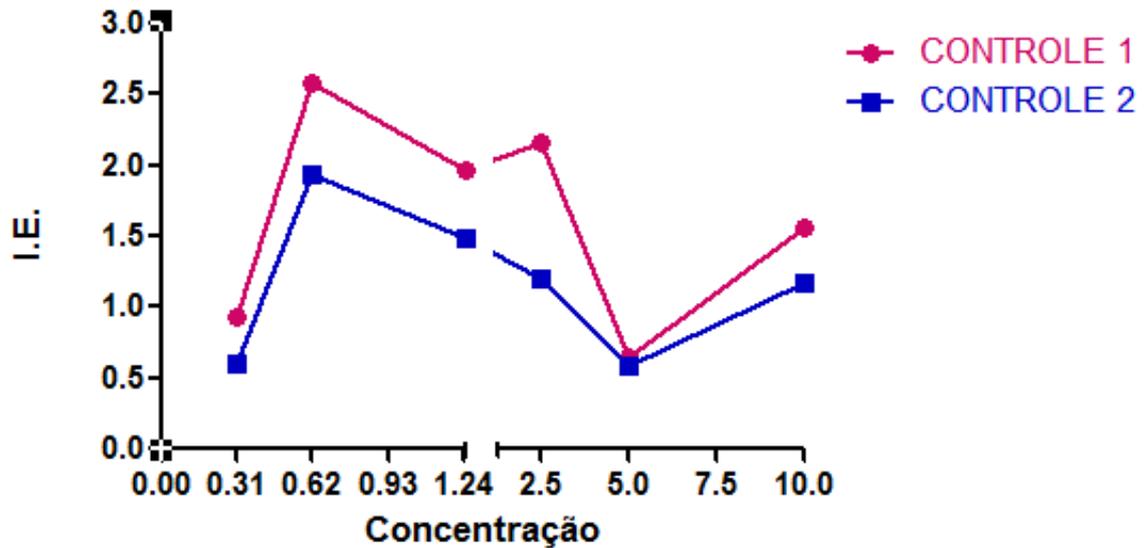


Gráfico 9: Linfoproliferação de 6 dias com o Extrato obtido com TCA - Meta 3



4.1.4.2. Extração Bruto 1, Bruto 2 e Bruto 3

4.1.4.2.1. Quantificação de proteínas totais

Extratos	Concentração de Proteína	Volume final	pH
Extrato com TCA - Bruto 1	182,16 µg	1 mL	7
Extrato com TCA - Bruto 2	133,96 µg	1 mL	7
Extrato com TCA - Bruto 3	205,64 µg	1 mL	7

Quadro 11: Concentração de proteínas dos extratos brutos obtidos por extração com TCA

4.1.4.2.2. Linfoproliferação

Os I.E. obtidos, após estimulação com os Extratos TCA - Bruto 1, Bruto 2 e Bruto 3 foram expressos no Quadro 12, indicando os I.E. obtidos pela estimulação com os extratos e suas respectivas concentrações.

Considerando os valores de I.E. acima de 3, observou-se que apesar do Extrato Bruto 1 não ter índices satisfatórios (Gráfico 10), os extratos Bruto 2 e Bruto 3 demonstraram possuir a capacidade de estímulo nas concentrações de 5 µg/mL a 0,31 µg/mL para o controle 1 enquanto que, para o controle 2 não houve resposta linfoproliferativa (Gráfico 11 e 12).

Índice de Estimulação (I.E.)							
Extrato com TCA	Controle	Concentração					
		10 µg/mL	5 µg/mL	2,5 µg/mL	1,25 µg/mL	0,62 µg/mL	0,31 µg/mL
Bruto 1	1	1,00	2,56	2,61	1,23	0,88	2,92
	2	0,63	1,28	1,53	1,04	0,66	1,30
Bruto 2	1	1,36	3,32	5,68	5,16	5,24	3,56
	2	0,77	1,26	2,15	1,95	1,98	1,35
Bruto 3	1	2,70*	3,07	5,19	6,69	5,30	3,29
	2	1,02	1,16	1,97	2,53	2,01	1,24

Quadro 12: Índices de estimulação (I.E.) do Extrato com TCA - Bruto 1, Bruto 2 e Bruto 3 da cultura de linfócitos de 6 dias.

Gráfico 10: Linfoproliferação de 6 dias com o Extrato TCA - Bruto 1

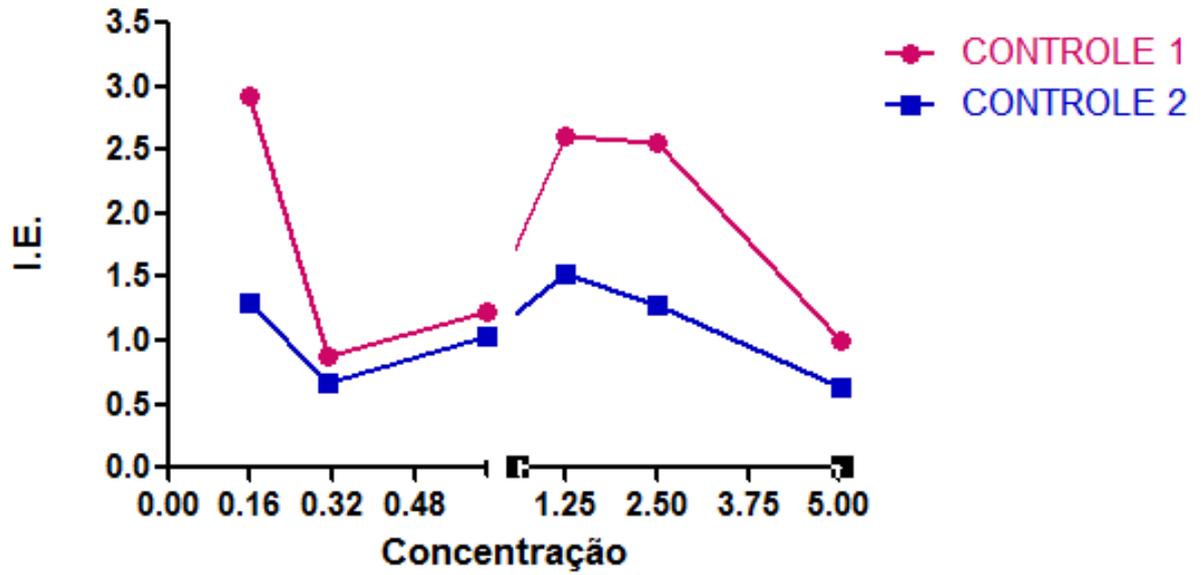


Gráfico 11: Linfoproliferação de 6 dias com o Extrato com TCA - Bruto 2

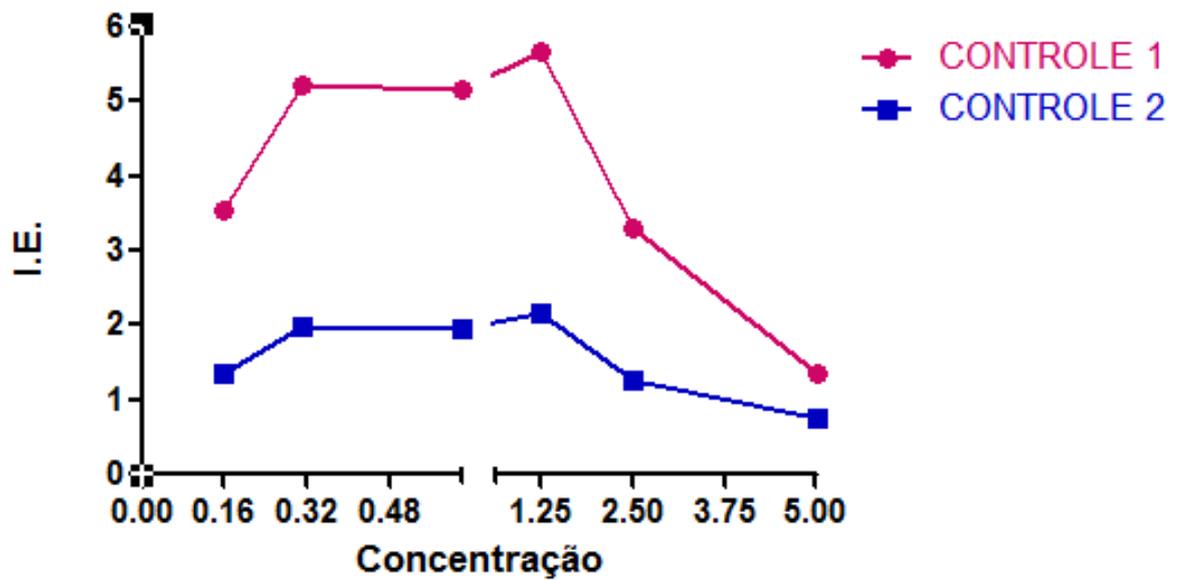
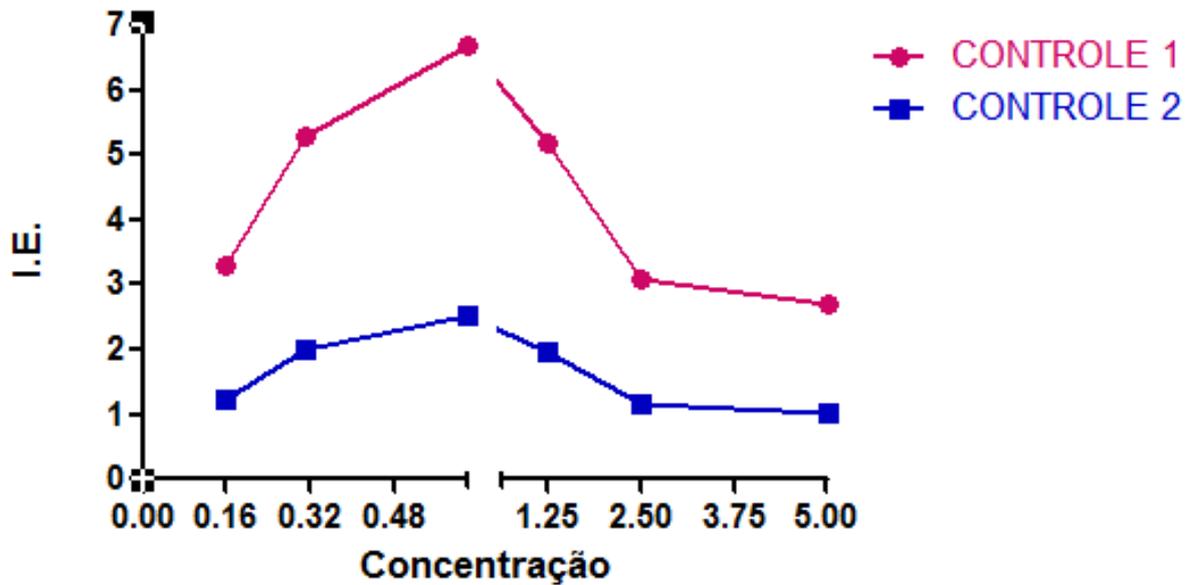


