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

Interação de células dendríticas com conídios de
Trichophyton rubrum

Karla Letícia Santiago

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

São Paulo

2009

DEDALUS - ACERVO - CQ

30100016727

Ficha Catalográfica

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

S235i Santiago, Karla Letícia
Interação de células dendríticas com conídios de *Trichophyton
rubrum* / Karla Letícia Santiago. -- São Paulo, 2009.
62p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Almeida, Sandro Rogério de

I. Microbiologia médica 2. Fungos : Doenças : Imunologia
I. T. II. Almeida, Sandro Rogério de, orientador.

616.01 CDD

Karla Letícia Santiago

Interação de células dendríticas com conídios de *T. rubrum*.

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Mestre.

Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, 22/06/2009 de _____.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia Clínica do departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP).

*Eu dedico este trabalho aos meus pais Carlos
Fabrício Santiago e Maria Clara Santiago, que me
permitiram viver e sonhar; que me ampararam e me
ensinaram a caminhar. Meu grande orgulho é ser
fruto de vocês. Que Deus permita-me educar meus
filhos assim como vocês nos educaram.
AMO VOCÊS.*

A Deus, minha prece de agradecimento.

Nem sempre a jornada foi fácil, agradeço a Deus por estar ao meu lado todas as vezes que achei que não seria mais capaz de seguir em frente. Muito Obrigada Senhor pelo dom de amar e ser amada, pela família maravilhosa que me deste, pelos amigos e oportunidades que colocaste em meu caminho.

“Guardá-me, ó Deus, porque em ti confio.” (Salmo 16:1)

Agradecimentos

À minha família, minha vida, base de tudo, meu alicerce e meu porto seguro. Obrigada por vocês existirem.

Ao meu orientador Prof. DR. Sandro Rogério de Almeida minha profunda gratidão pelas oportunidades concedidas, pela confiança e ensinamentos ministrados.

Aos meus amigos de longe ou de perto, mas sempre presentes em minha vida. Sem vocês a vida seria em preto e branco, obrigada pelo colorido que cada um de vocês traz através da cumplicidade, da confiança, do amor, apoio e carinho; das lágrimas, risadas e gargalhadas; dos fiascos, dos passeios, das baladas, comemorações e viagens; além das terapias, das teorias e dos encontros; dos cafezinhos e do chimarrão; dos filmes, recadinhos, conversinhas... Enfim a vida é bem melhor com vocês ao meu lado.

A todos os pacientes do Hospital das Clínicas, bem como todas as pessoas que doaram seus preciosos sangues, essenciais para execução deste trabalho.

Ao querido Ricardo Spina Nunes pela agradável companhia e pelos valiosos ensinamentos em micologia clínica.

Ao DR. José Eduardo Costa Martins e toda equipe do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo por permitirem nosso livre acesso ao Laboratório de Micologia Clínica.

À Rosely e à equipe do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da USP por terem cedido gentilmente a tricofitina usada neste trabalho.

A todos funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, que direta ou indiretamente participaram deste trabalho.

À FAPESP pelo apoio científico e financeiro.

Agradecimentos especiais

À minha mãe, pelo exemplo de ser humano que tu és, pelo amor incondicional dedicado aos teus filhos, pela amizade que nos une mais e mais a cada dia, pelo incentivo e apoio, pelos sonhos que tu abriste mão em troca dos nossos. Mãe eu não teria chegado até aqui sem você.

Ao meu pai, meu grande amigo, que sempre me apoiou, enxugou minhas lágrimas e me ensinou a não ter medo de correr atrás dos meus sonhos. Pai obrigada pelo amor e por ter me criado livre e forte para enfrentar o mundo.

Aos meus queridos irmãos Andréa, Pablo e Laura que se fizeram sempre presentes na distância. O que nos une não são apenas os laços de sangue, mas a amizade, o respeito, a admiração e o amor que sentimos uns pelos outros. Que Deus nos conserve sempre unidos.

Aos meus cunhados Márcio Menezes Agertt e Leticia Palma de Azevedo por fazerem parte da construção de um pedaço da nossa história. Obrigada pelo carinho, apoio e amizade.

Aos meus sobrinhos amados Guilherme, Isabela e Martin a existência de vocês ilumina meus dias. Meu amor por vocês é gigante.

À Gisele Facholi Bomfim minha amiga querida, nossa amizade começou na faculdade e se fortalece dia-a-dia com a convivência. Gi muito obrigada por fazer parte desta conquista. Sem teu incentivo, apoio, acolhida e amizade este trabalho não teria se realizado.

À Tatiane Siqueira Silva, que me recebeu de braços abertos em São Paulo e pela amizade rapidamente estabelecida.

Às famílias Fachole Bomfim, Cervantes Gomes Pereira e Siqueira Silva pelo carinho e acolhida. Vocês fazem parte da minha família de coração, daquela família que Deus nos permite escolher.

Aos amigos e colegas Sônia Caramico Burato, Suelen Silvana dos Santos, Vanessa Rosa Noal, Rosana Cícero do Nascimento, Karen Spadari Ferreira, Fabiana Teixeira, Elver Eid Bou Ghosn, Daniele Lima Franco, Maria da Glória de Sousa, Lavinia Romero; pelo companheirismo, pelos ensinamentos, por tornarem a rotina mais divertida e por dividirem comigo suas vivências profissionais e pessoais. O carinho de cada um de vocês foi essencial para a realização deste trabalho.

Às parceiras Alessandra Ofuchi, Franciele Knebel, Karen Spadari Ferreira, Simone Marciele Sartoretto, Suelen dos Santos e Priscila Bosa a companhia e amizade de vocês torna São Paulo mais divertida e humana.

À companhia e troca de experiências com os colegas do laboratório de parasitologia, microbiologia, bioquímica, imunologia e patologia.

À prof. Dra. Marilene Rodrigues Chang, minha orientadora de iniciação científica, sua paixão pela pesquisa e pela vida acadêmica foram cruciais nas minhas escolhas profissionais.

Aos amigos que Deus colocou em meu caminho ao longo da vida, muito obrigada por não deixarem nossa amizade se perder no tempo, obrigada por se fazerem presentes através de visitas, recadinhos e emails.

RESUMO

Os dermatófitos são um grupo de fungos que têm a capacidade de invadir o tecido queratinizado (pele, pêlos e unhas) de seres humanos e animais para produzir uma infecção denominada de dermatofitose. O *Trichophyton rubrum* é o principal patógeno causador de dermatofitose. As lesões causadas por estas espécies são crônicas e de caráter pouco inflamatória. A doença apresenta evolução lenta e pacientes cronicamente infectados não respondem bem a terapia antifúngica. Assim como na maioria dos patógenos, o sistema imune inato é determinante na resposta antifúngica. Neutrófilos, macrófagos e células dendríticas constituem as células efetoras do sistema imune.

A resposta imune aos dermatófitos ainda não está bem elucidada. Atualmente é aceito que a resposta imune mediada por células é responsável pelo controle da infecção. Poucos estudos têm focado a resposta imune inata a esses fungos. Assim, fomos estudar a interação de células dendríticas de pacientes com dermatofitose com conídios de *T. rubrum*.

Nossos resultados mostraram que células dendríticas derivadas de monócitos (CDDM) foram capazes de fagocitar conídios de *T. rubrum* e ainda verificamos que estas células permaneceram viáveis após fagocitose. Quando analisamos a viabilidade dos conídios de *T. rubrum*, após 24 e 48 horas de interação com CDDM, verificamos que após 48 horas houve um aumento no número de conídios viáveis quando estes foram fagocitados por células de pacientes, mostrando que CDDM de paciente não conseguem matar os conídios após fagocitose. Avaliamos a liberação de óxido nítrico por CDDM e a análise dos resultados mostrou que não houve diferença significativa na liberação de NO pela CDDM na presença de conídio de *T. rubrum*.

Analisamos a expressão de moléculas co-estimulatórias como CD80, CD86, CD83, CD40 e HLA-DR em pacientes com dermatofitose e em indivíduos controle, observamos que não houve diferença na expressão dessas moléculas na presença de conídios de *T. rubrum* quando comparadas com culturas de CDDM sem conídios. Entretanto, houve uma diminuição do número de células de pacientes que expressam estas moléculas na presença de conídio de *T. rubrum*. Foi detectado um aumento significativo na secreção de TNF- α e de IL-12 pelas CDDM de pacientes quando em contato com conídio de *T. rubrum*.

Avaliamos a capacidade das CDDM de indivíduos controle e pacientes pulsadas com concentrações crescentes de tricofitina em ativar linfócitos T CD4 e também verificamos o perfil de citocinas secretadas pelos linfócitos T CD4 após proliferação. Os resultados demonstraram que as CDDM foram capazes de estimular a proliferação de linfócitos somente em pacientes com dermatofitose. Foi detectado um aumento significativo na secreção de IL-4 pelos LT CD4 de indivíduos controle.

Nossos resultados sugerem uma diferença no perfil de secreção de citocinas em indivíduos controle e pacientes. Indivíduos controle não produzem IL-12 e estimulam preferencialmente linfócitos T CD4 secretores de IL-4. Por outro lado, células dendríticas de pacientes produzem IL-12 e induzem a ativação de linfócitos T produtores de IL-4 e IL-10.

Palavras-chaves: Células dendríticas, *Trichophyton rubrum*, dermatofitose.

ABSTRACT

The dermatophytes are a group of fungi that have the capacity to invade the keratinized tissue (skin, hair and nails) of humans and animals to produce an infection called dermatophytosis. The *Trichophyton rubrum* is the main causative pathogen of dermatophytosis. Injuries caused by these species are chronic inflammatory and little character. The disease shows slow evolution and chronically infected patients do not respond well to antifungal therapy. Like most pathogens, the innate immune system is crucial in the antifungal response. Neutrophils, macrophages and dendritic cells are the effector cells of the immune system.

The immune response to dermatophytes is not yet well elucidated. Currently it is accepted that the immune response mediated by cells is responsible for controlling the infection. Few studies have focused on the innate immune response to these fungi. Thus, we study the interaction of dendritic cells from patients with dermatophytosis with conidia of *T. rubrum*. Our results showed that dendritic cells derived from monocytes (CDDM) were capable of phagocytosed conidia of *T. rubrum* and found that these cells remained viable after phagocytosis. When we analyze the viability of conidia of *T. rubrum* after 24 and 48 hours of interaction with CDDM shows that after 48 hours an increase in the number of viable conidia when they were phagocytized by cells of patients, showing that CDDM not kill the patient after the conidia phagocytosis. Evaluated the release of nitric oxide by CDDM and analysis of results showed that there was no significant difference in the release of NO by CDDM in the presence of conidia of *T. rubrum*.

We analyzed the expression of co-stimulatory molecules such as CD80, CD86, CD83, CD40 and HLA-DR in patients with dermatophytosis and in control subjects, we observed that there was no difference in expression of these molecules in the presence of conidia of *T. rubrum* compared with cultures of CDDM without conidia. However, there was a decrease in the number of cells of patients who express these molecules in the presence of conidia of *T. rubrum*. It was observed a significant increase in the secretion of TNF- α and IL-12 by CDDM of patients when in contact with conidia of *T. rubrum*. Evaluate the capacity of individuals to control and CDDM patients pulsed with increasing concentrations of trichophytin to activate CD4 T lymphocytes and also see the profile of cytokines secreted by CD4 + T lymphocytes after proliferation. The results showed that the CDDM were able to stimulate the proliferation of lymphocytes only in patients with dermatophytosis. We observed a significant increase in the secretion of IL-4 by CD4 LT to control individuals. Our results suggest a difference in the profile of secretion of cytokines in control subjects and patients. Control subjects did not produce IL-12 and preferentially stimulate CD4 T lymphocytes secreting IL-4. Furthermore, dendritic cells of patients produce IL-12 and induce the activation of T lymphocytes producing IL-4 and IL-10.

