

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
E BIOLOGIA MOLECULAR



AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALÉRGICO DE ESPOROS DE
Trichoderma stromaticum EM CAMUNDONGOS E O SEU
EFEITO EM CÉLULAS DA IMUNIDADE INATA

Edilson Ribeiro Alves Filho

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2008

EDILSON RIBEIRO ALVES FILHO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALÉRGICO DE ESPOROS DE
Trichoderma stromaticum EM CAMUNDONGOS E O SEU
EFEITO EM CÉLULAS DA IMUNIDADE INATA

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Genética e
Biologia Molecular

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2008

EDILSON RIBEIRO ALVES FILHO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALÉRGICO DE ESPOROS DE
Trichoderma stromaticum EM CAMUNDONGOS E O SEU
EFEITO EM CÉLULAS DA IMUNIDADE INATA

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Genética e
Biologia Molecular

APROVADO: 19 de Fevereiro de 2008

Prof^a. Dr^a. Marilda Gonçalves
UFBA

Prof^a. Dr^a. Carla Cristina Romano
UESC

Prof. Dr. Marcio Gilberto Cardoso Costa
UESC – Orientador

Prof^a. Dr^a. Rachel Passos Rezende
UESC

À minha família pelo apoio,
incentivo e torcida para vencer
todos os obstáculos

AGRADECIMENTOS

Nessa etapa que se encerra não poderia deixar de reconhecer a importância daqueles que sempre estiveram ao meu lado e me apoiaram.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UESC pela oportunidade de realização do curso.

Aos meus queridos orientadores, Márcio Costa e Jane Lima, que confiaram, ensinaram e que hoje posso chamar de amigos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Fundo de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo financiamento do projeto e da concessão da bolsa.

Aos meus pais, irmãos, tios (as), primos (as) e avó por sempre ter apoiado, acompanhado e torcido por cada vitória.

Aos meus professores da graduação, por terem me tornado profissional, principalmente a professora Fernanda Gaiotto por ter me apresentado o maravilhoso mundo da genética e pela orientação durante a iniciação científica. A professora Cláudia Macedo, pelo apoio e conselhos constantes que foram decisivos em minha caminhada.

Às professoras Fátima Noronha e Ana Maria Caetano da Universidade Federal de Minas Gerais que disponibilizaram os laboratórios, materiais e o tempo para me auxiliar.

Aos meus colegas de curso pelo companheirismo, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Aos meus amigos mineiros, Nathália, Mateus, Myrian e Tatiana pela colaboração e apoio. E a família Roze pelo carinho e acolhimento.

A Virgínia, Thaíse, Dany, Cristiano e demais companheiros do Laboratório de Genética e Biologia Molecular da UESC.

Aos meus eternos amigos Fabrício, Tati, Bal, e aos meus novos amigos Neide, Lana, Grazi, Edwaldo, Verônica, Rafa, Gabriel e Leila pela companhia, pelas palavras sempre sinceras e pela torcida.

À Lu, pela atenção, carinho e disponibilidade.

A Deus, por tudo o que Ele representa.

ÍNDICE

EXTRATO	8
ABSTRACT.....	10
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1. <i>Uso de <u>Trichoderma stromaticum</u> no combate a vassoura-de-bruxa</i>	18
2.2. <i>Receptores de membrana</i>	20
2.2.1. <i>Receptores Toll-Like.....</i>	20
2.2.2. <i>Reconhecimento de β-glucan por Dectina-1</i>	22
2.3. <i>Mecanismos microbicidas de fagócitos</i>	24
2.3.1. <i>Fagocitose.....</i>	24
2.3.2. <i>Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS).....</i>	24
2.3.3. <i>Produção de Óxido Nítrico.....</i>	27
2.4. <i>Resposta imune alérgica a esporos fúngicos</i>	29
3. OBJETIVOS.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1. <i>Reagentes</i>	32
4.2. <i>Obtenção de esporos do fungo <u>Trichoderma stromaticum</u>.....</i>	32
4.3. <i>Animais.....</i>	32
4.4. <i>Grupos Experimentais.....</i>	33
4.5. <i>Comitê de Ética</i>	33
4.6. <i>Ensaio In Vitro</i>	33
4.6.1. <i>Obtenção de neutrófilos peritoneais de camundongos.....</i>	33
4.6.2. <i>Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos</i>	34
4.6.3. <i>Teste de viabilidade.....</i>	34
4.6.4. <i>Ensaio de quimioluminescência para avaliação da Explosão Respiratória</i>	35
4.6.5. <i>Quantificação da produção de Óxido Nítrico</i>	35
4.6.6. <i>SDS-PAGE e Western Blotting.....</i>	36