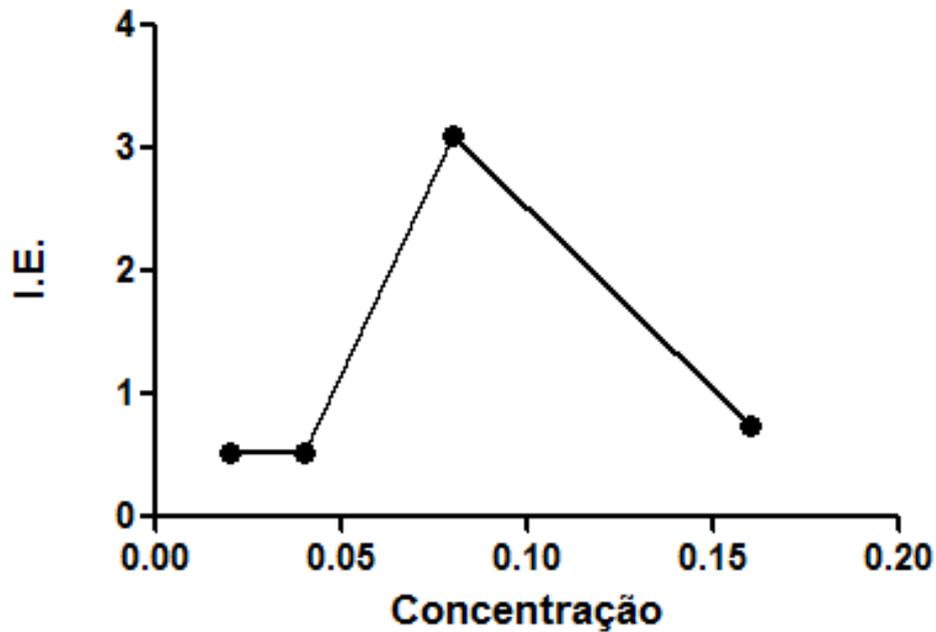
Gráfico 12: Linfoproliferação de 6 dias com o Extrato TCA - Bruto 3



4.1.5. Curva dose-resposta ao Peptídeo (YIIDTGIDID)

Para determinação da concentração a ser utilizada nos ensaios funcionais, foi realizado ensaio de linfoproliferação com o peptídeo antigênico imunodominante sintetizado (YIIDTGIDID) do fungo *Trichophyton rubrum*, a partir da concentração mãe de 750 mM nas diluições de 120 mM; 60 mM; 30 mM; 15 mM (Invitrogen Corporation, EUA). Em ensaio realizado com um controle imunocompetente e sensibilizado ao *T. rubrum*, observou-se que em uma curva dose-resposta nas concentrações: 0,02 μ M, 0,04 μ M, 0,08 μ M e 0,16 μ M; os índices de estimulação (I.E.) obtidos para as respectivas concentrações foram: 0,53; 0,52; 3,11 e 0,74, mostrando que o peptídeo possui a capacidade de indução de resposta linfoproliferativa positiva na concentração de 0,08 μ M (Gráfico 13).

Gráfico 13: Peptídeo do *Trichophyton rubrum* (YIIDTGIDID)



4.1.6. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida – SDS (SDS-PAGE).

Para a corrida eletroforética foram utilizadas as seguintes amostras de extrato fúngico: Extrato com TCA - Meta 1, Extrato tinalizado G1 e Extrato com Líquido de Coca 1, adicionados em duplicatas nas concentrações: 29 $\mu\text{g/mL}$, 46,92 $\mu\text{g/mL}$ e 416 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida nos permitiu observar proteínas do *Trichophyton rubrum* com pesos moleculares aproximados de 70 kDa e 38 kDa (Figura 16).

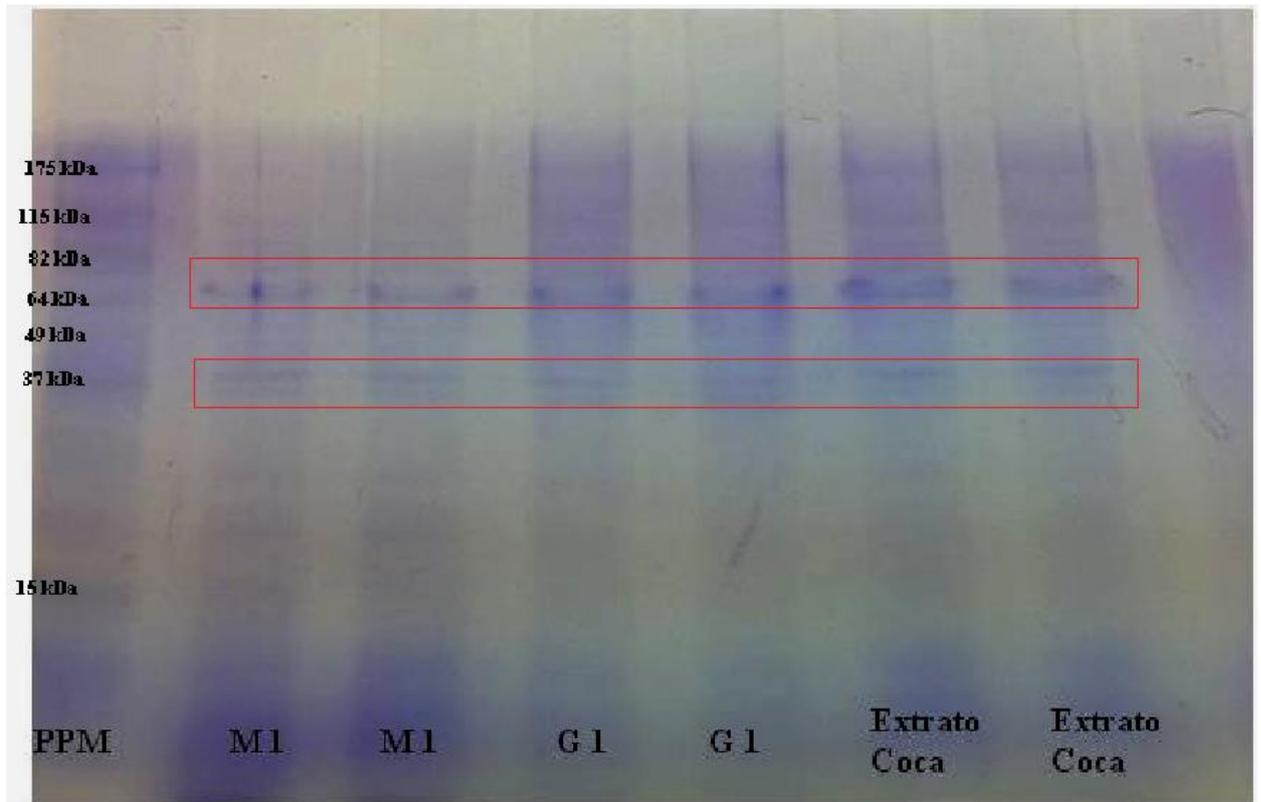


Figura 16: Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) mostrando a presença das proteínas do fungo *Trichophyton rubrum*, apresentando os dados de peso molecular em kDa (quilodaltons). Observam-se proteínas com pesos moleculares de aproximadamente 70 kDa e 38 kDa para os extratos fúngicos: Extrato com TCA - Meta 1, Extrato tindalizado G1 e Extrato com Líquido de Coca 1 em duplicata nas concentrações: 29 $\mu\text{g/mL}$, 46,92 $\mu\text{g/mL}$ e 416 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. PPM = Padrão de Peso Molecular.

4.2. Recrutamento dos indivíduos controle e pacientes

Foram analisados 6 indivíduos controles que apresentaram tineas causadas pelo *Trichophyton rubrum* (Quadro 13 e Figura 17) e 3 pacientes portadores de dermatofitose extensa e/ou persistente causado pelo mesmo dermatófito (Quadro 14 e Figura 18), os quais foram acompanhados pelo período de 1 ano no Ambulatório de manifestações dermatológicas das imunodeficiências primárias (ADEE 3003).