Keywords: dendritic cells, *Trichophyton rubrum*, dermatophytosis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVO	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Casuística	22
3.2. Critério de inclusão e exclusão	22
3.3. Crescimento e identificação de cepas	22
3.4. Obtenção de conídios de <i>T. rubrum</i>	23
3.5. Tricofitina	23
3.6. Dosagem proteica	23
3.7. Obtenção e caracterização de células dendríticas	23
3.8. Ensaio de fagocitose	24
3.9. Imunofenotipagem de CDDM através de citometria de fluxo	24
3.10. Análise de viabilidade celular	25
3.11. Produção de óxido nítrico	25
3.12. Determinação da viabilidade fúngica após a fagocitose	26
3.13. Dosagem de citocinas de CDDM	26
3.14. Ensaio de proliferação de células T	27
3.14.1. Purificação de linfócitos T	27
3.14.2. Proliferação de linfócitos T mediada por células dendríticas após interação com tricofitina	27
3.15. Análise estatística	28
3.16. Aspectos éticos	28
4. RESULTADOS	29
4.1. Imunofenotipagem de células dendríticas derivadas de monócitos	29
4.2. Fagocitose	30
4.3. Análise de viabilidade celular após interação com conídios de <i>T. rubrum</i>	31
4.4. Análise de viabilidade de conídios de <i>T. rubrum</i> após fagocitose por CDDM	33
4.5. Óxido Nítrico	34
4.6. Imunofenotipagem de CDDM após interação com conídios de <i>T. rubrum</i>	34
4.5. Quantificação de citocinas produzidas por CDDM após fagocitose	36
4.8. Processamento e apresentação de antígenos às células T	38
4.9. Quantificação de citocinas produzidas após ensaio de linfoproliferação	40
5. DISCUSSÃO	42

6. CONCLUSÕES.....	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
8. LISTA DE ABREVEATURAS.....	61
9. ANEXOS	63

1. INTRODUÇÃO

A expressão dermatofitose é utilizada para designar infecções de natureza fúngica causadas por dermatófitos que são um grupo de fungos taxonomicamente relacionados entre si, que em vida parasitária vivem à custa da queratina da pele, das unhas, dos cabelos e dos pêlos de seres humanos e animais (LACAZ, 2002). Eles estão entre os mais comuns agentes infecciosos do homem e não existem regiões geográficas ou povos que não sejam por eles afetados (RIPPON, 1982).

A primeira descrição da origem fúngica das dermatofitoses foi em 1837, quando Robert Remak demonstrou estruturas fúngicas em pacientes com favus, infecção do couro cabeludo hoje atribuída ao *Trichophyton schoenleinii* (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992). O gênero *Microsporum* foi descrito em 1843 por David Gruby, o gênero *Trichophyton* pelo sueco Malmsten em 1845 e *Epidermophyton* individualizado por Sabouraud, em 1907 (LACAZ et al, 2002).

O estudo sistemático dos dermatófitos teve início com os estudos de Sabourand em 1910. Inicialmente, foram descritas apenas as formas assexuadas ou imperfeitas (estado anamorfo) de tais micro-organismos, com numerosas espécies, algumas delas mal identificadas e com nomes duvidosos ou confusos (LACAZ et al, 2002).

Graças, principalmente, à pesquisa de Raymond Vanbreuseghem, eminente micologista belga, vários dermatófitos passaram a ser isolados do solo, inclusive na sua forma sexuada ou perfeita (estado teleomorfo), abrindo-se novos rumos para o estudo da genética de tais fungos. Rhoda Benham, Lucille K. Georg Pickard e Margarida Silva-Hutner, a partir de 1950, começaram a estudar nutrição dos dermatófitos, identificando-os com base em suas características fisiológicas, marco dos mais importantes na história dos dermatófitos. Emmons, em 1934, estabeleceu as bases taxonômicas da classificação dos mesmos (LACAZ et al, 2002).

Os dermatófitos são fungos filamentosos pertencentes à classe *Hiphomycetes* e à família *Moniliaceae*, esse grupo de fungos representa 45 espécies agrupadas em três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, conforme estabelecido por Emmons em 1934, com base na morfologia dos esporos e outras estruturas (LACAZ et al, 2002).

Filogeneticamente os dermatófitos sofreram um processo evolutivo longo que levou a adaptação ao parasitismo de espécies específicas, com perda progressiva da capacidade de reprodução sexuada. Nesse sentido, podem ser divididos em espécies primitivas (geofílicas) e espécies avançadas (antropofílicas) situando-se as zoofílicas em uma fase intermediária (CESTARI, 1990).

A infecção pode ocorrer por contato direto com seres humanos, animais ou solo contaminado através de espécies antropofílicas, zoofílicas e geofílicas, respectivamente, ou por exposição de fômites contaminados. No homem, as espécies zoofílicas geralmente causam tinhas agudas bem delimitadas e de fácil tratamento, conferindo ao indivíduo certo grau de resistência à reinfecção. Já as espécies antropofílicas, especializadas para a vida parasitária e perfeitamente adaptadas ao tecido queratinizado humano, tendem a produzir reações menos inflamatórias e mais crônicas, sendo as responsáveis pela maioria dos casos de dermatofitose. (LOPÉZ-MARTÍNEZ et al, 1994). As lesões causadas por essas espécies apresentam evolução lenta e os pacientes cronicamente infectados não respondem bem à terapia antifúngica. A maioria dos casos mostra que dois terços das espécies de dermatófitos associadas à doença causada em seres humanos são antropofílicas (ALMEIDA, 2007).

O termo “tinha”, originada na Idade Média, é utilizada para descrever as diferentes síndromes clínicas produzidas por dermatófitos, por designar, antigamente, as aberturas circulares produzidas em roupas por traças e que apresentam aspectos similares às lesões anelares da pele causadas por dermatófitos. Sendo assim, na clínica médica, as dermatofitoses recebem o nome da localização topográfica da doença em latim, conjugada à palavra tinha ou *tinea*. Como exemplos têm: *tinea capitis*, *tinea corporis*, *tinea manum*, *tinea barbae*, *tinea unguium*, *tinea cruris* e outros. (KONEMAN et al, 2001). De maneira geral, no Brasil, a *tinea capitis* é a mais frequente em crianças até a puberdade, e o agente mais comum é o *M. canis*. Os outros tipos de *tinea* são mais frequentes em adultos e o agente mais prevalente é o *T. rubrum* (TRABULSI & ALBERTUM, 2005).

As lesões causadas pelos dermatófitos têm início através da inoculação de um artroconídio ou fragmento de hifa depositado na pele, favorecida por uma escoriação ou lesão pré-existente. O fungo cresce de forma circular e centrífuga na camada córnea,

onde o indivíduo desenvolve uma reação inflamatória dependente do hospedeiro e virulência do fungo (ALMEIDA, 2007).

A queratina, proteína sulfatada com vários ácidos aminados, encontrada na pele, pêlo e unhas presta-se ao crescimento dos dermatófitos (LACAZ, 2002). A afinidade dos dermatófitos por queratina é uma condição essencial à sua existência. Esses fungos produzem queratinase e outras substâncias proteolíticas. Sugere-se que essas enzimas, difundidas através da epiderme sejam responsáveis pela reação inflamatória (ZAITZ, 1994). Os aspectos clínicos das lesões dermatofíticas são bastante variados e resultam da combinação de destruição da queratina associada a uma resposta inflamatória, mais ou menos intensa, na dependência do binômio parasita/ hospedeiro (SIDRIM & MOREIRA, 1999).

O diagnóstico microbiológico dos agentes causadores de dermatofitoses é realizado, primeiramente, a partir da coleta do material clínico, como raspado das bordas das lesões ou da região subunguial e pêlos infectados, onde se encontra o fungo viável. A partir daí, faz-se uma análise no microscópio, do material biológico após clareamento com hidróxido de potássio 10% a 30% com ou sem dimetilsufóxido, observando a presença de hifas claras ramificadas septadas ou artrosporadas, sem, contudo, definir o agente etiológico. Para que a espécie seja identificada, é necessário o isolamento do fungo através da realização da cultura em ágar Sabourand-dextrose contendo ou não cloranfenicol ou cicloheximida como inibidores de possíveis contaminantes bacterianos ou fúngicos. Após 10-15 dias, em média, ocorre o crescimento de colônias cotonosas característica de bolor. É necessário também fazer microcultivo em lâmina a partir da colônia da cultura. A identificação de gênero e espécies é realizada pela análise microscópica, analisando a forma e disposição dos conídios (KONEMAN et al, 2000).

Os dermatófitos constituem o grupo de fungos mais frequentemente isolados, estudos epidemiológicos indicam que as dermatofitoses estão entre as doenças mais comuns do mundo, sendo considerada o terceiro distúrbio de pele mais diagnosticado em crianças menores de 12 anos e o segundo na população adulta (ALMEIDA, 2007). A infecção por dermatófitos afeta aproximadamente 40% da população mundial e representa 30% de todas as infecções micóticas cutâneas. As

onicomicoses são as mais frequentes das doenças das unhas, representando de 18 a 40% de todas as onicopatias (GUPTA et al, 1998).

A distribuição geográfica dos dermatófitos mostra-se bastante variável; enquanto alguns são cosmopolitas, como *T. rubrum* e *T. tonsuras*, outros são mais restritos, e sua distribuição depende dos seguintes fatores: adaptação ao ambiente, deslocamento humano, convívio com animais domésticos, aspectos sócio-econômico, sexo, idade e imunidade do hospedeiro, promovendo, assim, variações no espectro destes fungos de região para região.

Dentre estes fungos o *Trichophyton rubrum* é o principal agente causador de dermatofitoses, principalmente as crônicas e refratárias ao tratamento. O tratamento das infecções causadas por esse agente geralmente é realizado com antifúngicos de uso tópico, e muitas vezes uma regressão na lesão cria a falsa impressão de cura e logo que a medicação é suspensa ocorre a recaída (ZAITZ, 1992).

Estudos epidemiológicos no Brasil têm mostrado o predomínio de *T. rubrum* nos casos de dermatofitose. Em um trabalho realizado em Goiânia - GO, no período de 1993 a 1997 foram descritos 1595 casos de dermatofitose, sendo que desses o *T. rubrum* foi encontrado em 37,4% dos casos, seguido por *T. mentagrophytes* (36,4%) e *M. canis* (16%) (revisado por ALMEIDA, 2007). Foram analisados 15.300 casos suspeitos de dermatofitose no Laboratório de Micologia do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, durante o período de janeiro de 1992 a junho de 2002, desses 655 foram positivos para dermatófitos. O *T. rubrum* foi encontrado em 48,7% dos casos, seguido por *M. canis* (20,9%), *T. tonsurans* (13,8%), *T. mentagrophytes* (9,7%), *E. floccosum* (4,1%) e *M. gypseum* (2,5%) (MARTINS et al, 2003). Tavares da Silva (1998) estudou, em nosso meio, 105 casos de dermatofitose inguinal, verificando ser o *T. rubrum* o agente etiológico mais frequentemente isolado (90%), seguido por *T. tonsuras* (6%) e *T. mentagrophytes* (4%) (SILVA-TAVARES et al, 2001).

Além de lesões cutâneas superficiais, os dermatófitos, principalmente os do gênero *Trichophyton*, podem provocar processos invasivos, atingindo a derme, a hipoderme e até órgãos profundos. Hoje em dia, com o emprego sistêmico ou local de corticóides em hospedeiros comprometidos, muitas dermatofitoses assumem

características aberrantes com localizações até viscerais provocadas principalmente por *T. rubrum*, *T. violaceum* e *T. verrucosum* (FERREIRA & ÁVILA, 2000).

Uma das formas de acometimento profundo por dermatófito é o chamado granuloma tricofítico de Majocchi, trata-se de uma dermatofícia profunda, uma foliculite e perifoliculite granulomatosa, com nódulos e placas infiltradas quase sempre, provocadas pelo *T. rubrum*. Essa forma de granuloma, descrita em 1883 por Majocchi, pode ser nodular, isolada ou difusa. Os pacientes acometidos usualmente têm doença de base (LACAZ, 2002). Blank (1960) descreveu, em pacientes imunocomprometidos, infecção acompanhada pela formação de numerosos nódulos subcutâneos e abscessos. A biópsia demonstrou a invasão dos tecidos por hifas, sendo o micro-organismo identificado como *T. rubrum*.

Diversas situações ou condições clínicas dos pacientes podem predispor ao desenvolvimento da dermatofitose aguda ou crônica, envolvendo fatores cutâneos (umidade, abrasão e composição lipídica da pele, distúrbio na queratinização, doença vascular periférica, etc.) e fatores sistêmicos (diabetes, doença de Cushing, terapia com corticosteróide, atopia, alterações hematológicas, predisposição genética, etc.). O estudo desses fatores, juntamente com as características do fungo patogênico e aspectos imunológicos do paciente, tem permitido o melhor conhecimento dessa relação parasita-hospedeiro nas infecções dermatofíticas (LACAZ et al, 2002).

Os primeiros estudos sobre a resposta imunológica causada no homem pela infecção por dermatófitos foram feitos por Bloch em 1928 (GRAPPEL et al, 1974). Na atualidade, após numerosos trabalhos, está claramente demonstrado que, apesar das dermatofitoses serem infecções superficiais, seus agentes são capazes de induzir resposta imunológica, tanto na infecção experimental, como natural em animais e no homem (ZAITZ, 1994).