4.6.7. Extração de RNA total de macrófagos e neutrófilos e síntese de cDNA	37
4.6.8. Quantificação Relativa de Transcritos	38
4.7. Ensaio In Vivo	39
4.7.1. Teste de Alergia	39
4.7.1.1. Grupos Experimentais	39
4.7.1.2. Obtenção de sangue periférico e lavado broncoalveolar.....	39
4.7.1.3. Dosagem de IgE Total e citocinas	40
4.7.1.4. Histologia do Pulmão.....	41
4.7.1.5. Cultura de células do baço	41
4.7.2. Infecção In Vivo com <u>Leishmania major</u>	42
4.8. Documentação fotográfica.....	42
4.9. Análise Estatística	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1. Esporos de <u>Trichoderma stromaticum</u> sozinhos não causam alergia.....	43
5.1.1. Análise histológica do tecido pulmonar de camundongos BALB/c submetidos à inalação de esporos de <u>T. stromaticum</u>	43
5.1.2 Esporos de <u>T. stromaticum</u> não interferem na produção de IgE total.	44
5.1.3. Regulação local e sistêmica da produção de citocinas por esporos de <u>T. stromaticum</u>	45
5.2. Explosão respiratória de neutrófilos é inibida por esporos de <u>T. stromaticum</u>	52
5.3. Inibição da produção de NO de macrófagos por <u>T. stromaticum</u> parece não ser dependente de TLR 4.....	58
5.4. Esporos de <u>Trichoderma stromaticum</u> contribuem para exacerbação da lesão causada por <u>L. major</u> em camundongos resistentes.....	64
6. CONCLUSÕES	68
ANEXO I.....	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

EXTRATO

ALVES-FILHO, Edilson Ribeiro, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Fevereiro de 2008. **Avaliação do potencial alérgico de esporos de *Trichoderma stromaticum* em camundongos e o seu efeito em células da imunidade inata.** Orientador: Dr. Márcio Gilberto Cardoso Costa. Co-orientadora: Dr^a. Jane Lima dos Santos.

A vassoura de bruxa, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, trouxe grandes prejuízos para a lavoura cacaueteira no sul da Bahia. Na tentativa de minimizar os impactos causados pela doença, várias estratégias de controle vêm sendo utilizadas, dentre elas, o uso do fungo biopesticida *Trichoderma stromaticum*. Espécies do gênero *Trichoderma* são conhecidas por parasitarem fitopatógenos, competirem com os mesmos por nutrientes e espaço, além de induzirem resistência na planta hospedeira. Por ser manipulado e pulverizado num ambiente onde circulam pessoas e animais, o objetivo do presente estudo foi investigar a ação de esporos de *T. stromaticum* no sistema imune, usando camundongos como sistema-modelo. Após testes de alergia realizados em animais que inalaram os esporos do fungo, verificou-se que o *T. stromaticum* sozinho não possui potencial alergênico. Porém, observou-se uma intensa migração de neutrófilos e macrófagos para o pulmão de animais que inalaram os esporos. Além disso, os esporos inibem a produção de IL-10 quando dosada no sobrenadante do lavado broncoalveolar e no sobrenadante da cultura de células de baço estimuladas com concanavalina A. Quando se analisou a ação do fungo sobre os fagócitos da imunidade inata (macrófagos e neutrófilos), observou-se que ele também inibe importantes mecanismos microbicidas dessas células. Os