Relação do grupo controle							
INDIVÍDUO	SEXO	IDADE	PESO	PROFISSÃO	LOCAL LESÃO	TRATAMENTO	TEMPO TRATAMENTO
1	Masculino	61	62kg	Construção Civil	Tinea pedis e tinea manuum	Fluconazol + cetononazol creme	6 meses
2	Masculino	69	87kg	Motorista de caminhão	Tinea pedis e tinea manuum	Terbinafina + cetoconazol creme	6 meses
3	Feminino	31	88kg	Trabalho doméstico	Tinea pedis	cetoconazol creme	6 meses
4	Feminino	49	132kg	Trabalho doméstico	Tinea pedis	cetoconazol creme	6 meses
5	Feminino	31	88kg	Trabalho doméstico	Tinea pedis	cetoconazol creme	8 meses
6	Feminino	49	132kg	Serviços gerais	Tinea pedis	Itraconazol e Terbinafina	6 meses

Quadro 13: Relação do grupo controle



Figura 17: Controles diagnosticados com dermatofitose por *T. rubrum*. Indivíduos controle, imunocompetentes com lesões pontuais que obtiveram melhora clínica após o tratamento instituído. *Tinea pedis*, algo descamativo descamativa (A), *tinea interdigital* (B e D) e *tinea pedis* descamativa (C).

RELAÇÃO DOS PACIENTES									
	SEXO	IDADE	PESO	PROFISSÃO	LOCAL LESÃO	TEMPO LESÃO	RECIDIVA	TRATAMENTO	TEMPO TRATAMENTO
1	F	31	88kg	Trabalho doméstico	Face (D), braço e ombro (E), região pélvica e lombar e face posterior pernas (D e E)	15 anos	SIM	Itraconazol e Cetoconazol creme OBS: alergia a Terbinafina	2 anos
2	F	49	132kg	Trabalho doméstico	Região submamária, pélvica e glútea, tornozelos (D e E) e pés (D e E)	49 anos (desde infância), fixa há 5 anos	SIM	Itraconazol e Terbinafina	3 anos
3	M	43	65kg	Polimento e cristalização de carros	Dorso (costas), Mãos (região palmar e dorsal) e Região plantar (D e E)	5 anos	SIM	Terbinafina	1 ano

Quadro 14: Relação dos pacientes



Figura 18: Pacientes diagnosticados com dermatofitose por *T. rubrum*. Pacientes imunocompetentes com dermatofitose causada pelo *Trichophyton rubrum*. *Tinea corporis* face lateral (A, F e H), *tinea corporis* face frontal (B, D e F), *tinea cruris* (C, E, G, I, J e K). Característica das lesões: Lesão com bordas elevadas hiperemiadas, algo descamativa (A-F), lesão hipercrômica (G-I, K) e lesão descamativa com bordas bem delimitadas (J).

4.3. Cultura e estimulação das células para linfoproliferação

4.3.1. Avaliação de marcadores de células Th17 e Th17_{MEM} após estímulo por ativação por antígenos derivados do *T. rubrum* por 6 dias analisados por citometria de fluxo

Com o intuito de se caracterizar as células Th17 com o fenótipo CD3+CD8-IL-17A+CD161+CCR6+, as células Th17_{MEM} com o fenótipo CD3+CD8-CD45RO+IL-17A+CD161+CCR6+ e também avaliar a frequência (%) destas células no grupo de pacientes e no grupo controle, foi realizada cultura de 6 dias utilizando como estímulos: peptídeo YIIDTGIDID do fungo *Trichophyton rubrum*, extrato antigênico Coca 1 e o extrato antigênico Meta 1, demonstrados na tabela X conforme discutiremos abaixo. Para análise consideramos o controle responsivo a todos os estímulos utilizados.

4.3.1.1. Análise comparativa entre os pacientes

Podemos observar (Quadro 15 e Gráfico 15) que após estímulo com o peptídeo YIIDTGIDID o controle se mostrou bom respondedor em relação ao basal e apenas o paciente 1 se mostrou responsivo em relação ao basal e ao controle frente à frequência das células Th17 e Th17_{MEM}.

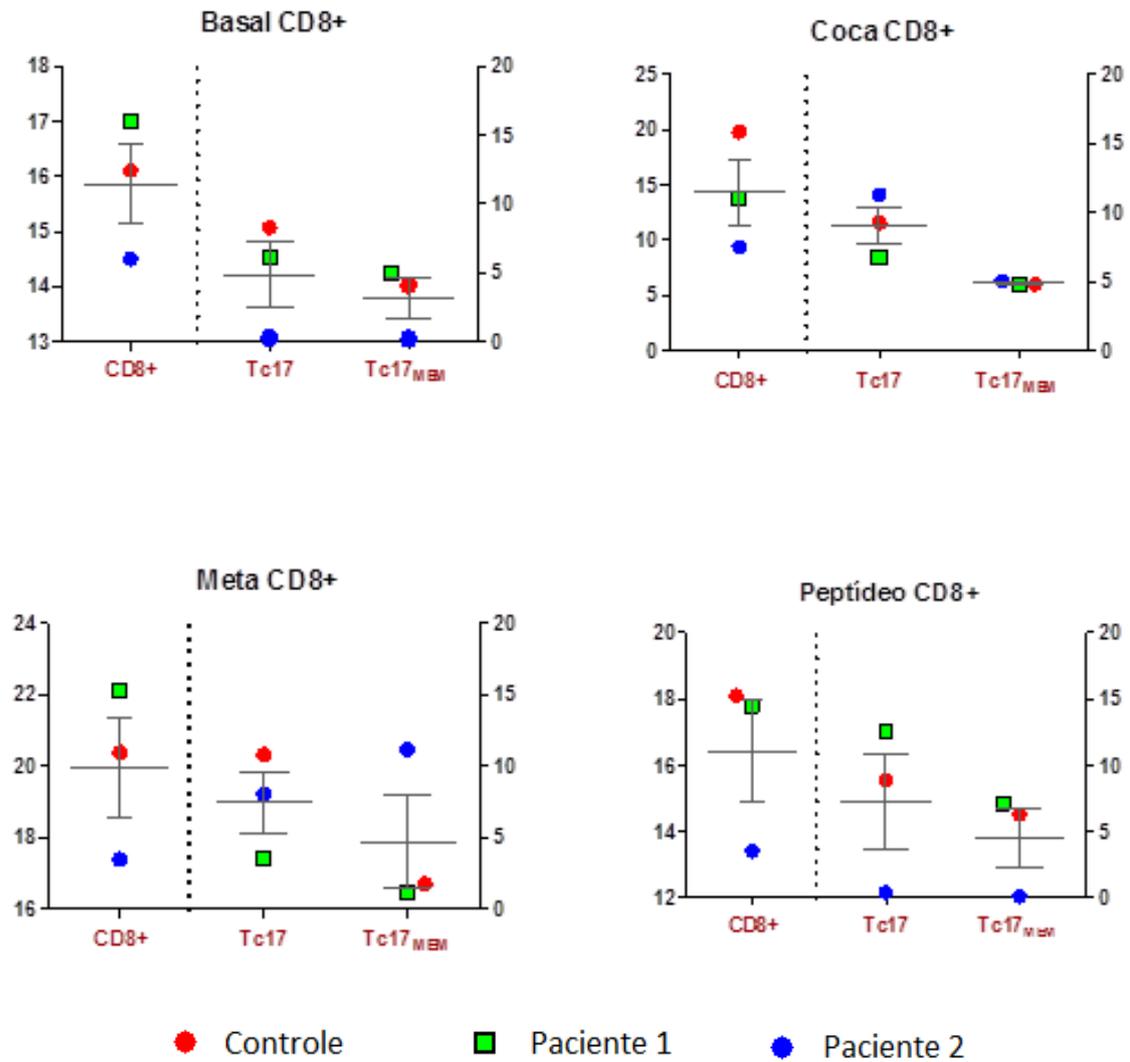
O extrato antigênico Coca se demonstrou bom estimulador para o paciente 1 e 2 quando comparado ao controle na população Th17 e bom estimulador para o paciente 2 em relação ao basal comparado à mesma população. Houve também aumento da frequência da população Th17_{MEM} em relação ao basal.

Em relação ao estímulo com o extrato Meta, apenas o paciente 2 se mostrou bom respondedor, tanto em relação ao basal quanto ao controle.

		Basal		Coca		Meta		Peptídeo	
		Th17	Th17 _{MEM}	Th17	Th17 _{MEM}	Th17	Th17 _{MEM}	Th17	Th17 _{MEM}
Controle		7,48%	4,17%	6,09%	3,34%	3,60%	2,12%	8,40%	5,08%
Pacientes	1	6,80%	3,39%	6,70%	3,61%	1,45%	0,77%	12,30%	5,37%
	2	0,97%	0,67%	8,10%	2,31%	2,11%	7,27%	1,01%	0,34%

Quadro 15: Avaliação de marcadores de células Th17 e Th17_{MEM} após estímulo por ativação por antígenos derivados do *T. rubrum* por 6 dias.

Gráfico 14: Avaliação de marcadores de células Th17 e Th17_{MEM} após estímulo por ativação por antígenos derivados do *T. rubrum* por 6 dias.



4.3.2. Avaliação de marcadores de células Tc17 e Tc17_{MEM} após estímulo por ativação por antígenos derivados do *T. rubrum* por 6 dias analisados por citometria de fluxo

Com o intuito de se caracterizar as células Tc17 com o fenótipo CD3+CD8+IL-17A+CD161+CCR6+, as células Tc17_{MEM} com o fenótipo CD3+CD8+CD45RO+IL-17A+CD161+CCR6+ e também avaliar a frequência (%) destas células no grupo de pacientes e no grupo controle, foi realizada cultura de 6 dias utilizando como estímulos: peptídeo YIIDTGIDID do fungo *Trichophyton rubrum*, extrato antigênico Coca e o extrato antigênico Meta, demonstrados (Quadro 16 e Gráfico 16) conforme discutiremos abaixo. Para análise consideramos o controle responsivo a todos os estímulos utilizados.