O antígeno de dermatófito mais utilizado em estudos imunológicos é um antígeno bruto denominado tricofitina (ZAITZ, 1994). A separação e caracterização dos componentes antigênicos dos dermatófitos tiveram início em 1925 com Bloch e colaboradores, que identificaram um polissacarídeo contendo nitrogênio, como sendo o componente ativo da tricofitina (GRAPPEL et al, 1974). A primeira tentativa de produzir uma tricofitina purificada ocorreu em 1960 por Cruickshank e colaboradores. Ao realizar

uma intradermo-reação com tricofitina obtem-se dois tipos de resposta, a imediata e a tardia.

A reação imediata corresponde a do tipo I e a leitura é considerada positiva quando, após vinte minutos da inoculação, observa-se uma lesão palpável maior ou igual a 11 mm com eritema ao redor. Essa positividade pode ser passivamente transferida pelo soro, mostrando que existem anticorpos circulantes da classe IgE. De acordo com Hanifin & Ray, a reação imediata aparece mais freqüentemente nas dermatofitoses crônicas por *Trichophyton rubrum* (HANIFIN et al, 1973).

Da mesma forma, a reação do tipo tardia pode ser efetivamente avaliada *in vivo*, através da resposta imune celular, correspondente à reação do tipo IV. A leitura se faz após 48 horas da injeção e é considerada positiva quando ocorre lesão palpável eritêmato-edematosa maior ou igual a 4 mm. Os mecanismos protetores contra fungos dermatófitos são mediados principalmente por células (ZAITZ, 1994). A ausência de resposta de hipersensibilidade tardia ao teste cutâneo à tricofitina sugere possível deficiência da resposta imune mediada por células e cronicidade da infecção (DAHLL, 1994). Pacientes que apresentam esta imunidade prejudicada, frequentemente desenvolvem infecções fúngicas extensas e recorrentes na pele, no couro cabeludo, unhas e mucosas (HANIFIN, 1990).

Foi observada na dermatofitose em animais a presença de infiltrado mononuclear e células inflamatórias perivasculares na derme de indivíduos infectados (LEPPER, 1974). Dois achados confirmaram o papel protetor da resposta mediada por células a *Trichophyton* sp. Primeiro, a associação de reação de hipersensibilidade tipo tardia em testes de pele com lesões inflamatórias altamente agudas e segundo, a resistência à reinfecção (KAAMAN, 1981).

A epiderme constitui um sistema de defesa, que envolve populações de células, como os queratinócitos, que além de representarem uma barreira física para os micro-organismos, podem participar de eventos imunológicos através da produção de citocinas e fatores quimiotáticos; e as células de Langerhans, que são capazes de fagocitar, processar e apresentar antígenos presentes na pele aos linfócitos T, gerando reações imunológicas cutâneas contra infecções fúngicas (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

A fagocitose, como um mecanismo de defesa imune inata, foi primeiramente demonstrada por Eli Metchnikov no final do século XIX . Desde então, vem sendo estudada como um modelo clássico de interação entre sistema imune e micro-organismos, além de grandes trabalhos estarem sendo realizados para entender as conseqüências desta interação. A eliminação de patógenos é realizada principalmente por células denominadas fagócitos mononucleares, que se originam na medula óssea como pró-monócitos, circulam no sangue como monócitos, acomodam-se nos tecidos, amadurecem e tornam-se macrófagos, especializados na captura, no englobamento e na degradação de micro-organismos (UNDERHILL et al, 2002).

Os macrófagos estão presentes no tecido conjuntivo de vários órgãos, como baço, linfonodos, fígado e em cavidades corporais, como a peritoneal e pleural. Estão presentes também na vias aéreas, no cérebro e nos ossos. São as células de ligação da imunidade inata com a imunidade adaptativa por terem a capacidade de fagocitar, processar e apresentar os antígenos aos linfócitos. A ação dessas células inicia-se com a fagocitose, que depende de contato físico entre a membrana do fagócito e a do micro-organismo (CALICH, 2001).

O macrófago e seus precursores circulantes, os monócitos, exercem papéis centrais na imunidade inata e adquirida e são células efetoras para a eliminação de micro-organismos. Por outro lado, anticorpos são relativamente ineficientes em controlar e eliminar uma dermatofitose, por isso a imunidade celular é crucial nesta infecção. Portanto, pacientes com deficiências imunológicas que envolvam este tipo de resposta e que já estejam infectados por dermatófitos se tornam mais susceptíveis à instalação do fungo na derme (SMITH et al, 2001).

Atualmente, a incidência de micoses, principalmente causadas por fungos oportunistas em indivíduos imunocomprometidos, tem aumentado drasticamente (ALTAMURA et al, 2001). Uma grande variedade de fatores está envolvida na proteção e defesa contra infecções fúngicas. A imunidade inata, representada principalmente por leucócitos polimorfonucleares (monócitos e neutrófilos) e células dendríticas, exercem papel central nos estágios iniciais de uma micose, fagocitando e muitas vezes eliminando completamente o fungo (MANSOUR & LEVITZ, 2002). Mesmo quando estas células não são capazes de conter a infecção, ativam a imunidade adaptativa, através

da apresentação de antígenos aos linfócitos. Neste momento, a resposta imune celular, verificada pela ativação de linfócitos Th1 e produção de citocinas que potencializam a ação de células fagocíticas, mostra-se extremamente eficiente na eliminação completa de patógeno como *Paracoccidioides brasiliensis*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e muitos outros fungos responsáveis por diversos tipos de micoses (CLEMONS et al, 2000).

A fagocitose de fungos ocorre geralmente após terem sido opsonizados. A ativação de complemento resulta na acumulação de neutrófilos, aumentando a fagocitose de células fúngicas tais como blastoconídios de *Candida albicans* (PEREIRA & HOSKING, 1984) e conídios de *Aspergillus fumigatus* (RICHARDSON et al, 1991). Entretanto, muitas áreas do organismo, como pulmão, fluido cérebro-espinhal e pele são pobres em complemento, e devido a muitos micro-organismos interagirem com células fagocíticas em locais ausentes de soro, torna-se necessário a existência de outros mecanismos, não-opsônicos, para a ocorrência de fagocitose (RICHARDSON & BELL, 1995).

Os poucos estudos realizados entre interação de células de dermatófitos e fagócitos humanos, baseia-se em sistemas dependentes de complemento. Richardson e colaboradores confirmaram que a fagocitose máxima de artroconídios de *T. mentagrophytes* ocorre em presença de complemento e anticorpos específicos. Esses achados sugerem que o reconhecimento direto e específico de moléculas presentes na superfície de artroconídios por estruturas complementares na superfície dos fagócitos existe como um mecanismo alternativo de fagocitose (RICHARDSON & BELL, 1995).

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

Para que ocorra uma resposta mediada por linfócitos T, é necessário que estes interajam com os APCs (células dendríticas, linfócitos B e macrófagos), proliferem e se diferenciem em células efectoras, pois embora os linfócitos T reconheçam antígenos com alta especificidade, elas não são capazes de iniciar uma resposta imune, nem decidirem seu tipo (Th1/Th2).

Dentre as células capazes de apresentar antígenos, destacam-se os linfócitos B, macrófagos e células dendríticas. Estas células são também conhecidas como APCs profissionais, pois expressam, em sua superfície, grande quantidade de moléculas de classe II codificadas pelo complexo de histocompatibilidade e moléculas acessórias (CD80 e CD86), que são essenciais para a completa ativação dos linfócitos T (BANCHEREAU et al, 1998). Enquanto os macrófagos e, principalmente, os linfócitos B são importantes APCs quando os linfócitos entram em contato com o antígeno pela segunda vez, as células dendríticas (CDs) são fundamentais no primeiro contato com o antígeno, pois são as únicas capazes de ativar células T “naive” e induzir a resposta imune primária, promovendo consequentemente o estabelecimento da memória imunológica (BANCHEREAU et al, 2000).

As células dendríticas foram descritas em 1973 por COHN e STEINMAN e desde então, têm interessado os pesquisadores de todo mundo por serem capazes de determinar a especificidade e natureza da resposta imune (Th1/Th2). As células dendríticas são células apresentadoras de antígenos capazes de fazer o “link” entre a resposta imune inata e adaptativa, sendo as únicas a migrarem para os órgãos linfóides secundários para apresentarem o antígeno aos linfócitos T “naive”, tornando-se células apresentadoras de antígenos “profissionais”. Além de serem eficientes na captura do antígeno, são capazes de processá-los e apresentar seus peptídeos via MHC-II aos linfócitos T “naive”.

As células dendríticas estão localizadas nos sítios de exposição de antígenos, como a mucosa e tecidos periféricos. Os precursores destas células originam-se na medula e constantemente migram para diversos tecidos, tais como pele (onde são denominados de células de Langerhans), sistema gastrointestinal, respiratório, sangue e linfa. Nos tecidos periféricos, essas células são ineficientes na apresentação de antígenos e na ativação de células T, pois possuem fenótipo imaturo. Células dendríticas imaturas apresentam baixa expressão de moléculas co-estimulatórias e moléculas de MHC de classe I e II, mas possuem grande capacidade fagocítica (JANEWAY, 2007).

Durante a maturação, as células dendríticas perdem sua capacidade de capturar e processar o antígeno, aumentando a expressão de moléculas de HLA-DR, co-

estimulatórias (CD40, CD80 e CD86) e de adesão (CD54) e aumentam a produção de IL-12 (SALLUSTO & LANZAVECCHIA, 1994; BANCHEREAU & STEINMAN, 1998 e GUERMONPREZ, *et al.*, 2002). O aumento da expressão das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 que se ligam ao CD28 tornam as células dendríticas eficientes ativadoras de células T (GUERMONPREZ, *et al.*, 2002).

Os receptores de superfície relatados como responsáveis pela ativação e maturação das células dendríticas são: receptores tipo TOLL (TLR), receptores de citocinas, receptores de TNF (TNF-R) e receptores para a porção Fc de anticorpos. Atualmente, sabe-se que as células dendríticas de camundongos expressam receptores para a porção Fc das imunoglobulinas (FcR): FcγRI (CD64), FcγRIII e FcγRII (CD32) (FANGER *et al.*, 1996 e ESPOSITO-FARESE *et al.*, 1995).

Em vários modelos de doenças infecciosas, as células dendríticas vêm sendo estudadas por sua capacidade de servir como adjuvante a vacinas mediando proteção contra bactérias, vírus, parasitas ou fungos (MOLL & BERBERICH, 2001). Diversos estudos revelam a eficiência de células dendríticas em ensaios de vacinação para: *Candida albicans* (FE D'OSTIANI, *et al.*, 2000) e *L. major* (FLOHÉ, *et al.*, 1998).

Ahuja e colaboradores (1999) mostraram que células dendríticas pulsadas com proteínas de *Leishmania donovani* (*L. donovani*) e transferidas adotivamente para camundongos BALB/c induziram uma resposta antígeno específica do tipo Th1. Esses autores também mostraram que a administração de células dendríticas pulsadas com antígeno, antes ou durante a infecção com *L. donovani*, induziu proteção, diminuindo o número de parasitas nos órgãos infectados, sendo esse efeito mais evidente em células dendríticas transfectadas com genes retrovirais que aumentam a produção de IL-12 biologicamente ativa.

Nos últimos anos, compreendendo-se mais sobre a biologia de células dendríticas, tem-se dado muita atenção ao desenvolvimento de estratégias de tratamento e vacinação principalmente em câncer e AIDS utilizando-se essas células (STEINMANN, 1996 e LOTZE, 1997). O estudo para o uso de células dendríticas como o ponto principal para o desenvolvimento de estratégias de vacinação e imunoterapia baseia-se nas propriedades biológicas dessas células de possuir os processos de captura, processamento e apresentação de antígenos a linfócitos T "naive", que são

altamente eficientes, resultando em uma resposta imune específica e interagindo o sistema imune inato e adaptativo.

Apesar dos estudos que vem sendo realizados, a imunologia das dermatofitoses ainda está pouco elucidada, principalmente em formas crônicas da doença. Assim torna-se necessário a realização de mais estudos nesta área, pois esclarecimentos sobre o mecanismo imunológico das diversas respostas imunes para fungos do gênero *Trichophyton*, têm uma importante aplicação não apenas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas alternativas no tratamento de infecções fúngicas crônicas, mas também para outras doenças crônicas causadas por uma grande variedade de patógenos (WOODFOLK et al, 1998).