fagócitos são responsáveis pelo reconhecimento, fagocitose e produção de substâncias tóxicas contra diversos microrganismos invasores. Na tentativa de investigar a ação de *T. stromaticum* sobre essas células, neutrófilos e macrófagos peritoneais de camundongos foram coletados e interagiram com diferentes concentrações dos esporos do fungo. Observou-se que os esporos inibiram dois importantes mecanismos microbicidas, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por neutrófilos e a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos. Interessantemente, receptores de membrana incluindo Dectina-1 e TLR2, e TLR4 responsáveis pelo início da cascata de sinalização da via de produção de ROS e NO respectivamente, também foram inibidos pelos esporos. Mostramos que a inibição da produção de NO foi reflexo da redução dos níveis de expressão de iNOS, enzima responsável pela conversão de L-arginina em citrulina e óxido nítrico. A partir dos dados de infiltrado neutrofílico no pulmão de animais que inalaram esporos de *T. stromaticum*, regulação negativa dos mecanismos microbicidas dos fagócitos e inibição de IL-10 local e no baço, apontando para uma ação sistêmica do esporo, nosso interesse foi investigar a possibilidade do esporo inalado estar interferindo no curso de infecções cujo controle depende dos mecanismos inatos da defesa. Dessa forma utilizamos o modelo de resistência para *Leishmania major* já bem estabelecido. Após inalarem esporos do fungo, camundongos C57BL/6 foram inoculados na pata com formas promastigotas de *L. major*. As patas foram medidas semanalmente e os resultados mostraram um aumento de 100% da lesão naqueles animais que inalaram os esporos, além de aumentar o tempo de regressão dessa lesão mostrando que os esporos modulam os mecanismos microbicidas *in vivo*, tornando o hospedeiro susceptível a *L. major*. Assim, pode-se dizer que, apesar de não ser considerado um alérgeno, os esporos do fungo biofungicida causam imunossupressão em organismos resistentes a outros microrganismos. Este fato deve ser levado em consideração durante o uso do biofungicida na lavoura cacaueteira, principalmente no sul da Bahia, região considerada zona endêmica de leishmaniose.

Palavras-chave: alergia, fagócitos, mecanismos microbicidas, *Trichoderma stromaticum*, *Leishmania major*

ABSTRACT

ALVES-FILHO, Edilson Ribeiro, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, February 2008. **Evaluation of the potential allergic to spores of *Trichoderma stromaticum* in mice and its effect on cells of innate immunity.** Advisor: Dr. Márcio Gilberto Cardoso Costa. Co-Advisor: Dr^a. Jane Lima dos Santos.

The witch broom, caused by the *Moniliophthora perniciosa* fungus, brought big losses to the cocoa crop in southern Bahia. In an attempt to minimize the impacts caused by the disease, several control strategies are being used, one of them, the application of the biofungicide fungus *Trichoderma stromaticum*. Species of the genus *Trichoderma* are known for parasitize phytopathogenes, compete with them for nutrients and space, not to mention induce resistance to the host plant. As it is handled and pulverized in an environment where there are people and animals, the objective of the present study is to examine the effect of the *T. stromaticum* spores on the immune system, using mice as system-model. Following allergy tests performed in animals that had inhaled the fungus spores, it was observed that the *T. stromaticum* itself has no allergenic potential. However, an intense migration of neutrophils and macrophages to the lungs of animals that had inhaled the spores was noticed. Moreover, the spores inhibit the production of IL-10 when dosed on the bronchoalveolar lavage and on spleen cell culture stimulated with concanavalin A. When the fungus effect on the innate immunity phagocytes (macrophages and neutrophils) was analyzed, it was noticed that the fungus inhibits important microbicidal mechanisms of these cells, as well. The phagocytes are responsible for the recognition, phagocitoses and production of toxic substances against several invader microorganisms. In the attempt to