4.3.2.1. Análise comparativa entre os pacientes

Ao avaliar as células Tc17 e Tc17_{MEM} de controles e pacientes vimos que: o peptídeo YIIDTGIDID induziu expressão de marcadores de células Tc17 acima do basal para o controle e o paciente 1 em relação às células Tc17 e Tc17_{MEM}.

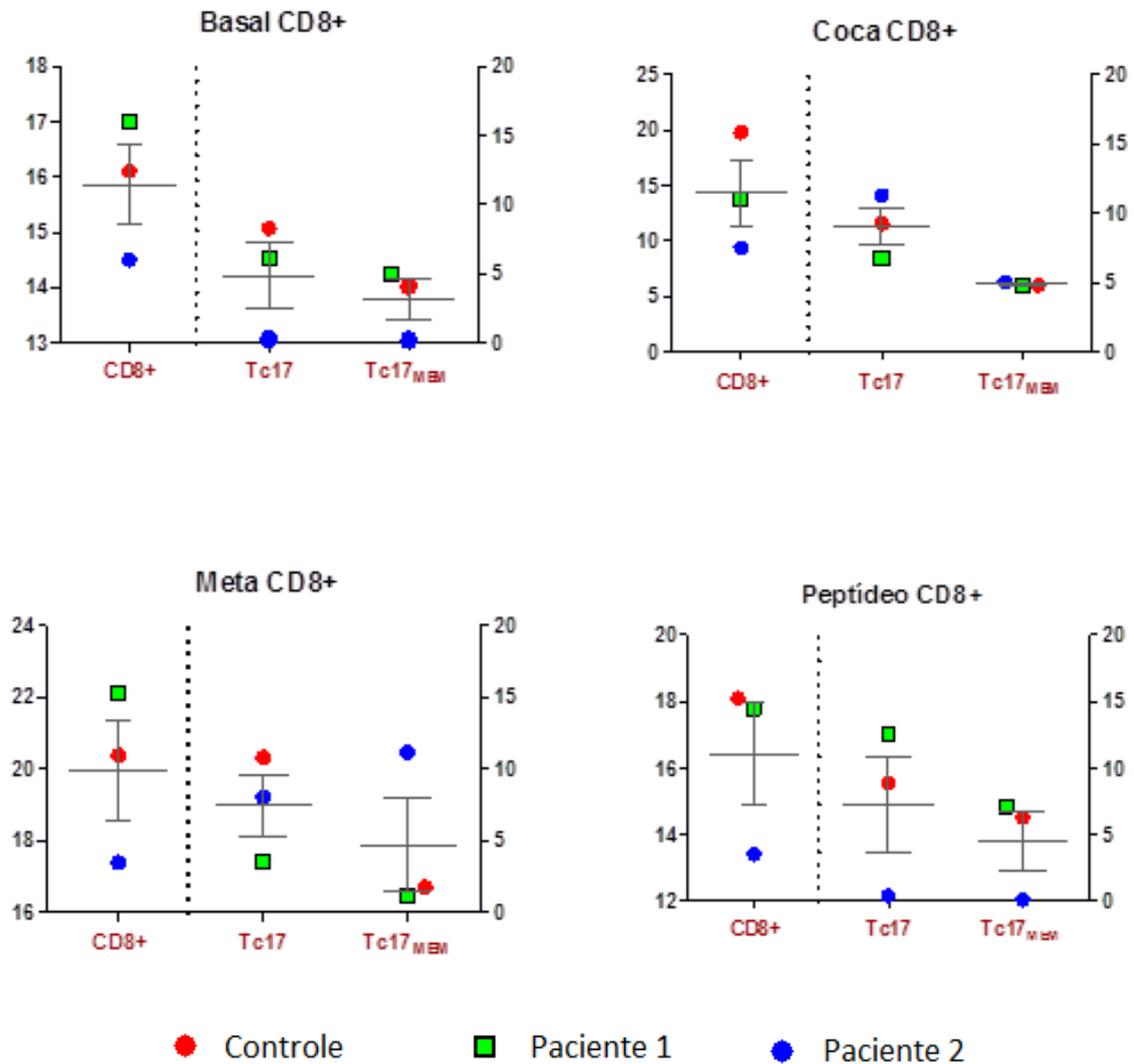
O paciente 2 se demonstrou responsivo frente ao estímulo Coca em relação às células Tc17 e Tc17_{MEM} quando comparado ao basal e ao controle, enquanto o paciente 1 demonstrou leve aumento da expressão comparado ao basal em relação às células Tc17 e níveis de expressão com frequência abaixo do controle em comparação às células Tc17 e Tc17_{MEM}.

Frente ao estímulo Meta o controle se mostrou respondedor apenas para a população de células Tc17 em comparação ao basal. O paciente 2 se mostrou bom respondedor para as duas populações celulares Tc17 e Tc17_{MEM} em relação ao basal, mas apenas bom respondedor para a população Tc17_{MEM} em relação ao controle. O paciente 1 não foi um bom respondedor para as duas populações estudadas.

		Basal		Coca		Meta		Peptídeo	
		Tc17	Tc17 _{MEM}	Tc17	Tc17 _{MEM}	Tc17	Tc17 _{MEM}	Tc17	Tc17 _{MEM}
Controle		8,27%	4,11%	9,27%	4,83%	10,80%	1,78%	8,84%	6,27%
Paciente	1	6,14%	4,98%	6,76%	4,79%	3,55%	1,15%	12,50%	7,13%
	2	0,27%	0,23%	11,30%	5,06%	8,06%	11,20%	0,39%	0,11%

Quadro 16: Avaliação de marcadores de células Tc17 e Tc17_{MEM} após estímulo por ativação por antígenos derivados do *T. rubrum* por 6 dias.

Gráfico 15: Avaliação de marcadores de células Tc17 e Tc17MEM após estímulo por ativação por antígenos derivados do *T. rubrum* por 6 dias.



4.3.3. Avaliação de marcadores de células Th17 e Th17_{MEM} após estímulo por ativação direta da proteína quinase C (PMA/IONO) por 6 horas analisados por citometria de fluxo

Com o intuito de se caracterizar as células Th17 com o fenótipo CD3+CD8-IL-17A+CD161+CCR6+, as células Th17_{MEM} com o fenótipo CD3+CD8-CD45RO+IL-17A+CD161+CCR6+ e também avaliar a frequência (%) destas células no grupo de pacientes e no grupo controle, foi realizada cultura de 6 horas utilizando como estímulo o Phorbol Miristil Acetato (PMA) e Ionomicina, demonstrados no Quadro 17 e Gráfico 17 conforme discutiremos abaixo:

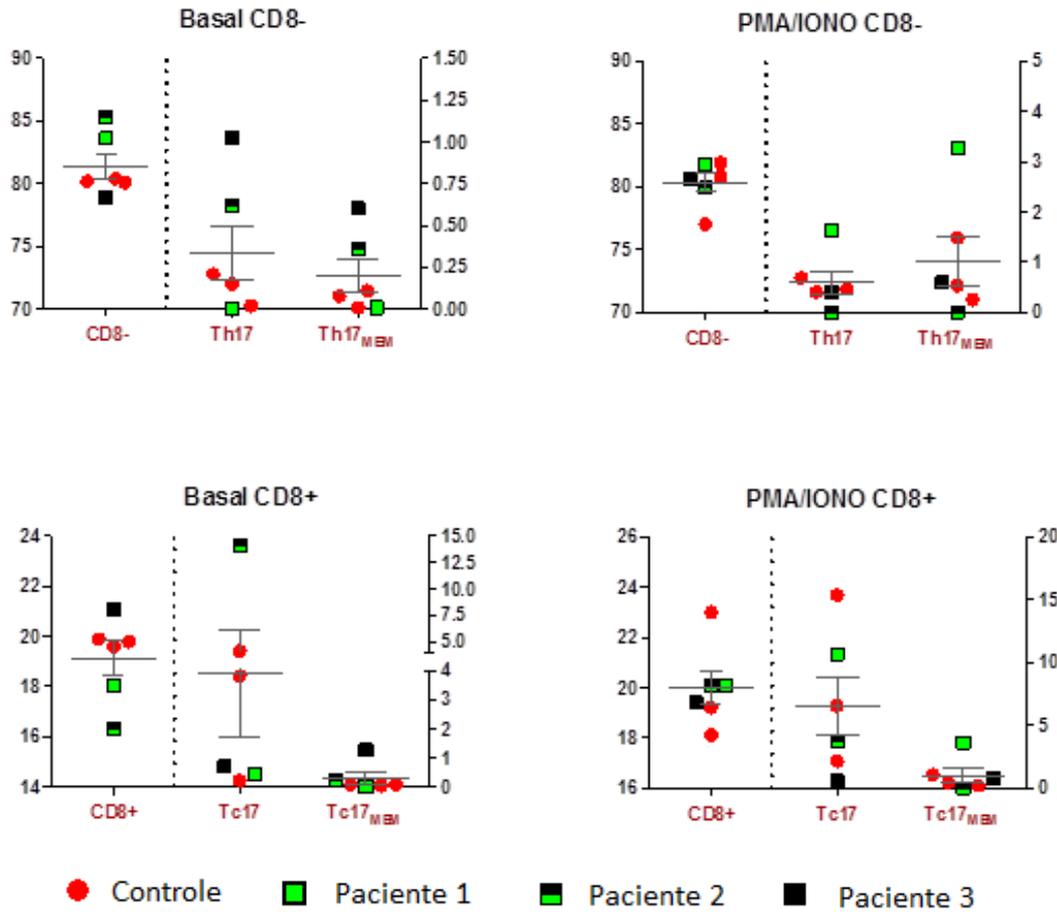
4.3.3.1. Análise comparativa entre os pacientes

Em análise não conclusiva podemos observar que após o estímulo as populações de células Th17 e Th17_{MEM} de todos os controles se mostraram responsivas, aumentando a expressão dos marcadores estudados. Em relação aos pacientes, somente o paciente 1 se mostrou respondedor frente ao estímulo para as populações de células Th17 e Th17_{MEM} enquanto os pacientes 2 e 3 apresentaram supressão das populações Th17 e Th17_{MEM} após o estímulo, com exceção da população de células Th17_{MEM} do paciente 3 que se manteve.