Recentemente nosso grupo demonstrou que macrófagos de camundongos da linhagem A/J, obtidos através de lavagem peritoneal com meio RPMI foram capazes de realizar a fagocitose de conídios de *T. rubrum* principalmente através da via de manose. Uma vez internalizados, os conídios provocaram diminuição significativa na expressão de moléculas de superfície celular de macrófagos, tais como MHC classe II, CD80 e CD54, importantes no processo de apresentação e ativação de linfócitos T. Os conídios apresentaram, ainda, a capacidade em induzir a secreção de IL-10 por macrófagos, uma citocina com propriedade inibitória na resposta imunológica e após 24 horas, os conídios provocaram lise e a conseqüente morte destas células (CAMPOS et al, 2005).

Nosso grupo também demonstrou que macrófagos, obtidos a partir de monócitos de sangue periférico de pacientes com dermatofitose causada por *T. rubrum* e de indivíduos controles, foram capazes de fagocitar conídios de *T. rubrum*, no entanto observou-se uma grande diminuição das células CD14⁺ viáveis após 8 horas de interação com os conídios. Analisando a expressão de moléculas co-estimulatórias (CD80, CD86, HLA-DR), observou-se que macrófagos viáveis de pacientes e controles apresentaram expressão dessas moléculas na superfície, porém na presença de conídios nenhuma alteração foi observada. Foi detectado aumento significativo na secreção de IL-10 e TNF- α pelos macrófagos de indivíduos controle quando em contato com conídios de *T. rubrum*, já em pacientes com dermatofitose houve aumento apenas na síntese de TNF- α . Houve expressão de TLR-4 por ambos os grupos estudados e

maior expressão de TLR-2 apenas em pacientes, na presença do fungo (BOMFIM et al, 2008).

Por estes achados e pelos estudos prévios já realizados com *Trichophyton rubrum*, tem-se a necessidade de um melhor entendimento nas etapas iniciais da ativação da resposta imune celular, e certamente células dendríticas são células chaves no desenvolvimento dessa resposta. Portanto, nosso trabalho pretende esclarecer os mecanismos envolvidos na interação de *T. rubrum* com células dendríticas e as possíveis conseqüências dessa interação.

2. OBJETIVOS

Analisar a interação das células dendríticas, geradas a partir de monócitos de sangue periférico de pacientes com dermatofitose, com conídios de *Trichophyton rubrum* a partir de:

- Fagocitose de conídios;
- Verificação da viabilidade de conídios fagocitados por CDDM;
- Produção de óxido nítrico;
- Expressão de moléculas de superfície: CD40, CD80, CD86, CD83, CD1a e HLA-DR;
- Secreção pela CDDM de citocinas: IL-12, IL-10 e TNF- α ;
- Capacidade de ativação de linfócitos T por células pulsadas com tricofitina.
- Secreção de Citocinas: IL-10, IFN- γ , IL-4 e IL-17 após ativação de linfócitos T por células pulsadas com tricofitina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Casuística

Para a realização deste trabalho foram analisados um total de 7 pacientes com dermatofitose (3 do sexo masculino e 4 do sexo feminino), com idade entre 20 a 73 anos e média de idade de 38,5 anos. Os locais do corpo acometido foram: planta dos pés, mão, unhas, coxa e virilha, sendo que alguns pacientes possuíam lesões em mais de um local do corpo.

No grupo controle foram analisados 7 indivíduos (5 do sexo feminino e 2 do sexo masculino) com idade variando de 25 a 42 anos e média de idade de 28,7 anos.

3.2. Critério de inclusão e exclusão

Todos os pacientes que participaram deste trabalho apresentavam dermatofitose superficial ativa causada por *T. rubrum*, com ausência de qualquer outra doença ou tratamento.

Os indivíduos controle participantes desta pesquisa são pessoas sem histórico de dermatofitose, com ausência de qualquer outra doença ou tratamento

3.3. Crescimento e identificação das cepas

Foram utilizadas cepas de *T. rubrum* obtidas de pacientes do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As amostras de fungos foram provenientes de pacientes que não estavam realizando tratamento tópico ou oral com antifúngicos, para não haver interferência no mecanismo do crescimento do fungo *in vitro*.

A identificação do fungo foi realizada através de exame direto, onde observamos a presença de hifas septadas hialinas. Em seguida, o material clínico foi semeado em Sabouraud-dextrose ágar (MERCK – Alemanha) e mantidas a 25°C. Após um período de aproximadamente 7 dias, a partir das colônias crescidas, realizou-se o microcultivo e após 10 a 15 dias foi possível a identificação completa do fungo através da observação microscópica de estruturas típicas, caracterizando o dermatófito *T. rubrum*. As cepas foram mantidas Sabourand-dextrose ágar a 25°C.

3.4. Obtenção de conídios de *Trichophyton rubrum*

Os conídios de *T. rubrum* foram isoladas através do cultivo do fungo em caldo Batata (BD- França), por analogia à técnica de microcultivo, que utiliza o ágar Batata, pobre em nutrientes, para se conseguir um número maior de conídios do fungo.

Após crescimento do fungo em meio Sabouraud-dextrose ágar, as colônias foram raspadas com alça de platina em "L" e transferidas para um Erlenmeyer de 250mL contendo 50mL de caldo Batata . O inóculo foi cultivado sob agitação constante por 3 dias a 200 rpm, depois deixado em repouso por aproximadamente 30 minutos para que as hifas sedimentassem espontaneamente e o sobrenadante, contendo os conídios foi recolhido com pipeta de bulbo e filtrado em gaze estéril. Os conídios foram lavado com tampão PBS 1X (2,65g de Na_2HPO_4 , 0,358g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$, 8,18g número de NaCl, q.s.p 1L de água destilada) e depois ressuspenso em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino (Cultilab- Campinas, Brasil), o mesmo meio usado no cultivo das células. O número de conídios foi contado em câmara de Neubauer e ajustado de acordo com cada ensaio.

3.5. Tricofitina

A tricofitina utilizada neste trabalho foi cedida gentilmente pelo Laboratório de Micologia Médica do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo.

3.6. Dosagem de proteínas

A dosagem protéica da tricofitina foi realizada segundo a técnica de Bradford (1976), utilizando CBB G-250 e como padrão utilizamos albumina bovina (Sigma, Alemanha).

3.7. Obtenção e caracterização de células dendríticas

As células mononucleares do sangue periférico de pacientes com dermatofitose ou indivíduos controle foram isoladas a partir de 60mL de sangue venoso coletado em tubos a vácuo contendo heparina como anticoagulante. A separação se deu através do gradiente de densidade usando Ficoll-Hypaque (SIGMA – USA), que é uma solução de polissacarose e diatrozoato de sódio, ajustada a uma densidade de $1,077 \pm 0,001\text{g/mL}$.

As amostras de sangue heparinizados foram adicionadas, cuidadosamente, ao Ficoll-Hypaque (SIGMA – USA) na proporção de 1:2 (sangue:Ficoll), formando duas fases, e então centrifugadas por 40 minutos a 2000 rpm. O anel contendo as células mononucleares após a centrifugação foi aspirado com pipeta de bulbo e as células lavadas com tampão PBS 1X pH7,2. Posteriormente, as células foram incubadas com 80µl de tampão Beads (PBS 1X, 0,5% de soro fetal bovino, 2mM de EDTA) e 20µl de anticorpo monoclonal anti-CD14 acopladas com esferas magnéticas para purificação de monócitos (MicroBeads- MACs), por 30 minutos à 4°C. A solução foi centrifugada por 10 minutos, lavada com PBS 1X e ressuspensa no mesmo tampão usado anteriormente. A separação magnética foi feita através de seleção positiva. As células restantes foram congeladas para utilização, como fonte de linfócitos T, nos ensaios de linfoproliferação. As células dendríticas foram geradas por cultura de monócitos em placas de cultura com seis poços (Costar Coporation, Cambridge, MA) e suplementadas com 50ng/mL de GM-CSF (Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos e Macrófagos) recombinante (Pharmingen) e com 50ng/mL de IL-4 por 7 dias. No 3º e 5º dias o meio RPMI com GM-CSF e IL-4 foi repostado.

3.8. Ensaio de fagocitose

Para o teste de fagocitose, as células dendríticas foram cultivadas sobre lamínulas de vidro em placa de 24 poços. O número de célula foi ajustado em câmarade Neubauer em 2×10^5 . Foram adicionados conídios de *T. rubrum* na proporção de um conídio para cada célula dendrítica e incubadas por 4, 8 e 12 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas com PBS 1X para remoção de conídios não fagocitados e coradas com Giemsa (MERCK - Alemanha). Após a coloração, as lamínulas foram fixadas com Entellan (MERCK - Alemanha) e posteriormente, analisadas em microscópio óptico comum (400x e 1000x).

3.9. Imunofenotipagem de CDDM através de citometria de fluxo

Após a interação das células dendríticas com os conídios de *T. rubrum* como descrito anteriormente, o fenótipo destas células foi analisado a partir dos seguintes marcadores: HLA-DR, CD40, CD80, CD83, CD86 e CD1a.

Células dendríticas diferenciadas foram contadas em câmara de Neubauer em 1×10^6 células por poço em placa de 24 poços. Esta quantidade de células foi incubada com concentração de um conídio para cada célula dendrítica. As placas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 6 horas. Após este período, foram separadas aliquotas de cada poço e adicionadas 20µl de cada anticorpos para marcação (α -HLA-DR, α -CD40, α -CD80, α -CD83, α -CD86 e α -CD1a) e incubadas em banho de gelo por 30 minutos. Após incubação, acrescentamos solução fixadora (2% de glicose, 1% de formaldeído, diluídos em PBS). As amostras permaneceram assim por no máximo 7 dias, até análise, quando as células marcadas foram lavadas com PBS 2% de soro fetal bovino e analisada a média de intensidade de fluorescência (MIF) por citometria de fluxo. Como controle negativo foram utilizadas células não estimuladas.

Para análise por citometria de fluxo, foi utilizado o aparelho FacScalibur (Becton & Dickison, CA). Os dados foram analisados utilizando-se o software Flowjo (TREE STAR, Inc.- USA).

3.10. Análise de Viabilidade celular

Após a interação de 4, 8 e 16 horas das células dendríticas derivadas de monócitos com os conídios de *T. rubrum* as células foram lavadas e ressuspensas em PBS 1X com 1% de BSA e foi adicionado 2µl de iodeto de propídio para análise de morte celular através da intensidade de fluorescência por citometria de fluxo. Como controle negativo foram utilizadas somente células sem estímulo por *T. rubrum*.

Para análise por citometria de fluxo, foi utilizado o aparelho FacScalibur (Becton & Dickison, CA). Os dados foram analisados utilizando-se o software Flowjo (TREE STAR, Inc.- USA).

3.11. Produção de óxido nítrico

A dosagem de óxido nítrico no sobrenadante de cultura de CDDM com e sem conídios de *T. rubrum* foi determinada por meio de um analisador de NO (NOA modelo 280, Sievers Instruments). Os resultados foram expressos em µM, com base em uma curva padrão feita com concentrações conhecidas de nitrato de sódio em meio de cultura (5, 10, 30 e 60 µM de NO₂⁻).

3.12. Determinação da viabilidade fúngica após a fagocitose

CDDM de indivíduos controle foram obtidas e cultivadas, como descrito anteriormente. Foram adicionadas às culturas, conídios de *T. rubrum* em uma proporção de 1 conídios para cada CDDM e incubadas em estufa, a 37°C em 5% de CO₂ por períodos de 24 e 48 horas. Após estes períodos, os sobrenadantes foram desprezados e as células foram lavadas 3 vezes com PBS estéril para remoção de conídios não fagocitados. Em seguida, foi adicionado 1mL de água destilada às células para lisa-las e promover a liberação de conídios que haviam sido internalizados. O conteúdo foi coletado com “cell scraper” e 300µL desta suspensão foi semada em Sabourand – dextrose ágar e mantido a 30°C por 7 dias, para verificar unidade formadoras de colônias.

3.13. Dosagem de citocinas de CDDM

As citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α foram dosadas do sobrenadante de culturas de CDDM estimuladas com conídios de *T. rubrum*. Após 24 e 48 horas, os sobrenadantes foram recolhidos e estocados a -80°C em freezer, até o uso.

Também dosamos as citocinas IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-17 que foram mensuradas dos sobrenadantes da cultura de LT CD4 de pacientes e de indivíduos controle na presença de CDDM pulsadas com tricofitina na concentração de 5 µg/mL e 10 µg/mL.