investigate the action of *T. stromaticum* on these cells, mice neutrophils and peritoneal macrophages were collected and interacted with different concentrations of the fungus spores. It was observed that the spores inhibited two important microbicidal mechanisms, the production of reactive oxygen species (ROS) by neutrophils and the production of nitric oxide (NO) by macrophages. Interestingly, membrane receptors including Dectina-1 and TLR2 and TLR4 responsible for the beginning of the signaling cascade of the ROS e NO production respectively, were also inhibited by the spores. We have shown that the inhibition of NO production was a reflex of the reduction of the levels of expression of iNOS, enzyme responsible for the conversion of L-arginin into citrulin and nitric oxide. Based on the data of neutrophilic infiltrate in the lungs of animals that inhaled *T. stromaticum* spores, negative regulation of the phagocyte microbicidal mechanisms and inhibition of IL-10 locally and in the spleen, pointing to a systemic action of the spore, our interest was to examine the possibility of the inhaled spore to be interfering with the course of infections whose control depends on the innate defense mechanisms. Thus, we have used the model of resistance to *Leishmania major* already explained. After inhaling the fungus spores, C57BL/6 mice were inoculated on the pawns with promastigote forms of *L. major*. The pawns were measured weekly and the results showed a 100% increase of the injury in those animals that had inhaled the spores, in addition to increasing the regression time of this injury, showing that the spores modulate the microbicidal mechanisms *in vivo*, making the host susceptible to *L. major*. Therefore, it can be said that despite not being considered an allergen, the biofungicide fungus spores cause immunosuppression in organisms resistant to other microorganisms. This fact must be taken into consideration when using the biofungicide in the cocoa crops, mainly in southern Bahia, a region considered to be a leishmaniose endemic.

Palavras-chave: allergy, phagocyte, microbicides mechanisms, *Trichoderma stromaticum*, *Leishmania major*

LISTA DE FIGURAS

1. Resposta celular a β -glucan de fungo mediada por Dectina-1	23
2. Componentes da explosão respiratória. Extraído e modificado de DeCOURSEY & LIGETI (2005)	26
3. Histologia de pulmão de camundongos BALB/c submetido ou não a inalação de esporos de <i>T. stromaticum</i>	46
4. Produção de IgE total de sangue periférico de camundongos submetidos ou não a inalação com esporos de <i>T. stromaticum</i>	47
5. Produção de citocinas de Lavado Broncoalveolar (LBA) de camundongos submetidos ou não a inalação com esporos de <i>T. stromaticum</i>	50
6. Produção de citocinas do sobrenadante de cultura de células de baço de camundongos BALB/c submetido ou não a inalação de esporos de <i>T. stromaticum</i>	51
7. Viabilidade de neutrófilos de camundongos BALB/c após interação com diferentes concentrações de esporos de <i>T. stromaticum</i>	53
8. Efeito das diferentes concentrações de esporos de <i>T. stromaticum</i> na explosão respiratória de neutrófilos de camundongos BALB/c.....	54
9. Expressão relativa de mRNA de neutrófilos de camundongos BALB/c para o gene Dectina-1 e TLR2	57
10. Viabilidade de macrófagos de camundongos BALB/c após interação com diferentes concentrações de esporos de <i>T. stromaticum</i>	59
11. Produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c em resposta ao <i>T. stromaticum</i>	60
12. Efeito das diferentes concentrações de esporos de <i>T. stromaticum</i> na expressão de iNOS por macrófagos de camundongos BALB/c	62
13. Expressão relativa de mRNA de macrófagos de camundongos BALB/c para o gene TLR4.....	63
14. Lesão causada por <i>Leishmania major</i> em animais que inalaram ou não esporos de <i>T. stromaticum</i>	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA	Batata Dextrose Ágar
cAMP	Adenosina Monofosfato cíclica
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico complementar
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FcyRs	Receptores Fc
FMN	Flavina Mononucleotídeo
HE	Hematoxilina-Eosina
ICSBP	<i>Interferon Consensus Sequence-Binding Protein</i>
IFN-	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina isotipo E
IL-1	Interleucina 1
IL-13	Interleucina 13
IL-1R	Receptor Interleucina 1
IL-5	Interleucina 5
IL-10	Interleucina 10
iNOS	Óxido Nítrico Sintetase induzida
ITAM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i>