		Basal		PMA/IONO	
		Th17	Th17 _{MEM}	Th17	Th17 _{MEM}
Controle	1	0,15%	0,11%	0,46%	1,48%
	2	0,02%	0,01%	0,68%	0,53%
	3	0,21%	0,08%	0,40%	0,25%
Paciente	1	0,00%	0,01%	1,64%	3,27%
	2	0,62%	0,36%	0,00%	0,00%
	3	1,02%	0,60%	0,39%	0,59%

Quadro 17: Valores de frequência (%) das populações de células CD8- após estímulo por phorbol Ester (PMA) e ionomicina por 6 horas

Gráfico 16: Avaliação de marcadores de células Th17, Th17_{MEM}, Tc17, Tc17_{MEM} após estímulo por ativação direta da proteína quinase C (PMA/IONO) por 6 horas.



4.3.4. Avaliação de marcadores de células Tc17 e Tc17_{MEM} após estímulo por ativação direta da proteína quinase C (PMA/Iono) por 6 horas analisados por citometria de fluxo

Com o intuito de se caracterizar as células Tc17 com o fenótipo CD3+CD8+IL-17A+CD161+CCR6+, as células Tc17_{MEM} com o fenótipo CD3+CD8+CD45RO+IL-17A+CD161+CCR6+ e também avaliar a frequência (%) destas células no grupo de pacientes e no grupo controle, foi realizada cultura de 6 horas utilizando como estímulo PMA e Ionomicina, demonstrados no Quadro 18 e Gráfico 17 (acima) conforme discutiremos abaixo:

4.3.4.1. Análise comparativa entre os pacientes

Em análise não conclusiva podemos observar que após o estímulo as populações de células Tc17 e Tc17_{MEM} de todos os controles se mostraram responsivas. Em relação aos pacientes, somente o paciente 1 se mostrou respondedor frente ao estímulo para as populações de células Tc17 e Tc17_{MEM} enquanto os pacientes 2 e 3 tiveram uma supressão das populações Tc17 e Tc17_{MEM} após o estímulo.

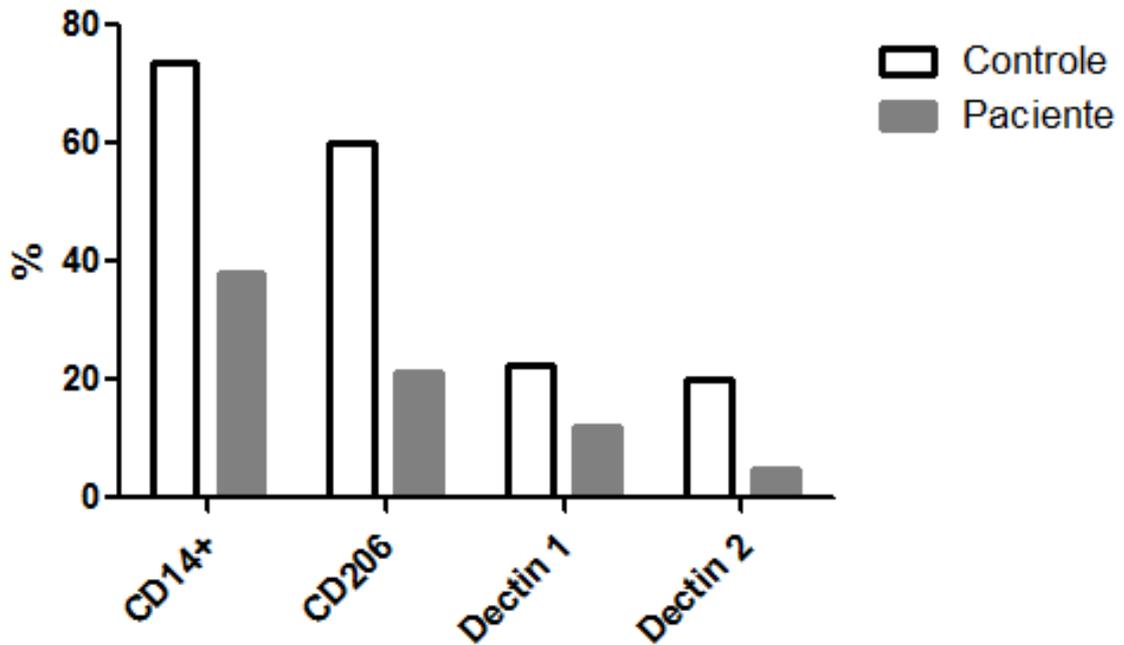
		Basal		PMA/IONO	
		Tc17	Tc17 _{MEM}	Tc17	Tc17 _{MEM}
Controle	1	3,82%	0,09%	15,40%	1,06%
	2	0,22%	0,04%	2,16%	0,43%
	3	4,10%	0,08%	6,55%	0,19%
Paciente	1	0,47%	0,02%	10,70%	3,58%
	2	14,10%	0,24%	3,75%	0,00%
	3	0,70%	1,27%	0,54%	0,69%

Quadro 18: Valores de frequência (%) das populações de células CD8+ após estímulo por phorbol Ester (PMA) e ionomicina por 6 horas

4.4. Avaliação dos Receptores de Lectina do tipo C

Para análise da expressão dos Receptores de Lectina do tipo C foram utilizadas as médias da frequência da expressão de cada receptor expressos em monócitos do sangue periférico de 9 indivíduos divididos em: grupo de pacientes (n=3) e grupo controle (n=6). Os dados obtidos nos permitem observar uma baixa expressão dos receptores CD206 (receptor de manose de monócitos), Dectin 1 e Dectin 2 em monócitos do sangue periférico no grupo de pacientes em relação ao grupo controle (Gráfico 18).

Gráfico 17: Receptores da família de Lectinas do tipo C em monócitos do sangue periférico



DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A proposta deste trabalho foi estudar a resposta imunológica da via Th17 específica ao *Trichophyton rubrum* através da caracterização das células Th17, Th17_{MEM}, Tc17 e Tc17_{MEM} em dois grupos: grupo controle caracterizado com lesão branda causada pelo *Trichophyton rubrum* e o grupo de pacientes portadores de dermatofitose extensa e/ou persistente causadas pelo *Trichophyton rubrum*. Considerando que para a realização destes ensaios funcionais faz-se necessária a obtenção de um extrato antigênico adequado, foi proposto produzir extratos que possuíssem essa capacidade de indução de resposta celular *in vitro* para que se pudesse avaliar adequadamente a resposta imunológica da via Th17 neste grupo de pacientes.

Para a realização deste estudo, foi descongelada uma amostra fúngica liofilizada que estava armazenada a -80°C extraída com Líquido de Coca (Sousa, VM 1993), proveniente de um projeto anterior realizado em nosso laboratório (Bressani *et al.*, 2011), mas provavelmente houve degradação das proteínas devido à presença de proteases no extrato, inviabilizando assim sua utilização para estimulação de proliferação linfocitária *in vitro*. Sabe-se que um dos fatores de virulência dos dermatófitos são a variedade de enzimas secretadas por eles como: proteases, lipases, elastases, colagenases, fosfatases e esterases, fatores muito importantes no processo infeccioso inclusive (Peres, *et al.*, 2010).

Produzimos então, 11 extratos antigênicos de *T. rubrum* dos quais induziram, um I.E., acima de 3 (valor considerado positivo para proliferação celular) em células mononucleares do sangue periférico, 7 se mostraram bons respondedores, dentre eles destacamos: Extrato TCA – Meta 1, Extrato Tindalizado G1 e Extrato com Líquido de Coca 1. Sabe-se que, a parede do *Trichophyton rubrum* é composta por dois tipos de polissacarídeos (mananas e galactomananas), e os ensaios de linfoproliferação demonstraram a supressão da resposta celular por diversos antígenos e mitógenos *in vitro*, possivelmente devido à presença dessas mananas conforme evidenciaram Ning e colaboradores (2002). Com base nesse trabalho, desenvolvemos um extrato antigênico que denominamos Extrato TCA (ainda não publicado) no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – IMT I da Universidade de São Paulo – USP, onde procuramos obter um extrato com alto índice proteico e baixo conteúdo potencial imunossupressor que possuísse capacidade de indução de resposta linfoproliferativa *in vitro*. Os antígenos metabólicos do Extrato TCA - Meta 1 demonstrou capacidade de estímulo nas concentrações entre 2,5 µg/mL e 10 µg/mL. Os Extratos TCA - Bruto 2 e Bruto 3 demonstraram possuir capacidade de estímulo nas concentrações entre 5

$\mu\text{g/mL}$ e $0,31 \mu\text{g/mL}$ em indivíduos imunocompetentes sensibilizados ao *Trichophyton rubrum*. Esta avaliação funcional da resposta linfoproliferativa antígeno-específica nos permite concluir que produzimos um extrato antigênico que possui capacidade de indução de resposta linfoproliferativa *in vitro*, apesar de não conseguir obter um alto índice proteico em comparação com o Extrato obtido com Líquido de Coca, através de um protocolo já estabelecido em nosso laboratório.

Além dos extratos produzidos por esse novo método, reproduzimos ainda dois protocolos estabelecidos: Extrato Tindalizado G1 e G2 preparado com solução de Timerosal na concentração 1:5000 (Standard & Kaufman, 1982) e Extrato com Líquido de Coca em meio Czapeck modificado (Souza VM, 1993).