Para realizar o procedimento, placas de microtitulação de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpo de captura diluído em PBS e mantidas a 4°C de um dia para o outro. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS 1X- Tween 20 a 0,05%. Foi adicionados às placas, PBS contendo 1% de BSA, para promover o bloqueio de sítios livres do plástico e mantido por 1 hora a temperatura ambiente. As citocinas recombinantes, utilizadas para realizar a curva padrão, foram diluídas em PBS contendo 1% de BSA e incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. Os sobrenadantes de cultura foram também incubados em poços por este mesmo período, quando então todos os poços foram lavados 3 vezes com PBS - Tween 20 a 0,05%. Foram adicionados os anticorpos de detecção conjugados a biotina, diluídos em PBS

1% de BSA e incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Os poços foram lavados 5 vezes. As placas foram incubadas com conjugado estreptoavidina-peroxidase por 30 minutos em temperatura ambiente e os poços lavados 7 vezes. A revelação foi realizada com o-fenilenodiamina 1mg/mL, diluída em tampão fosfato 0,4M citrato de sódio 0,4M pH 5,3, por 15-30 minutos. O bloqueio da reação com H_2SO_4 4N e leitura das densidades ópticas (DO) em leitora automática, em comprimento de onda de 492nm. As concentrações de cada citocina foram calculadas com base na equação da reta de regressão linear, da curva padrão obtida com citocinas recombinantes humanas.

3.14. Ensaio de proliferação de células T

3.14.1. Purificação de linfócitos T

Após descongelamento das células restantes da purificação de células CD14^+ a partir das células mononucleadas, essas células foram incubadas com anticorpos anti- CD4^+ *microbeads* (Miltenyi Biotec). Os linfócitos T CD4^+ foram separados das outras linhagens celulares utilizando-se o kit MACS LS Columns (Miltenyi Biotec), segundo o fabricante.

3.14.2. Proliferação de linfócitos T mediada por células dendríticas após interação com tricofitina

Linfócitos T CD4^+ purificados foram ressuspensos em meio RPMI suplementados com 2% soro fetal bovino (R2). As células foram contadas em câmara de Neubauer e alicotadas 15×10^4 em placas de 96 orifícios. As células dendríticas, ativadas por 24 horas com LPS, foram previamente incubadas com doses crescentes de tricofitina (2 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$) por 4 horas. Em seguida, as células foram centrifugadas, ressuspensas em meio R2 e co-cultivadas com os linfócitos T, em uma proporção de 3 linfócitos para uma célula dendrítica (3:1). A placa foi incubada em atmosfera de CO_2 , por 72 horas, a 37°C. A fitohemaglutinina (PHA) (20 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizada como controle positivo da proliferação celular.

Nas 16 horas precedentes à análise da linfoproliferação, adicionou-se 1 μCi de timidina triciada em cada poço da cultura celular. Posteriormente as células

foram coletadas por um coletor automático de células (cell haverster), e mensuradas quanto à incorporação da timidina através da emissão de radiações beta (Liquid Scintillation Counter, 1205 betaplate, Wallac).

3.15. Análise estatística

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

3.16. Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelo comitê de Ética e Pesquisa da FCF/USP e pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Segue Anexo).

4 – RESULTADOS

4.1. Imunofenotipagem de células dendríticas derivadas de monócitos

O fenótipo das células dendríticas foram avaliada por citometria de fluxo através da análise da expressão do seu marcador específico CD1a e a molécula HLA-DR, expressa constitutivamente nessas células.

Após marcação das células com CD1a (FITC) e com HLA-DR (PE) observou-se que mais de 80% das células expressaram CD1a e que mais de 90% expressaram a molécula de histocompatibilidade HLA-DR (**Figura 1**).

Figura 1 - Análise do fenótipo de CDDM. O fenótipo das células dendríticas derivadas de monócitos de sangue periférico foi confirmado por citometria de fluxo (10.000 eventos). As células foram marcadas com anticorpo anti-CD1a (marcado com fluorocromo FITC- isotiocianato de fluoresceína) e anti-HLA-DR (marcado com fluorocromo PE- ficoeritrina). *Gating* vermelho representa a fluorescência natural das células (controle negativo) e os números representam a porcentagem destas células.

* FSc- Forward Scatter (parâmetro de tamanho) e ** SSc- Side Scatter (parâmetro de granulosidade).

4.2. Fagocitose

As células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com dermatofitose e de indivíduos controle incubadas por 4, 8 e 12 horas com conídios de *T. rubrum* na proporção de 1:1, revelaram a capacidade de fagocitar conídios de *T. rubrum* após 4 horas (**Figura 2**). Algumas células após contato com conídio de *T. rubrum* apresentaram mudanças morfológicas com formação de vacúolos citoplasmático. Os mesmos resultados foram observados com células de indivíduos normais. Não observamos mudanças morfológicas nos conídios fagocitados nos períodos analisados pelo ensaio.

Figura 2 – Fagocitose de conídios de *T. rubrum* por CDDM de pacientes. Células dendríticas derivadas de monócitos foram colocadas em contato com conídios de *T. rubrum* na proporção de 1:1. Coloração de Giemsa, 400X e 1000X.

- A) apenas CDDM
- B) CDDM com conídio por 4 horas.
- C) CDDM com conídio por 8 horas.
- D) CDDM com conídio por 12 horas.

4.3. Análise de viabilidade celular após interação com conídio de *T. rubrum*

As células dendríticas de pacientes com dermatofitose causada por *T. rubrum* e de indivíduos normais incubadas em uma cinética de 4, 8 e 16 horas com conídios de *T. rubrum* na proporção de 1:1. A análise da viabilidade das células foi avaliada por citometria de fluxo através da análise da expressão de iodeto de propídio (PI).

O iodeto de propídeo é um composto fluorescente que se liga ao DNA e intercala-se inespecificamente entre as bases nitrogenadas dos nucleotídeos. Normalmente não atravessa a membrana celular (pouco lipossolúvel). Portanto, se atravessar indica perda de viabilidade celular.

Podemos observar que não houve diferença significativa no número de células viáveis após os diferentes períodos de incubação com conídeo. Também não houve diferença no número da viabilidade das células na presença ou ausência de conídeos (**Figura 3**). Resultados semelhantes foram obtidos com células de indivíduos controles.

Figura 3- Análise da viabilidade de células de pacientes após interação com conídio de *T. rubrum*.

Após leitura por citometria de fluxo, os dados foram analisados pelo software Flowjo e a estratégia de *gating*, para análise da viabilidade celular está descrita nos itens **A, C e E** (somente células), **B** (célula com conídio de *T. rubrum* com 4 horas de interação), **D** (células com conídios de *T. rubrum* com 8 horas de interação) e **F** (Células com conídio de *T. rubrum* com 16 horas de interação). Em todas as amostras foi utilizado iodeto de propídeo (PI) (FL3-H). As células que estão dentro do *gating* são células viáveis e as células fora do *gating* são células não viáveis.

4.4. Análise de viabilidade de conídios de *T.rubrum* após fagocitose por CDDM

Com finalidade de verificar por quanto tempo os conídios de *T. rubrum* permanecem viáveis no interior das CDDM, células de indivíduos controle e de pacientes com dermatofitose foram incubadas com conídios. As culturas foram incubadas por períodos de 24 e 48 horas, quando então as células foram lavadas para retirar os conídios não fagocitados. Em seguida as CDDM foram lisadas para liberar os conídios do seu interior e 300µL da suspensão final foram semeadas em Sabouraud-dextrose ágar, mantido a 25°C por 7 dias, quando as unidades formadoras de colônias do fungo cresceram e puderam ser contadas.

Verificamos que após interação de 24 horas com conídio de *T.rubrum*, as CDDM de controles possuíam mais conídios viáveis quando comparadas com CDDM de indivíduos com dermatofitose ativa. Porém, as CDDM de pacientes não foram capazes de conter os conídios fagocitados e depois de 48 horas de interação há um aumento de conídios viáveis (Figura 4).

Figura 4 – Unidades formadoras de colônias de *T. rubrum* após interação com CDDM. CDDM de indivíduos controle e de pacientes com dermatofitose foram cultivadas com conídios de *T. rubrum* por 24 e 48 horas para análise da viabilidade dos conídios após fagocitose.

4.5. Óxido Nítrico

Avaliamos a liberação de óxido nítrico por CDDM de indivíduos controle e de pacientes cultivadas com conídios de *T. rubrum*. A análise do resultado não mostrou diferença na liberação de NO pela CDDM na presença de conídio de *T. rubrum* (Figura 5).

Figura 5- Produção de NO. Após interação de CDDM de indivíduos controle e de pacientes com conídios de *T. rubrum* por 24 e 48 horas foi analisado a produção de óxido nítrico pelas células.

4.6. Imunofenotipagem de células dendríticas derivadas de monócitos.

As células dendríticas derivadas de monócitos do sangue periférico de pacientes e de indivíduos controle foram colocadas por 6 horas em contato com conídios de *T. rubrum*, na proporção de 1:1. Após este período foram avaliadas quanto à expressão de moléculas de superfície por citometria de fluxo. Pesquisou-se a expressão das moléculas CD80, CD83, CD86, CD40 e HLA- DR.

As células dendríticas geradas apresentaram um aumento na expressão das moléculas analisadas tanto de indivíduos controle como de pacientes. Porém, não houve diferença significativa na expressão destas moléculas nas CDDM quando adicionado conídio de *T. rubrum* em relação às CDDM sem conídios. Entretanto, em indivíduos com dermatofitose, observamos diminuição do número de células que expressam CD80, CD83, CD86, CD40 e HLA-DR após interação com conídio de *T. rubrum* (Figura 6).

Figura 6 – Expressão de moléculas de superfície em CDDM maduras com e sem conídios. Atráves de citometria de fluxo analisamos a expressão de CD80, CD83, CD86, CD40 e HLA-DR em CDDM de pacientes e de indivíduos controle. As células foram cultivadas por 6 horas na presença e na ausência de conídios de *T. rubrum*. Linha vermelha- controle (FMO- autofluorescência emitida pela célula). Linha azul – apenas CDDM. Linha verde - CDDM com conídios de *T. rubrum*.

4.7. Quantificação de citocinas produzidas por CDDM após fagocitose

Os níveis de citocinas TNF- α , IL-12 e IL-10 (Figura 7) foram mensurados dos sobrenadantes da cultura de CDDM de pacientes e de indivíduos controle após 24 e 48 horas de interação com conídios de *T. rubrum*. O sobrenadante dessas culturas foi coletado e níveis de citocinas foram determinados por ELISA captura.

Os resultados mostraram que CDDM de indivíduos controles secretaram TNF- α e IL-10, porém não foi observado alteração na produção dessas citocinas quando essas células foram incubadas com conídeos. Entretanto, quando as CDDM de pacientes foram analisadas, foi observado um aumento significativo da produção de IL-12 e TNF- α a presença de conídeos de *T. rubrum*.

Figura 7- Secreção de TNF- α , IL-12 e IL-10 por CDDM após fagocitose. CDDM foram incubadas com conídio de *T. rubrum* por 24 e 48 horas na proporção de 1:1. TNF- α (A), IL-12 (B) e IL10 (C) foram mensurados por ELISA captura no sobrenadante da cultura. * ($p \leq 0,05$)

4.8. Processamento e apresentação de antígenos às células T

A apresentação dos antígenos da tricofitina pelas CDDM ativadas de indivíduos controle e de pacientes com dermatofitose foram avaliadas pelo ensaio de linfoproliferação de linfócitos T CD4⁺. Como observado na Figura 8, as CDDM de indivíduos controle pulsadas com tricofitina em concentrações crescentes não induziram proliferação de linfócitos T CD4⁺. Entretanto, em pacientes, as CDDM induziram a proliferação de linfócitos T CD4⁺. As concentrações de 5µg/mL e 10µg/mL de tricofitina induziram um maior estímulo de proliferação de linfócitos T CD4⁺ (**Figura 8**).

Figura 8- Ativação de linfócitos T CD4⁺ por células dendríticas derivadas de monócitos de sangue periférico provenientes de indivíduos controle e pacientes com dermatofitose ativa. Linfócitos T CD4⁺ de indivíduos controle e de pacientes foram purificados de sangue periférico e cultivados com células dendríticas previamente ativadas com LPS e estimulados com concentrações crescentes de tricofitina. A apresentação do antígeno foi avaliada pela indução da proliferação dos linfócitos. A proliferação celular foi analisada pela incorporação de timidina triçada, que foi mensurada em contador de radiações beta. No gráfico, observa-se que houve aumento significativo na proliferação de linfócitos T CD4⁺ de pacientes quando as células dendríticas foram desafiadas com 5µg/mL e 10µg/mL de tricofitina. * ($p \leq 0,05$)

4.9. Quantificação de citocinas produzidas após linfoproliferação

Os níveis de citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10 (**Figura 9**) e IL-17 foram mensurados dos sobrenadantes da cultura LT CD4⁺ de pacientes e de indivíduos controle na presença de CDDM pulsadas com tricofitina na concentração de 5 μ g/mL e 10 μ g/mL com. O sobrenadante dessas culturas foi coletado e níveis de citocinas foram determinados por ELISA captura.