O Extrato Tindalizado em cultura celular demonstrou capacidade de indução de resposta linfoproliferativa obtendo, um I.E., acima de 3 (valor considerado positivo) para todas as concentrações do extrato G1 em relação ao indivíduo controle 1, e nas concentrações: $5 \mu\text{g/mL}$, $2,5 \mu\text{g/mL}$ e $0,31 \mu\text{g/mL}$ em relação ao indivíduo controle 2. Por outro lado, o extrato G2 induziu um I.E. >3 para todas as concentrações testadas no indivíduo controle 1. Este resultado já era esperado, visto que a solução de Timerosal já era utilizada como conservante no trabalho de Standard & Kaufman (1982). Ao utilizar a solução de Timerosal por 24 horas no extrato metabólico do fungo *Trichophyton rubrum*, conseguimos a conservação das suas propriedades sem causar morte fúngica.

O Extrato Líquido de Coca 1 demonstrou boa capacidade de estimulação, induzindo, I.E. elevado, para os dois indivíduos controles em todas as concentrações testadas. Por outro lado, o extrato Líquido de Coca 2 induziu resposta linfoproliferativa nas células do indivíduo controle 1, nas concentrações entre $10 \mu\text{g/mL}$ e $1,25 \mu\text{g/mL}$ e $0,31 \mu\text{g/mL}$. Esta alta capacidade de indução de resposta linfoproliferativa *in vitro* foi observada por Sousa, VM (1993) descrevendo a extração com Líquido de Coca pela alta capacidade de extração de proteínas.

Selecionamos então, os três melhores extratos antigênicos com base em sua capacidade de índice de estimulação (I.E.): Meta 1, Coca 1 e G1. Para a constatação da presença das proteínas do fungo *Trichophyton rubrum* nestes extratos, foi realizada uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida SDS-PAGE que nos permitiu observar proteínas com pesos moleculares aproximados de 70 kDa e 38 kDa, em duplicata nas concentrações: $29 \mu\text{g/mL}$, $46,92 \mu\text{g/mL}$ e $416 \mu\text{g/mL}$ dos extratos Meta 1, G1 e Coca 1, respectivamente.

Armazenamos os extratos em geladeira, a uma temperatura de 4°C para realizar os ensaios de linfoproliferação *in vitro*. Após algumas semanas, notamos que o extrato G1 perdeu sua concentração de proteína inicial de 46,92 µg/mL para 0 µg/mL. O mesmo aconteceu com o extrato G2, de 128,84 µg/mL para 0 µg/mL. Decidiu-se então utilizar os extratos Meta 1 e Coca 1 como estímulo nas induções de resposta celular *in vitro* em indivíduos controles diagnosticados com dermatofitose pelo fungo *T. rubrum*, com lesões locais sem grandes extensões, que realizaram tratamento e obtiveram melhora clínica com o tratamento instituído e em pacientes com dermatofitose extensa e/ou persistente causada pelo *Trichophyton rubrum*.

Para o presente estudo, foram selecionados pacientes que apresentaram dermatofitose de forma atípica, sendo levado em consideração os critérios: tempo da doença, localização atípica, extensão da lesão, disseminação, recrudescência e refratariedade ao tratamento. Na literatura se caracteriza como lesão disseminada a partir de três pontos de lesões distintas (Oliveira, CB *et al.*, 2015). Optamos por recrutar pacientes não só pelo critério de localização das lesões e sim que apresentassem comportamentos atípicos da doença. Para o grupo controle, foram selecionados indivíduos que apresentaram tineas causadas pelo *T. rubrum*, que realizaram tratamento e obtiveram melhora clínica com o tratamento instituído. Este grupo controle foi caracterizado por lesões na forma branda da doença. Comparando indivíduos que se expuseram ao mesmo patógeno porém apresentaram diferentes comportamentos da doença, nos permite melhor avaliar as características imunológicas que os diferem.

Para o estudo da via Th17 faz-se necessária a caracterização das células Th17, Th17_{MEM}, Tc17 e Tc17_{MEM} presentes no sangue periférico de pacientes portadores de dermatofitose extensa e/ou persistente, que apresentaram lesões atípicas da doença. Segundo Brucklacher-Waldert e colaboradores (2010) a citocina IL-17A e IL-17F formam um heterodímero na superfície das células Th17. Ensaio realizado com células que foram selecionadas com base na expressão de IL-17A na superfície, geraram células clones Th17 e Th1/17, nunca Th1, evidenciando que a presença de IL-17A na superfície de células Th17 pode ser utilizada como marcadores de superfície fidedignos. Células TCD4 com IL-17A⁺ em sua superfície continham CCR6⁺ e CD161⁺.

Padronizamos então os fenótipos: CD3⁺CD8⁻IL-17A⁺CD161⁺CCR6⁺ para caracterização das células Th17; CD3⁺CD8⁻CD45RO⁻IL-17A⁺CD161⁺CCR6⁺ para células Th17 naïve e/ou CD45RA_{TEMRA} (células T de memória efetora altamente diferenciada) e

CD3+CD8-CD45RO+IL-17A+CD161+CCR6+ para as células Th17_{MEM} (células de memória central).

Para a caracterização das células Tc17 foram utilizados os seguintes fenótipos: CD3+CD8+IL-17A+CD161+CCR6+ para as células Tc17; CD3+CD8+CD45RO-IL-17A+CD161+CCR6+ para células Tc17 naïve e/ou CD45RA_{TEMRA} (células T de memória efetora altamente diferenciada) e CD3+CD8+CD45RO+IL-17A+CD161+CCR6+ para células Tc17_{MEM} (células de memória central).

Nos ensaios de linfoproliferação de 6 dias pudemos observar que após estímulo com o peptídeo sintético YIIDTGIDID (que corresponde ao principal epítipo do fungo *Trichophyton rubrum*, Tri r 2), o controle se mostrou respondedor em relação ao basal e apenas o paciente 1 se mostrou responsivo em relação ao basal e ao controle frente à frequência das células Th17 e Th17_{MEM}. O peptídeo induziu baixo índice de estimulação no indivíduo controle, praticamente duplicando o índice de expressão celular pós-estímulo nas células do paciente 1 e aparentemente não produziu efeito nas células do paciente 2. Ao avaliar as populações celulares de Tc17 e Tc17_{MEM} vimos que o peptídeo induziu expressão de IL-17 acima do basal para o controle e o paciente 1. Woodfolk e seus colaboradores (2001) também descreveram em seus experimentos baixos índices de proliferação, pelo fato do peptídeo gerar uma resposta muito específica. A partir deste estudo podemos analisar o paciente 1 como um excelente respondedor ao peptídeo sintético de *Trichophyton rubrum*, e atribuir esta resposta linfoproliferativa a cronicidade de sua dermatofitose (tempo superior a 15 anos) e talvez ao fato de que, no momento da coleta de sangue, a paciente estava com suas lesões ativas. Diferentemente, a paciente 2 não estava com lesões ativas no momento da coleta, apesar de também ter um histórico de cronicidade da dermatofitose e relatar que possui essas descamações desde a infância praticamente (relatos da própria paciente). Faz-se necessário o aumento do número de pacientes e indivíduos controles para afirmar significância por análises estatísticas.

O extrato antigênico Coca se demonstrou bom estimulador para o paciente 1 e 2 quando comparado ao controle na população Th17 e bom estimulador para o paciente 2 em relação ao basal comparado à mesma população. Houve também aumento da frequência da população Th17_{MEM} em relação ao basal dos pacientes 1 e 2. Ao analisar as populações de células Tc17 e Tc17_{MEM}, o paciente 2 mostrou-se responsivo frente ao estímulo com antígeno de Coca quando comparado ao basal e ao controle. Por outro lado, o paciente 1 demonstrou leve aumento da proliferação comparado ao basal em relação às células Tc17 e níveis de proliferação com

frequência abaixo do controle em comparação as mesmas populações celulares. Nossos dados corroboram com as evidências descritas por Souza, VM (1993) onde demonstrou que o líquido extrator Líquido de Coca se mostrou eficiente na extração de proteínas em antígenos fúngicos. Entendemos que o investimento em estudos aprofundados para caracterização das proteínas presentes em extratos fúngicos é de extrema importância para o estudo das vias de sinalização imunológica e assim, o estudo da resposta imunológica nas dermatofitoses.

Em relação ao estímulo com o extrato Meta, apenas o paciente 2 se mostrou bom respondedor, tanto em relação ao basal quanto ao controle. Em relação às populações de células Tc17 e Tc17_{MEM} observamos que o controle se mostrou respondedor apenas para a população Tc17 quando comparado ao basal. O paciente 2 se mostrou bom respondedor para as duas populações celulares Tc17 e Tc17_{MEM} em relação ao basal, mas apenas bom respondedor para a população Tc17_{MEM} em relação ao controle. O paciente 1 não foi um bom respondedor para as duas populações estudadas. Faz-se necessário o aumento do número de pacientes e indivíduos controles para afirmar significância por análises estatísticas e também o aprofundamento nos estudos quanto às proteínas presentes no extrato antigênico, para elucidação do motivo de diferentes indivíduos responderem diferentemente ao mesmo antígeno, já que houve positividade do paciente 2 após estímulo com este extrato antigênico.

Nos ensaios de linfoproliferação de 6 horas pudemos observar que após estímulo por ativação direta da proteína quinase C (PMA/Iono) as populações de células Th17 e Th17_{MEM} de todos os controles se mostraram responsivas. Em relação aos pacientes, somente o paciente 1 se mostrou respondedor frente ao estímulo para as populações de células Th17 e Th17_{MEM} enquanto que os pacientes 2 e 3 apresentaram supressão das populações Th17 e Th17_{MEM} após o estímulo, com exceção da população de células Th17_{MEM} do paciente 3 que se manteve. Ao avaliar as populações Tc17 e Tc17_{MEM} pudemos observar que após o estímulo todos os controles se mostraram responsivos. Em relação aos pacientes, somente o paciente 1 se mostrou respondedor frente ao estímulo para as populações de células Th17 e Th17_{MEM} enquanto os pacientes 2 e 3 apresentaram supressão das populações Th17 e Th17_{MEM} após o estímulo.

O reconhecimento dos patógenos fúngicos pelas células da imunidade inata é um evento primordial para estabelecer os mecanismos de defesa do hospedeiro e, portanto, proteção às micoses. Os receptores da família das lectinas do tipo C (CLRs) e os receptores *Toll-like receptors* (TLRs) possuem um papel essencial na interação com o patógeno e iniciação da resposta inflamatória, estando presentes principalmente em macrófagos, neutrófilos e células

dendríticas (Mora-Montes *et al.*, 2011; Cruvinel *et al.*, 2010; Araújo *et al.*, 2009; Bártholo & Bártholo, 2009).

Ao avaliarmos os receptores da família das Lectinas do tipo C: CD206 (receptor de manose), Dectin 1 e Dectin 2 em monócitos do sangue periférico em um grupo controle caracterizado com lesão branda (n=6) e em um grupo de pacientes portadores de dermatofitose extensa e/ou persistente (n=3), pudemos notar que a média da expressão dos receptores Lectina do tipo C do grupo de pacientes se mostrou suprimida em relação à média do grupo de indivíduos controles. Tendo em vista que o *Trichophyton rubrum* expressa glicoproteínas em sua parede celular que são reconhecidas por Dectin 1, responsável pela indução de altos níveis de TNF, IL-6 e IL-23 levando as células T naïve à diferenciação em células Th17 e por consequência, produção de IL-17 (Gladiator *et al.*, 2013), sugere-se que os pacientes estudados possuam alguma deficiência na transdução de sinal no receptor de Dectin 1 visto que expressaram baixa frequência desses receptores (12,06%) em relação ao grupo controle (22,42%). Sabe-se que Dectin 2 é responsável pela indução das citocinas TNF, IL-6, IL-1 β e IL-23 em células dendríticas estimuladas por partículas fúngicas e que a citocina IL-6 atua diretamente no sinal de diferenciação para Th17 (Vautier *et al.*, 2010). Visamos mostrar a importância do estudo dos receptores de lectina do tipo C no que diz respeito ao estudo das dermatofitoses.

Sabe-se que os CLRs são expressos nas células dendríticas ou macrófagos e interagem primariamente com patógenos através do reconhecimento de estruturas de manose, fucose e glucana. (Drickamer, 1988).

Estudos recentes demonstraram que animais deficientes de dectina-1 apresentaram suscetibilidade para infecções de *C. albicans* e *Pneumocystis carinii* em determinados modelos murinos (Saijo *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2007). Seguindo a mesma linha, animais nocautes para o receptor Mincle são mais susceptíveis à candidíase que animais controle (Wells *et al.*, 2008). Ainda em modelo experimental, foi demonstrado que animais nocautes para Dectina-2 são susceptíveis a infecções por *C. albicans* quando comparamos a controles (Saijo *et al.*, 2010). Ferwerda *et al.*, (2009), demonstraram em humanos que uma família com mutações no gene para dectina-1 era suscetível a infecções fúngicas mucocutâneas e também possui defeitos na produção de citocinas, incluindo IL-17, em resposta a infecções fúngicas. Recentemente, este polimorfismo e seus efeitos na produção de IL-17 também foram associados com a suscetibilidade a aspergilose invasiva em pacientes transplantados (Cunha *et al.*, 2010).

Dectina 2 é um receptor transmembrana tipo II da família dos CLRs, expresso predominantemente em macrófagos teciduais, células dendríticas e monócitos inflamatórios. Ao avaliarmos a frequência do receptor Dectin 2, pudemos observar que o grupo de pacientes expressou baixa frequência desse receptor (4,99%) quando comparado ao grupo controle (20,26%). Esse resultado poderia ser justificado por esse receptor não possuir motivos de sinalização tradicionais, ou seja, por ter uma cauda citoplasmática curta, dectina 2 se associa com o adaptador FcR γ contendo ITAM podendo desencadear sinalização intracelular através de Syk/CARD9 (Vautier *et al.*, 2010) sugerindo um problema na fagocitose.

Existem muitas discussões sobre as vias dos receptores que são capazes de direcionar a resposta imune para o perfil de Th1 ou Th17. Já foi demonstrado que o sistema imune de animais nocautes para a molécula adaptadora CARD9 falhou em montar uma resposta Th17 específica para *C. albicans*; no entanto, essa resposta imune é preservada para animais deficientes de dectina-1. Ainda sobre os CLRs, o receptor de manose induz IL-17 em resposta a *Candida albicans* em modelo humano. Além disso, um trabalho de Coltri et al. (2008) mostraram que a administração terapêutica da lectina KM+ derivada de *Artocarpus integrifolia* (jaca) em camundongos BALB/c protege estes animais durante a infecção pelo *P. brasiliensis* através da produção de IL12 via TLR2.

Com o aumento da incidência de micoses por todo o mundo e a falta de vacinas contra qualquer patógeno fúngico, cria-se uma necessidade de desenvolvimento de novas estratégias de tratamentos antifúngicos. A longevidade das células Th17 e Tc17 podem ser aplicadas nesses projetos de vacinas, por possuírem este pré-requisito potencial. Estratégias de imunização utilizando o efeito protetor de células T, em particular as células Th17, estabelecem um novo paradigma para o desenvolvimento de vacinas para uso em humanos (Gladiator *et al.*, 2013).

Assim, tornam-se necessárias investigações com maiores grupos de indivíduos para melhor entendimento a respeito do papel da via Th17 em pacientes portadores de dermatofite extensa e/ou persistente.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

- A. Produzimos um extrato antigênico Extrato TCA – Meta 1 inédito na literatura que possui capacidade de indução de resposta linfoproliferativa *in vitro*, apesar de não se conseguir obter um alto índice proteico em comparação com o Extrato obtido com Líquido de Coca, através de um protocolo já estabelecido em nosso laboratório.

- B.** Caracterizamos as células Th17, Th17_{MEM}, Tc17 e Tc17_{MEM} com os seguintes fenótipos: CD3+CD8-IL-17A+CD161+CCR6+; CD3+CD8-CD45RO+IL-17A+CD161+CCR6+; CD3+CD8+IL-17A+CD161+CCR6+; CD3+CD8+CD45RO+IL-17A+CD161+CCR6+ como marcadores de superfície celular em controles e pacientes com dermatofitose extensa e/ou persistente.
- C.** Quantificamos e qualificamos a resposta imune celular *in vitro* da resposta linfoproliferativa de células mononucleares do sangue periférico em controles caracterizados com lesão branda e pacientes com dermatofitose extensa e/ou persistente ao peptídeo YIIDTGIDID do fungo *Trichophyton rubrum* e aos extratos antigênicos produzidos em nosso laboratório.
- D.** Avaliamos a expressão dos receptores da família das Lectinas do tipo C: CD206 (Receptor de Manose), Dectin 1 e Dectin 2 em monócitos do sangue periférico de controles caracterizados com lesão branda e pacientes portadores de dermatofitoses extensas e/ou persistentes.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A: Ficha Clínica

III – Ficha Clínica

Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências – LIM-56

Paciente: _____

Data de Nascimento _____ Sexo _____ RGHC _____

Profissão: _____ Data de Coleta _____

1. Portador de algum tipo de imunodeficiência? Sim () Não ()

2. Alguma doença pré-existente?

Diabetes Sim () Não () Neoplasia Sim () Não ()

Uremia Sim () Não () Transplante Sim () Não ()

Outros: _____

3. Já teve algum tipo de micose/dermatofitose? Sim () Não ()

- Se sim. Diagnóstico _____

- Realizou algum tipo de tratamento? Sim () Não ()

- Fez uso de medicamento? Sim () Não () Qual _____

- Em quanto tempo houve melhora clínica? _____

4. Faz uso contínuo de algum outro tipo de medicação? Sim () Não ()

- Qual? _____

5. Observações: _____

ANEXO B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (HCFMUSP)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
 DA
 FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS -INFORMAÇÃO
 (Instruções para preenchimento no verso)

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 :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: **CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA CELULAR EM PACIENTES PORTADORES DE DERMATOFITOSSES EXTENSAS E/OU PERSISTENTES**

2. PESQUISADOR: **Prof. Dr. Dewton de Moraes Vasconcelos**

CARGO/FUNÇÃO: **Pesquisador Associado ao LIM56. INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 41700**

UNIDADE DO HCFMUSP: **Laboratório de Investigação Médica – Unidade 56**

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 : **Dois anos**

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

1. justificativa e objetivos da pesquisa ; 2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais; 3. desconfortos e riscos esperados; 4. benefícios que poderão ser obtidos; 5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

Você está sendo convidado a participar voluntariamente (isto é, sem remuneração e de modo não obrigatório) de um estudo sobre a resposta imunológica na Dermatofitose extensa e/ou persistente.

Caso você concorde, seu sangue será coletado periodicamente para a contagem de populações específicas de células chamadas LINFÓCITOS e dosagem de substâncias importantes na resposta imune chamadas CITOCINAS. Os riscos e desconforto envolvidos são os mesmos de uma coleta de sangue padrão no seguimento de pessoas com Dermatofitose extensa. O possível benefício é o de um acompanhamento dentro de uma sistemática diferente da que é feita no ambulatório do HC. Você poderá ainda estar ajudando outras pessoas com o mesmo tipo de problema ao permitir a obtenção / análise de dados sobre a doença. Caso não concorde em participar, você possui a opção de manter o seu acompanhamento normal sem qualquer prejuízo dentro do HC. Você poderá ter acesso não só aos dados obtidos como também ao esclarecimento de qualquer assunto relacionado ao estudo. Os dados obtidos poderão ser acessados exclusivamente pelos investigadores, comissões de ética das instituições envolvidas e autoridades sanitárias do país.