A análise das amostras demonstrou que houve uma ativação tipicamente Th2 em células de indivíduos controles, onde foi observado apenas presença de IL-4. Por outro lado, quando células de pacientes foram analisadas, observamos que houve produção de citocinas mesmo na ausência da adição de tricofitina. Foi observado também, uma produção de IL-4 e IL-10.

Figura 9 - Quantificação de IFN- γ (A), IL-12(B) e IL-10(C) após ensaio de linfoproliferação. Linfócitos TCD4 foram purificados e cultivados por 96 horas com CDDM previamente ativadas com tricofitina. O sobrenadante desta cultura foram mensuradas por ELISA captura para estas citocinas. ★ ($p \leq 0,05$) quando compara com LT CD4 + CDDM ; * ($p \leq 0,05$) quando comparado com LT CD4.

5. DISCUSSÃO

Os dermatófitos são um grupo de fungos que têm a capacidade de invadir o tecido queratinizado (pele, pêlos e unhas) de seres humanos e animais para produzir uma infecção denominada de dermatofitose (RUBIO et al, 1999). O *T. rubrum* é o principal patógeno causador de dermatofitose. As lesões causadas por estas espécies são crônicas e de caráter pouco inflamatória. A doença apresenta evolução lenta e pacientes cronicamente infectados não respondem bem à terapia antifúngica (GRAPPEL et al, 1974; BLAKE,1991).

A resposta imune aos dermatófitos ainda não está bem elucidada. Atualmente é aceito que a resposta imune mediada por células é responsável pelo controle da infecção (revisado por ALMEIDA, 2008).

Assim como na maioria dos patógenos, o sistema imune inato é determinante na resposta antifúngica. Neutrófilos, macrófagos e células dendríticas constituem as células efectoras do sistema imune (CUTLER, 2007). Após entrada do micro-organismo no hospedeiro, o antígeno deve ser capturado, processado e apresentado por diferentes células apresentadoras de antígenos(células dendríticas, linfócitos B e macrófagos).

Células dendríticas são as mais potentes células apresentadoras de antígeno do sistema imune. Além de desempenharem um papel fundamental na regulação da imunidade, elas servem como sentinelas que capturam antígenos na periferia, para processá-los e apresentá-los aos linfócitos nos linfonodos (ADEMA, 2009).

Estudos recentes revelam a extraordinária plasticidade funcional das células dendríticas em resposta a fungos, contribuindo na indução da ativação das células T, a qual pode resultar em formas seletivas de imunidade específica (Th1 ou Th2) (PULENDRAN et al., 1999; MOSER & MURPHY, 2000; ROMANI 2004).

Tendo em vista os poucos estudos focados na resposta imune inata aos dermatófitos e a importância de células dendríticas na indução da resposta imune, avaliamos neste estudo a interação de células dendríticas de pacientes com dermatofitose com conídios de *T. rubrum*.

A fagocitose é um passo importante na defesa a micro-organismos devido à degradação e subsequente apresentação de antígenos peptídicos, derivados destes patógenos microbianos (CARON & HALL, 1998). Esse processo ocorre em distintas formas e envolve diferentes receptores de reconhecimento. Uma característica única de DCs é sua capacidade de internalizar diferentes estruturas fúngicas, como por exemplo, internalizar leveduras de *Candida* ou conídios e hifas de *Aspergillus*..

Através de ensaios de fagocitose (**Figura 2**) observamos que as células dendríticas de pacientes com dermatofitose e de indivíduos controle foram capazes de fagocitar os conídios de *T. rubrum* após 4 horas de interação. Após os períodos de 8 e 12 horas as células que fagocitaram os conídios continuaram íntegras e os conídios não se desenvolveram em hifas como observado com macrófagos em trabalhos anteriores (CAMPOS et al., 2006; BOMFIM et al., 2008).

Após a interação de conídios de *T. rubrum* com CDDM por 24 horas (**Figura 4**), observamos que alguns conídios permaneceram viáveis tanto em indivíduos controle como em pacientes. Porém, após 48 horas de interação de CDDM de pacientes com o fungo há um aumento no número de unidades formadoras de colônia. Os resultados apontam que a CDDM tem capacidade de fagocitar os conídios, mas não são capazes de matá-los, sugerindo que as CDDM têm ação fungistática e não fungicida sobre o fungo. Apesar de os conídios permanecerem viáveis após a fagocitose, eles não se desenvolveram dentro destas células como ocorreu em macrófagos.

CAMPOS et al (2006), em um estudo realizado em nosso laboratório, avaliaram a interação de macrófagos peritoniais de camundongos com conídios e exoantígenos do *T. rubrum*. Verificou-se que as células foram capazes de fagocitar o fungo, no entanto após 12 horas de fagocitose houve expressiva diminuição da quantidade de macrófagos viáveis, devido ao crescimento de hifas a partir dos fungos internalizados. Houve diminuição na expressão de moléculas de superfície de macrófagos, tais como MHC II, CD54 e CD80. Os conídios foram fagocitados pela via da manose, e os macrófagos secretaram grande quantidade de IL-10 e TNF- α , e não secretaram IL-12 e NO.

Em outro trabalho realizado em nosso laboratório BOMFIM et al (2008) demonstraram resultados semelhantes ao trabalho realizado por CAMPOS et al, onde

macrófagos derivados de sangue periférico de pacientes com dermatofitose causada por *Trichophyton rubrum* e de indivíduos controle foram capazes de fagocitar conídios de *T. rubrum*. Também se observou uma grande diminuição das células CD14+ viáveis após 8 horas de interação com conídio. Estes resultados indicam que estas células fúngicas são capazes de inibir as funções dos macrófagos e, ainda, capazes de induzir citocinas supressoras que poderiam favorecer evasão fúngica no desenvolvimento da resposta imune.

Durante a fagocitose há um aumento no consumo de glicose e oxigênio, o que é referido como queima respiratória. A consequência da queima respiratória é a produção de uma quantidade de compostos de oxigênio, como o óxido nítrico. O óxido nítrico gerado difunde-se em todas as direções e a proximidade do macrófago com uma célula tumoral, bactéria, fungo ou algum helminto, assegura que boa parte do NO penetre nas células desses micro-organismos. Uma vez no interior, o óxido nítrico pode danificá-las, atacando os centros de ferro e enxofre de várias proteínas chaves, prejudicando tanto o ciclo respiratório quanto a síntese de DNA. Praticamente todas as células humanas estudadas até agora têm a capacidade de produzir NO (Queiroz & Batista, 1999). Em nosso trabalho, a análise de produção de óxido nítrico (**Figura 5**) demonstrou que não houve diferença na liberação de NO pela CDDM de paciente e de indivíduos controle na presença de conídio de *T. rubrum*, Mostrando que a viabilidade do conídio após ser fagocitado por CDDM não está ligada a este mecanismo e sim a outros fatores que precisam ainda ser estudados.

Após fagocitarem os patógenos e seus antígenos, mediados por receptores de superfície ("Toll Like", citocinas e porção Fc), as células dendríticas são estimuladas a migrar para os linfonodos regionais, via vasos linfáticos, aonde chegam como células completamente maduras, capazes de estimular células T (MEDZHITOV & JANEWAY, 2000; JANEWAY, 2007). Durante a maturação, as CDs perdem sua capacidade de capturar e processar o antígeno e aumentam sua expressão de moléculas MHC classe II, co-estimulatórias (CD40, CD80, CD86) e de adesão (CD54). Interações células-células que requerem moléculas co-estimulatórias são essenciais para que a resposta imune seja efetiva, impedindo que as células envolvidas sejam deletadas ou tornem-se anérgicas (GREWAL & Flavel, 1996). Dessa forma a ativação/ maturação de células

apresentadoras de antígenos leva, na maioria das vezes, a uma eficiente resposta imune do hospedeiro, com a ativação das células T. No entanto, alguns patógenos têm a capacidade de afetar as funções biológicas destas células através da inibição de suas moléculas de superfície, bem como a inibição da síntese de citocinas responsáveis pela ativação de linfócitos do tipo Th1 (FERREIRA, 2003).

Tendo isto em vista, fomos analisar a expressão de marcadores de superfície celular tais como CD80, CD83, CD86, CD40 e HLA-DR (**Figura 6**). A interação de CDDM com conídios de *T. rubrum* demonstrou que houve um aumento na expressão de moléculas co-estimulatórias e de HLA-DR em pacientes com dermatofitose e em indivíduos controle. Não houve diferença na expressão dessas moléculas na presença do fungo quando comparadas com culturas somente de CDDM. Entretanto, houve uma diminuição do número de células que expressam estas moléculas na presença de conídio de *T. rubrum* de pacientes. Essas moléculas são importantes, tanto no co-estímulo de ativação como na apresentação de antígeno. A expressão destes marcadores na superfície de CDDM maduras de pacientes após infecção com o fungo sublima com a sua capacidade adquirida de apresentar o antígeno aos linfócitos T, mesmo havendo uma diminuição no número de células que expressaram estes marcadores.

Outro parâmetro importante na geração de uma resposta imune eficiente é a produção de citocinas. Para investigar os efeitos das primeiras interações entre CDDM com o fungo sobre o perfil de citocinas secretadas, analisamos a secreção de IL-12, IL-10 e TNF- α por CDDM após contato de 24 e 48 horas com conídios de *T. rubrum* (**Figura 7**). Verificamos que houve aumento significativo na secreção da citocinas pró-inflamatórias IL-12 e TNF- α por CDDM de pacientes após 48 horas de interação com o fungo.

A produção de citocinas pró-inflamatórias tem papel essencial na resistência contra infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. A produção de TNF- α é um importante evento que leva a formação de granuloma e uma resposta imune protetora. Assim como a secreção da citocina pró-inflamatória IL-12, que aumenta a resposta imune inata e gera uma resposta específica Th1 que é importante para o desenvolvimento de uma resposta imune protetora para micobactérias (GIACOMINI et al, 2001).

Estudos com *Candida albicans* e *Pneumocystis carinii* têm revelado uma importante função do TNF- α nestas doenças. Em candidíase murina, TNF tem papel crucial no controle das leveduras (SCHLÜTER & DECKERT, 2000). Foi verificado também que a produção de TNF- α e IL-12, após fagocitose de *Aspergillus fumigatus* por CDDM, pode contribuir para uma resposta anti-aspergillus (GAFA et al, 2005).

Para que ocorra uma resposta mediada por linfócitos T, é necessário que estes interajam com as APCs (células dendríticas, linfócitos B e macrófagos), proliferem e se diferenciem em células efetoras, pois os linfócitos T não são capazes de iniciar uma resposta imune (Th1/Th2) sem estímulo (STEINAMAN, 1991; BANCHEREAU et al, 2000 e LANZAVECCHIA & SALLUSTRO, 2001).

Como as células dendríticas são excelentes APCs, fomos estudar a capacidade de CDDM, ativadas e pulsadas com concentrações crescentes de tricofitina, em induzir a proliferação de linfócito T CD4⁺. A estimulação de linfócitos, por antígenos em cultura, leva a uma resposta *in vitro* que demonstra muita das características das respostas imunes induzidas sob condições fisiológicas *in vivo* (ABBAS, 2005). Nossos resultados apontam que quanto maior a concentração de tricofitina maior a proliferação de linfócitos T (Figura 8), em pacientes com dermatofitose, sendo que na concentração de 5 μ g/mL e 10 μ g/mL de tricofitina houve indução significativa na proliferação de linfócito T CD4⁺. Esse mesmo resultado não foi observado em indivíduos controle. Esta proliferação de LT CD4⁺ corroborou com a secreção de IL-12 por CDDM de pacientes, uma vez que IL-12 favorece expansão clonal das células T CD4⁺ (ABBAS, 2005).

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

Sabendo-se que a resposta imunológica é uma sequência de uma série de interações envolvendo o microambiente da infecção, é importante saber o perfil de citocinas produzidas. Desta forma, analisou-se a secreção de IL-4, IFN- γ , IL-10 e IL-17 por LT CD4⁺ em contato com CDDM ativadas e pulsadas com concentrações de

5µg/mL e 10µg/mL de tricotina(**Figura 9**). Foi detectado um aumento significativo na secreção de IL-4 pelos LT CD4⁺ de indivíduos controle. Já células de pacientes demonstraram tanto secreção IL-4 como também de IL-10. Observamos que LT CD4⁺ de pacientes produziram citocinas quando em contato com CDDM sem estímulo de antígeno, acreditamos que isto se deve a um contato prévio dos monócitos de pacientes com o fungo e assim quando estas células foram diferenciadas em CDs já estavam estimuladas pelo contato anterior ao fungo. Não houve produção de IL-17 pelas células de indivíduos controle e nem de pacientes.

Para muitos fungos patogênicos, a efetiva resposta do tecido à invasão é a presença de uma inflamação granulomatosa (uma imagem que marca a imunidade mediada por células). Subjacente a imunidade adquirida para *C. albicans*, a presença de uma resposta positiva de hipersensibilidade tipo tardia (DTH) é demonstrável em indivíduos adultos imunocompetentes, e se presume evitar progressão da colonização da mucosa. A hipersensibilidade tipo tardia (DTH) é a maior característica da resposta imune mediada por células em dermatofitose. Na reação DTH clássica, a ativação de macrófagos é mediada por IFN-γ produzindo linfócitos T CD4⁺ (Th1). A reação DTH positiva para tricotina é associada com altos títulos de IgG e ausência de IgE ou IgG4 (WOODFOLK ET AL, 1996). Linfócitos de indivíduos saudáveis mostraram respostas proliferativas após estimulação com antígenos fúngicos e produziram diferentes citocinas. Existe acentuada plasticidade de células T na resposta a fungos. A heterogeneidade do repertório de células T CD4⁺ e CD8⁺ pode favorecer a multiplicidade e redundância de mecanismos efetores através dos quais células T participam no controle de infecções fúngicas. Portanto, anfitrião da resistência aos fungos parece depender da indução de imunidade celular, mediada por células T, pelas citocinas efectoras e fagócitos. As circunstâncias clínicas em que ocorrem infecções fúngicas estão associadas com uma deficiência da imunidade mediada por células. A Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e neoplasias hematológicas graves são exemplos de defeitos adquiridos em função de células T, que predispõem a graves infecções fúngicas.

A geração de uma posição dominante de resposta mediada por células Th1 por IL-12 é necessária para a expressão de imunidade aos fungos. Os dados experimentais

têm demonstrado os efeitos deletérios da diminuição da secreção de IL-12 ou ablação IFN- γ sobre o curso e o estabelecimento de infecções fúngicas. Através da produção de IFN- γ e auxílio na opsonização de anticorpos, a ativação das células Th1 é fundamental para otimizar a ativação de fagócitos em locais de infecção. Entretanto, a falta de emissão de sinais para ativar fagócitos efetores pode predispor os pacientes a infecções esmagadoras, limitando a eficácia terapêutica de antifúngicos e anticorpos, e favorecendo a persistência e / ou comensalismo.

Estudos imunológicos em pacientes com formas polarizadas da paracoccidiodomicose mostram uma associação tendenciosa entre reatividade Th1 e formas assintomáticas ou leves da infecção, em contraste com a correlação entre resposta Th2 e a forma grave da doença. Portanto, os pacientes com infecção disseminada têm defeituosa produção de IFN- γ e anergia DTH associada com aumento dos níveis de citocinas tipo 2 (IL-4 e IL-5), IgE, IgG4 e IgA, e eosinofilia, que é um marcador de mau prognóstico em micoses endêmicas. IL-4 é um importante determinante da suscetibilidade e resistência, na maioria das infecções por fungos. Ablação de IL-4 aumenta a imunidade a fungos em modelos experimentais de infecção. IL-4 pode desativar ou ativar fagócitos e CDs especializadas para certas funções, por exemplo, pode inibir efetores antifúngicos ativados por fagócitos e ainda pode promover a produção de IL-12 por CDs. Então, o mais importante mecanismo subjacente à atividade inibitória de IL-4 em infecções é a sua capacidade de agir como o mais potente sinal de compromisso com a reatividade célula-Th2 que amortece o efeito protetor das células Th1. Em indivíduos atópicos, a reprimida resposta DTH a fungos está associada com o aumento dos níveis de IgE, IgA e IgG (revisado por ROMANI, 2004).

No entanto, a suscetibilidade a infecções fúngicas nem sempre pode estar associada com acentuada produção de IL-4. Por exemplo, embora a associação entre candidíase disseminada crônica e variantes genéticas de IL-4 tenha sido descrita recentemente, os níveis de IL-4 ou IL-5 nem sempre estão aumentados em pacientes com candidíase mucocutânea (CMC). Várias observações clínicas indicam uma inversa relação entre IFN- γ e IL-10 em infecções fúngicas. Pacientes com altos níveis de IL-10, que afeta negativamente a produção de IFN- γ , são observados em doenças crônicas

envolvendo *Candida*, na forma grave das micoses endêmicas e em pacientes neutropênicos com aspergilose. No entanto, a tolerância para os fungos também pode ser alcançada através da indução de células Treg que podem aperfeiçoar a reatividade antifúngica. Portanto, células T supressoras recentemente recuperaram a sua reputação como chave de controle na imunidade antifúngica (ROMANI, 2004).

Várias experiências têm demonstrado que a resolução das dermatofitoses é mediada por DTH (CALDERON, 1989). Em contraste, testes cutâneos de IH são frequentemente associados à infecção crônica, o que sugere que uma resposta humoral apresenta menor proteção a *Trichophyton* do que uma resposta mediada por células (JONES, 1993).

A fração homólogo 29-kDa, Tri r 2 derivados de *T. rubrum*, tem capacidade de induzir testes cutâneos positivos para IH e DTH em diferentes indivíduos. A resposta estimulada pelo Tri r 2 foi caracterizada pela secreção de citocina da resposta tipo Th1 em indivíduos DTH-positivos. Paradoxalmente, um peptídeo da Tri r2, denominado de p5, induziu a produção de IL-5 e IL-10 (citocinas da resposta tipo Th2) em DTH-positivo, mas não em indivíduos IH positivos. Estas observações argumentam contra a separação de células Th1 e Th2 com respostas do tipo DTH e IH, respectivamente. Estes resultados sugerem que as respostas induzidas por *Trichophyton* não refletem DTH clássico, mas em uma resposta alternativa (revisado por Almeida, 2008).

Em conclusão, os nossos resultados sugerem que as células dendríticas são mais resistentes no controle do crescimento de *T. rubrum* quando comparadas com macrófagos ou monócitos. Observamos também, que células dendríticas de indivíduos controles não produzem IL-12 e estimulam preferencialmente linfócitos T CD4 secretores de IL-4. Por outro lado, células dendríticas de pacientes produzem IL-12 e induzem a ativação de linfócitos T produtores de IL-4 e IL-10. Embora níveis de IFN γ fossem detectados na proliferação de linfócitos de pacientes, essa produção não foi significativa. Talvez um maior número de pacientes pudesse esclarecer se há uma tendência de mudança de padrão de resposta. Entretanto, esses dados demonstram a capacidade de células dendríticas em ativar linfócitos T, sendo que essa expansão de células T poderia ser determinante no controle ou exacerbação das dermatofitoses por *T. rubrum*.

6. CONCLUSÕES

- Células dendríticas derivadas de monócitos (CDDM) fagocitaram conídios de *Trichophyton rubrum*. Após fagocitose as CDDM permaneceram viáveis. Entretanto as CDDM de pacientes não conseguiram conter a multiplicação dos conídios em seu interior.
- CDDM expressaram em sua superfície molécula co-estimulatórias (CD80, CD83, CD86, CD40) e HLA-DR. Não houve diferença na expressão destas moléculas na presença de conídios de *T. rubrum*. Porém houve uma diminuição do número de células de pacientes que expressam estas moléculas na presença de conídio de *T. rubrum*.
- Houve um aumento significativo na secreção de TNF- α e de IL-12 pelas CDDM de pacientes quando em contato com conídio de *T. rubrum*.
- CDDM de pacientes ativada e pulsada com tricofitina foram capazes de apresentar este antígeno aos LT CD4 e induzir proliferação destas células.
- Após proliferação dos LT CD4 foram secretados IL-4 por células de indivíduos controle e IL-10 e IL-4 por células de pacientes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A.H., POBER, J.S. *Imunologia Celular e Molecular*. 5ª ed. Rio de Janeiro: **Ed Revinter**, 2005.

ADEMA, G.J. Dendritic cells from bench to bedside and back. **Immunology Letters**. 122(2):128-30, 2009.

AHUJA, S.S., REDDICK, R.L., SATO, N., MONTALBO, E. KOSTECKI, V., ZHAO, W., DOLAN, M.J., MELBY, P.C. & AHUJA, S.K. Dendritic cell (DC)-based anti-infective strategies: DCs engineered to secrete IL-12 are a potent vaccine in a murine model of an intracellular infection. **J. Immunology**. 163: 3890-3897, 1999.

ALMEIDA S.R. Immunology of dermatophytosis. **Mycophatology**. 166(5-6): 277-83, 2008.

ALMEIDA S.R. *Micologia*. 1º edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

ALTAMURA M., CASALE D., PEPE M., TAFARO A. Immune responses to fungal infections and therapeutic implications. **Curr Drug Targets Immune, Endocr & Metabol Disord**. 1(3):189-97, 2001.

ANSORGE, W. Fast visualization of protein bands by impregnation in potassium permanganate and silver nitrate. **Electrophoresis**. 82:235-42, 1983.

BANCHEREAU J., STEINMAN R.M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature** 392 (6673): 245-52, 1998.

BANCHEREAU J., BRIERE F., CAUX C., DAVOUST J., LEBECQUE S., LIU Y.J., PULENDRAN B., PALUCKA K. Immunobiology of dendritic cells. **Ann. Ver. Immunol**. 18: 767-811, 2000.

BLAKE, J.S., DAHL, M.V., HERRON, M.J. & NELSON, R.D. Na immunoinibitory cell wall glycoprotein (mannan) from *Trichophyton rubrum*. **Invest. Dermatol.**, 96, 657-661, 1991.

BLANK, H. Griseofulvin and dermatomycoses. An International Symposion sponsored by the University of Miami. **Arch. Derm.** 81: 649- 882, 1960.

BOMFIM, G.F. . Interação do *Trichophyton rubrum* com macrófagos de pacientes com dermatofitose. Dissertação de Mestrado. São Paulo: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2008.

BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. **Scand J Clin Lab Invest Suppl.** 21:77-89, 1968.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72:248-254, 1976.

CALICH, V., VAZ, C. Imunologia. 1ª ed. Rio de Janeiro: **Ed. Revinter**, 2001.

CALDERON R.A., HAY R.J. Fungicidal activity of human neutrophils and monocytes on dermatophyte fungi, *Trichophyton quinckeanum* and *Trichophyton rubrum*. **Immunology.**, 61(3):289-95, 1987.

CALDERON, R.A. Immunoregulation of dermatophytosis. **Crit. Rev. Microbiol.** 16: 339-368, 1989.

CAMPOS, M.R.M., RUSSO M., GOMES E. AND ALMEIDA S.R. Stimulation, inhibition and death of macrophages infected with *Trichophyton rubrum*. **Microbes and infection**, 8:372-379, 2005.

CESTARI, T.F., ABDALLA, C., ASSIS, T.L. Fisiopatologia da dermatofitoses. **An. Bras Dermatol.** 65(6): 310-316, 1990.

CLEMONS, K.V., CALICH, V.L., BURGER, E., FILLER, S.G., GRAZZIUTTI, M., MURPHY, J., ROILIDES, E., CAMPA, A., DIAS, M.R., EDWARDS, J.E.J.R., FU, Y., FERNANDES-BORDIGNON, G., IBRAHIM, A., KATSIFA, H., LAMAINIERE, C.G., MELONI-BRUNERI, L.H., REX J., SAVARY, C.A., XIDIEH, C. Pathogenesis I: interactions of host cells and fungi. **Med Mycol.** Suppl 1:99-111, 2000.

CRUICKSHANK, C.N.D., TROTTER, M.D., WOOD, S.R. Studies on trichophytin sensitivity. **J Invest Dermatol**, 35: 219-23, 1960.

DAHL M.V. Dermatophytosis and the immune response. **J Am Acad Dermatol.** S34-41, 1960.

DAHL, M. V., GRANDO, S.A. Chronic Dermatophytosis: What is special about *Trichophyton rubrum*?. **Adv. Dermatol.**, 9: 97-109, 1994.

ESPOSITO-FARESE M.E., SAUTES, C., DE LA SALLE, H., LATOUR S., BIEBER, T., DE LA SALLE, C., OHLMANN, P., FRIDMAN, W.T., CAZENAVE, J.P., TEILLAUD, J.L. Membrane and soluble Fc gamma RII/RIII modulate the antigen-presenting capacity of murine dendritic epidermal Langerhans cells for IgG-complexed antigens. **J. Immunol.** 155:1725-36, 1995.

ESTEVEZ, S.A., CABRITA, J.D.; NOBRE, G.N. Micologia Médica. Lisboa. **Fundação Calouste Gulbenkian**, 256-358, 1977.