Em caso de emergência e/ou dúvidas você poderá entrar em contato com:

Dr. Dewton de Moraes Vasconcelos – 3061-7193 / 3061-7194 / 3061-7457

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

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
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.
3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

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

Dewton de Moraes Vasconcelos. Tel: 3061-7457 ou 3061-7499.

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 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

ANEXO C: Aprovação do Comitê de Ética (HCFMUSP)



HOSPITAL DAS CLÍNICAS
 DA
 FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
 CAIXA POSTAL, 3671
 SÃO PAULO - BRASIL

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 23.11.00, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 855/00 intitulado: "**Caracterização da resposta imunológica celular em pacientes portadores de dermatofitoses extensas**", apresentado pelo(a) pesquisador(a) **Prof. Dr. Dewton de Moraes Vasconcelos**, do Departamento de Dermatologia, bem como Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

CAPPesq, 24 de novembro de 2000.


PROF. DR. JORGE KALIL FILHO
 Presidente da Comissão de Ética Para
 Análise de Projetos de Pesquisa

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, S.R. Immunology of Dermatophytosis. *Mycopathology* (2008) 166:277-283.
- Aquino VR, Constante CC, Bakos L. Frequência das dermatofitoses em exames micológicos em Hospital Geral de Porto Alegre, Brasil. Investigação clínica, Epidemiológica, Laboratorial e Terapêutica. *An. Bras. Dermatol.* 2007;82.
- Araújo, N.C.; Bello, D.M.A.; Souza, P.R.E.; Gusmão, E.S.; Cim es, R. Innate immunity in periodontal diseases. Artigo de Revisão. Odontologia. *Clín. Cient f., Recife*, 8 (3): 225-228, jul/set., 2009.
- B rtholo, R.M.; B rtholo, T.P. The innate immunity and the importance of the toll-like receptors. Artigo de Revisão. Supl2:S2-S8. *Pulmão RJ* 2009.
- Bressani, V. Caracteriza o da Resposta Imunológica Celular em Pacientes portadores de dermatofitoses extensas causadas pelo *Trichophyton rubrum*. *Disserta o*. 2011.
- Brucklacher-Waldert, V.; Steinbach, K.; Lioznov, M.; Kolster, M.; H lscher, C.; Tolosa, E. Phenotypical Characterization of Human Th17 Cells Unambiguously Identified by Surface IL-17A Expression. *The Journal of Immunology*. 2009;183:5494-5501.
- Calderon RA. Immunoregulation in dermatophytosis. *Crit Rev Microbiol.* 1989;16:339 - 68.
- Campos, MRM. Intera o de *Trichophyton rubrum* com macrófagos peritoniais de camundongos. *Disserta o*. 2004.
- Campos, M.R. et al. Stimulation, inhibition and death of macrophages infected with *Trichophyton rubrum*. *Microbes Infect.*, v. 8, n. 2, p. 372-9, 2006.
- Chinelli, PAV; Sofiatti, AA; Nunes, RS; Martins, JEC. Dermatophyte Agents in the City of São Paulo, from 1992 to 2002. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 45(5):259-263, September-October, 2003.
- Cruvinel, W.M.; Júnior, D.M.; Araújo, J.A.P.; Catelan, T.T.T.; Souza, A.W.S.; Silva, N.P.; Andrade, L.E.C. Sistema Imunitário – Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. Artigo de Revisão. Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP. 2010.
- Drummond, R.A.; Saijo, S.; Iwakura, Y.; Brown, G.D. The role of Syk|CARD9 coupled C-type lectins in antifungal immunity. *European Journal of Immunology*. 2011. 41:276-281.
- Gladiator, A.; LeibundGut-Landmann, S. Innate Lymphoid Cells: New Players in IL-17-Mediated Antifungal Immunity. *Plos Pathogens*. V. 9;2013.

Hara, H.; Ishihara, C.; Takeuchi, A.; Imanishi, T, Xue, L.; Morris, S.W.; Inui, M.; Takai, T.; Shibuya, A.; Saijo, S.; Iwakura, Y.; Ohno, N.; Koseki, H.; Yoshida, H.; Penninger, J.M.; Saito, T. The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors. *Nature Immunology*. Volume 8. Number 6. June 2007.

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

Hunziker, N.; Brun, R. Lack of delayed in presence of cell mediated immunity in trichophyten hypersensitivity. *Arch. Dermatol.*, v. 116, p. 1266-1268, 1980.

Iwakura, Y.; Ishigame, H.; Saijo, S.; Nakae, S. Functional Specialization of Interleukin-17 Family Members. *Immunity Review*. Immunity 34. 2011;p.151.

Kaaman, T. The clinical significance of cutaneous reaction to trichophyten in dermatophytosis. *Acta Derm. Venereol.* v. 58, p. 139-143, 1978.

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;86:204 - 12.

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.

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

Mora-Montes, H.M.; Netea, M.G.; Ferwerda, G.; Lenardon, M.D.; Brown, G.D.; Mistry, A.R.; Kullberg, B.J.; O'Callaghan, C.A.; Sheth, C.C.; Odds, F.C.; Brown, A.J.P.; Munro, C.A.; Gow, N.A.R. Recognition and Blocking of Innate Immunity Cells by *Candida albicans* Chitin. *Infection and Immunity*, May 2011, p. 1961–1970 Vol. 79, No. 5.

Ning J, Heng L, Kong F. A highly efficient synthesis of an octasaccharide, the repeating unit of the cell-wall mannan of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. rubrum*. *Carbohydr Res*. 2002; 337(13):1159-64.

Okamoto, K.; Iwai, Y.; Oh-hora, M.; Yamamoto, M.; Morio, T.; Aoki, K.; Ohya, K.; Jetten, A.M.; Akira, S.; Muta, T.; Takayanagi, H. I κ B ζ regulates Th17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature Letters*. Volume 464. 29 April 2010.

Oliveira, C.B.; Vasconcellos, C.; Sakai-Valente, N.Y.; Sotto, M.N.; Luiz, F.G.; Belda Júnior, W.; Sousa, M.G.T.; Benard, G. & Criado, P.R. - Toll-like receptors (TLR) 2 and 4 expression of keratinocytes from patients with localized and disseminated dermatophytosis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 57(1): 57-61, 2015.

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

Peron, M.L.D.F; Teixeira, J.J.V.; Svidzinski, T.I.E. Epidemiologia e etiologia das dermatomicoses superficiais e cutâneas na Região de Paranavai- Parana, Brasil. *Rev Bras Anal. Clin.*,v. 37, p. 77-81, 2005.

Rippon JW. Epidemiology and emerging patterns of dermatophyte species. In: Current topics in medical mycology. *New York: I Springer-Verlag*; 1985. p.288 - 34.

Ruiz, LRB; Zaitz, C. Dermatophytes and dermatophytosis in the city of São Paulo, from August 1996 to July 1998. *Anbras Dermatol.* 2001; 76 (4): 391-401.

Saijo, S.; Ikeda, S.; Yamabe, K.; Kakuta, S.; Ishigame, H.; Akitsu, A.; Fujikado, N.; Kusaka, T.; Kubo, S.; Chung, S.; Komatsu, R.; Miura, N.; Adachi, Y.; Ohno, N.; Shibuya, K.; Yamamoto, N.; Kawakami, K.; Yamasaki, S.; Saito, T.; Akira, S.; Iwakura, Y. Dectin-2 Recognition of α -Mannans and Induction of Th17 Cell Differentiation Is Essential for Host Defense against *Candida albicans*. *Immunity Article.* Immunity 32, 681-691, May 28, 2010.

Sales, MM e Vasconcelos, D. Citometria de Fluxo: Aplicações no Laboratório Clínico e de Pesquisa: Série da Pesquisa à Prática Clínica. *Editora Atheneu*, 2013.

Sousa, MD e Barbosa, CM. Polímeros com capacidade de reconhecimento molecular no controlo da libertação de fármacos. Parte 1: Síntese e caracterização. *Quim. Nova*, Vol. 32, Nº.6, 1609-1619, 2009.

Sousa, M.G.T.; Santana, G.B.; Criado, P.R.; Benard, G. Chronic widespread dermatophytosis and Trichophyton-specific functional defect of phagocytes: a specific syndrome in the spectrum of the Trichophyton-host interaction. *Frontiers in Microbiology.* V. 6, p. 3-5, 2015

Staughton, R. Skin manifestation in AIDS patients. *J. Clin. Pract. Symp. Suppl.*v. 71, p. 109-113, 1990.

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

Tesmer, L.A.; Lundy, S.K.; Sarkar, S.; Fox, D.A. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev.* 2008;223:87-113.

Vautier, S.; Sousa, M.G.; Brown, Gordon D. C-type lectins, fungi and Th17 responses. *Elsevier.* V 21. 2010;405-412.

Weitzman, I. & Summerbell, R.C. The Dermatophytes. *Clinical Microbiology.* Reviews.1995.

Willment, J.A. and Brown, G.D. C-type lectin receptors in antifungal immunity. *Review TRENDS in Microbiology.* Volume 16. No 1. 2007.

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

Woodfolk JA. Allergy and dermatophytes. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:30-43.

Yoshikawa, FSY; Ferreira, LG; Almeida, SR. IL-1 signaling inhibits *Trichophyton rubrum* conidia development and modulates the IL-17 response in vivo. *Virulence*. V.6, p.449-457. 2015

Zaugg C.; Jousson, O.; Le´chenne, B.; Staib, P.; Monod, M. *Trichophyton rubrum* secreted and membrane-associated carboxypeptidases. *International Journal of Medical Microbiology*. 298 (2008) 669–682.