ESQUENAZI D., ALVIANO C.S., DE SOUZA W., ROZENTAL S. The influence of surface carbohydrates during in vitro infection of mammalian cells by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Res Microbiol.** 55(3):144-53, 2004.

FANGER, N.A., WARDWELL, K., SHEN, L., TEDDER, T.F., GUYRE, P.M. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. **J. Immunol.** 157:541-48, 1996.

Fê d'Ostiani, C. Del Sero, G.; Bacci, A; Montagnoli, C.; Spreca, A.; Mencacci, A.; Riciardi- Castagnoli, P.; Romani, L. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*: implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. **J. Exp. Med.** 191: 1661. 2000.

FERREIRA, W., ÁVILA, S. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas autoimunes. 2ª ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2000.

FLOHÉ, S.B., BAUER, C., FLOHÉ, S., AND MOLL, H. Antigen-pulsed epidermal Langerhans cells protect susceptible mice from infection with the intracellular parasite *Leishmania major*. **Eur. J. Immunol.** 28:3800-3811, 1998.

GAFA, V.; LANDE, R.; GAGLIARDI, M.C.; SEVERA, M.; GIACOMINI, E.; REMOLI, M.E.; NISINI, R.; RAMONI, C.; DI FRANCESCO, P.; ALDEBERT, D.; GRILLOT, R.; COCCIA, E.M. Human dendritic cells following *Aspergillus fumigatus* infection express the CCR7 receptor and differential pattern of interleukin-12(IL-12), IL-23 and IL-27 cytokines, which lead to a Th1 response. **Infections and Immunity.** 72: 1480-1489, 2006

GIACOMINI, E.; IONA, E.; FERRONI, L.; MIETTINEM, M.; FATTORINI, L.; OREFICI, G.; JULKUNEN, I.; COCCIA, E.M. Infection of human and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. **The Journal of immunology.** 166: 7033- 7041, 2001.

GRANDO., S.A, HOSTAGER, B.S., HERRON, M.J., DAHL, M.V. & NELSON, R.D. Binding of *Trichophyton rubrum* mannan to human monocytes *in vitro*. **J Invest. Dermatol.**, 98, 876-880, 1992.

GRAPPEL, S.F., BISHOP, C.T., BLANK, F. Immunology of dermatophytes and dermatophytosis. **Bacteriol Rev.** 38, 222-50, 1974.

GREWAL, I.S.; FLAVEL, R.A. The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. **Immun. I Rev.** 153: 85-106, 1996.

GUERMONPREZ, P., VALLADEAU, J., ZITCOGEL, L., THÉRY, C., AND AMIGORENA, S. Antigen Presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Anu. Rev. Immunol.** 20:621-67, 2002.

GUPTA A.K., KONNIKOV N., MACDONALD P. et al. Prevalence and epidemiology of toenail onychomycosis in diabetic subjects: a multicentre survey. **J dermatol** Oct; 139(4): 665-671, 1998.

HANIFIN J.M., RAY L. Immunologic studies in human trichophyton infections. **Clin Res**, 21:477, 1977.

HOSKING C.S., PEREIRA H.A. The role of complement and antibody in opsonization and intracellular killing of *Candida albicans*. **Clin Exp Immunol.** 57(2):307-14, 1984.

JANEWAY C.A and MEDZHITOV R. Innate immune recognition. **Annu rev immunol**, 20:197-216, 2002.

JANEWAY C.A, TRAVERS P., WALPORT M. AND SHLOMCHIK M.J. *Imunologia: o sistema imune na saúde e na doença*. 6º edição. Porto Alegre: **Artmed**, 2007.

KAAMAN, T. Cell-mediated reactivity in dermatophytosis: difference in skin responses to purified trichophytin in tinea pedis and tinea cruris. **Acta Derm. Venereol.**, 61, 119-123, 1981.

JONES, H.E. Imune response and host resistance of human to dermatophyte infection. **J. Am. Acad. Dermatol.** 82: 287- 290, 1993

KOONEMAN E.W., ALLEN S.D., JANDA W.M., SCHRECKENBERGER P.C. AND WINN W.C. Diagnóstico Microbiológico. 5º edição. Rio de Janeiro: **Medsa**, 2001.

LACAZ, C. S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C., HEINS-VACCARI, E. M., MELO, N. T. Tratado de Micologia Médica. 9ª ed. São Paulo: **Sarvier**, 2002.

LEPPER, A.W.D. Experimental bovine *Trichophyton verrucosum* infection. The cellular responses in primary lesions of the skin resulting from surface or intradermal inoculation. **Res. Vet. Sci.**, 16, 287-298, 1974.

LAMHAMED-CHERRADI, S.E.; MARTIN, R.E.; ITO, T.; KHERADMAND, F.; CORRY, D.B.; LIU, Y.J.; MOYLE, M. Fungal proteases induce Th2 polararization through limited dendritic cell maturation and reduced production of IL-12. **The Journal of Immunology**. 180: 6000-6009, 2008.

LOPÉZ-MARTÍNEZ R., et. al. Exoenzimas de Dermatofitos isolados de Tineas Agudas e Crônicas. **Ver. Lat-Amer. Microbiol.**, 36:17-20, 1994.

LOTZE, M.T. Getting to the source: dendritic cells as therapeutic reagents for the treatment of patients with cancer. **Ann. Surg.**, 226: 6-9, 1997.

MANSOUR M.K., LEVITZ S.M. Interactions of fungi with phagocytes. **Curr Opin Microbiol.** 5(4):359-65, 2002.

MARTINS, J.E.C., CHINELLI, P.A.V., SOFIATTI, A.A, NUNES., R.S. Dermatophyte agents in the city of São Paulo, from 1992 to 2002. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**. 45(5):259-263, 2003.

MATSUMOTO, T., AJELLO, L. Current taxonomic concepts pertaining to the dermatophytes and related fungi. **Int. J. Dermatol.**, 491-499, 1987.

MOLL, H., BERBERICH, C. Dendritic cell-based vaccination strategies: induction of protective immunity against leishmaniasis. **Immunobiology**. 204 (5): 659-66, 2001.

MOSER, M., MURPHY, K.M. Dendritic cell regulation of Th1-Th2 development. **Nat. Immunol.** 1: 199, 2000.

PARHAM, P. O Sistema Imune. 1ª ed. Porto Alegre: **Ed Artmed**, 2001.

NETEA, M.G.; BROW, G.D.; KULBERG, B.J.; GOW, N.A.R. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by innate immune system. **Nat. Rev. Microbiol.** 6: 67-78, 2008.

NEVES, A.R.; Estudo da diferenciação in vitro de células dendríticas derivadas de monócitos sanguíneos: análise dos efeitos de diferentes condições de cultura no fenótipo imunoestimulador das células. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2003.

O'GARRA, A.; VIEIRA, P. Th1 cells control themselves by producing interleukin-10. **Nat. Rev. Immunol.** 7:425-428, 2007.

PULENDRAN, B., SMITH, J.L., CASPARY G., BRASEL, K., PETTIT, D., MARASKOVSKY, E., MALISZEWSKI, C.R. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response *in vivo*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 96:1036, 1999.

QUEIROZ, S. L.; BATISTA, A. A. Funções biológicas do óxido nítrico. **Química Nova**, v.22, n. 4, p.584-590, 1999.

RICHARDSON M.D., SHANKLAND G.S., GRAY C.A. Opsonizing activity of C-reactive protein in phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by human neutrophils. **Mycoses**. 34(3-4):141-3, 1991.

RICHARDSON M.D., BELL, Y. Non-opsonic phagocytosis of *Trichophyton mentagrophytes* arthroconidia by human neutrophils in vitro. **J Med Microbiol**, 42(3):225-9, 1995.

RIPPON, J. W. Chromoblastomycosis and related dermal infections caused by dematiaceous fungi. In: **Medical mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes**. 2 ed. Philadelphia, Saunders. pp. 249-76, 1982.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nat Rev Immunol**. 4(1):1-23, 2004

SALLUSTO, F. & LANZAVECCHIA, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocytes/macrophages colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulation by tumor necrosis factor alpha. **J. Exp. Med.**, 179: 1109-1118, 1994.

SCHÜTER, D.; DECKERT, M. The divergent role necrosis factor receptors in infectious diseases. **Microbes and Infections**. 2: 1285-1292, 2000.

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

SIDRIM, J.J.C & MOREIRA J.L.B. Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica. Rio de Janeiro: **Ed. Guanabara Koogan**, 1999.

SILVA- TAVARES, H., ALCHARNE, M.M., FISCHMAN, O. Tinea cruris epidemiology (São Paulo, Brasil). **Mycopathology**. 149(3): 147-9, 2001.

SMITH K.J., WELSH M., SKELTON H. *Trichophyton rubrum* showing deep dermal invasion directly from the epidermis in immunosuppressed patients. **Br J Dermatol.** 145(2):344-8, 2001.

SMITH, J. M. Strategies for the development of a vaccine against ringworm. **J. Med & Veterin. Mycol.**, 33: 87-91, 1995.

STAUGHTON, R. Skin manifestations in AIDS patients. **Br. J. Clin. Pract. Symp. Suppl.**, 71: 109-113, 1990.

STEINMAN, R.M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. **Annu. Rev. Immunol.**, 9: 271-296, 1991.

STEINMAN, R.M. Dendritic cells and immune-based therapies. **Exp. Hematol.**, 24: 859-863, 1996.

TRABULSI L.R. & ALTERTHUM F. Microbiologia. 4ª edição. São Paulo: **Atheneu**, 2005.

UNDERHILL, D.M., OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annu Rev Immunol.** 20:825-52, 2002.

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

ZAITS, C. Imunologia das Dermatofitoses. **An. Bras. Dermatol.** Rio de Janeiro, 69(3): 217-222, 1994.

ZAUGG, C.; MONOD, M.; WEBER, J.; HARSHMAN, K.; PRADERVAND, S.; THOMAS, J.; BUENO, M.; GIDDEY, K.; STAIB, P. Gene expression profiling in the human

pathogenic dermatophyte *Trichophyton rubrum* during growth on proteins. **Eukaryotic Cell.** 8: 241-250, 2009.

WOODFOLK, J.A., SLUNT JB, DEUELL B., HAYDEN M., PLATTS-MILLS, T.A. Definition of a *Trichophyton* protein associated with delayed hypersensitivity in humans: evidence for immediate (igE and IgG4) and delayed hypersensitivity to single protein. **J Immunol.** 156: 1695-701, 1996.

WOODFOLK, J.A., PLATTS-MILLS, T.A. The immune response to dermatophytes. **Res Immunol.** 149(4-5): 436-45, 1998.

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs – Células Apresentadoras de Antígeno
BSA – Albumina de Soro Bovino
CDDM – Célula Dendrítica Derivada de Monócito
CDs – Células Dendríticas
DNA – Ácido desoxiribonucléico
DO – Densidade Óptica
DTH- Hipersensibilidade tipo tardia
EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA – “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”
Fc – Fragmento constante da molécula de imunoglobulina
FITC – Isotiocianato de Fluoresceína
GM-CSF – Fator de Crescimento Celular de Monócitos e Granulócitos
HLA – Antígeno Leucocitário Humano
Ig - Imunoglobulina
IFN- γ – Interferon-gama
IH- Hipersensibilidade imediata
IL – Interleucina
LPS - Lipopolissacarídeo
LT CD4 – Linfócito T CD4
MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade
NO – Óxido Nítrico
OPD – Orthophenylenediamine
PBS – Solução Salina de Fosfato Tamponada
PE – Ficoeritrina
PI – Iodeto de Propídio
RPMI – meio de cultura “Roswell Park Memorial Institute- 1640”
SFB – Soro Fetal Bovino
Th – Linfócito auxiliar
TLR - “Toll Like Receptor”

TNF- α - Fator α de Necrose Tumoral

TNF-R - receptores de TNF

TReg- Células T Regulatórias

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

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 20/02/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0915/07**, intitulado: **"INTERAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS COM CONÍDIOS DE TRICHOPHYTON RUBRUM."** apresentado pelo Departamento de **DERMATOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **José Eduardo Costa Martins**

Pesquisador (a) Executante: **Karla Letícia Santiago**

CAPPesq, 22 de Fevereiro de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403

010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br /

secretariacappesq2@hcnet.usp.br

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 114/2007

São Paulo, 3 de setembro de 2007.

Ilmo(a). Sr(a).
Karla Letícia Santiago
Orientador Prof. Sandro Rogério de Almeida
FBC

Prezado(a) Senhor(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 03 de setembro de 2007, **APROVOU** o projeto "Interação de células dendríticas com conídios de *Trichophyton rubrum*" (Protocolo CEP nº 448) apresentado por Vossa Senhoria.

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

Atenciosamente,

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FCF/USP