LBA	Lavado Broncoalveolar
LiCl	Cloreto de Lítio
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Ácido Lipoteicóico
MTT	3-(4,5-di-metilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium brometo
MyD88	<i>Myeloid Differentiation primary response gene (88)</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NEED	Diamina-di-hidroclorido naftaleno
NF-kB	Fator Nuclear kappa B
nNOS	Óxido Nítrico Sintetase neuronal
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintetase
OPD	<i>Ortho-Phenylenediamine</i>
PAMP	Padrão Molecular Associado ao Patógeno
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Solução Fosfato Tamponada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDE4	Phosphodiesterase 4
PMA	Miristato-Acetato de Forbol
PRR	Receptores de Reconhecimento do Padrão
RNA	Ácido Ribonucléico
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio

RPM	Rotações Por Minuto
RPMI	Meio de cultura Roswell P. Mem. Inst.
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
Stat 1	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 1</i>
Th1	<i>T helper 1</i>
Th2	<i>T helper 2</i>
TIRAP	Proteína Adaptadora contendo domínio TIR
TLR	Receptor tipo Toll
TLR2	Receptor tipo Toll 2
TLR4	Receptor tipo Toll 4
TNF-	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	T regulatória

1. INTRODUÇÃO

A vassoura-de-bruxa, doença causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, gera grandes prejuízos para a lavoura cacaueteira no sul da Bahia (DIAS, 2001). A toxicidade associada ao uso de muitos pesticidas químicos tem dado um impulso para o desenvolvimento de agentes biológicos naturais ou criados geneticamente para o controle de doenças (ARONSON *et al.*, 1986).

Várias espécies de *Trichoderma* têm sido avaliadas para o controle de *M. perniciosa*. Dentre essas, destaca-se o *Trichoderma stromaticum* (SAMUELS *et al.*, 2000), isolado a partir de vassouras secas de cacaueteiros em Belém (PA). Os fungos do gênero *Trichoderma* são bem conhecidos por inibirem o crescimento e o desenvolvimento de uma variedade de patógenos de plantas economicamente importantes (HERRERA-ESTRELLA & CHET, 1998; BENHAMOU & CHET, 1993). Devido aos mecanismos de ação diretos e indiretos apresentados tanto em condições controladas como naturais, o micoparasita *T. stromaticum* vem sendo usado no combate à vassoura-de-bruxa do cacaueteiro sob a forma de biopesticida.

Os microrganismos do ambiente, sozinhos ou associados a moléculas constituintes de bioaerosóis podem desencadear doenças inflamatórias das vias aéreas (HAUSWIRTH & SUNDY, 2004), a exemplo de esporos fúngicos de diversas espécies que, quando inalados (BANERJEE *et al.*, 2000; SAIKAI *et al.*, 2004; HAVAUX *et al.*, 2005) ativam mecanismos efetores de células do sistema imune.

A imunidade protetora contra infecções patogênicas em mamíferos pode ser dividida em imunidade inata e adaptativa (NOVERR *et al.*, 2005; AKBARI *et al.*, 2002; ZUANY-AMORIM *et al.*, 2002). Os fagócitos (macrófagos e neutrófilos), que fazem parte da imunidade inata internalizam e degradam agentes infecciosos, num processo conhecido por fagocitose (ADEREM & UNDERHILL, 1999). Uma

vez internalizados, os mecanismos para a eliminação do patógeno são variados. Dentre eles destacam-se a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (ROOS *et al.*, 2003) principalmente por neutrófilos e a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos (STUEHR & MARLLETA, 1985). Apesar de neutrófilos e macrófagos serem aptos a produzir ambos os radicais tóxicos, esses fagócitos apresentam diferenças nas quantidades produzidas.

Enquanto ROS faz parte dos mecanismos da imunidade inata, o NO depende de citocinas produzidas por células da imunidade adaptativa como os linfócitos T *helper* (Th). Após o estímulo antigênico, as células T *naive* podem se diferenciar em células T tipo 1 (Th1), Th2 ou T regulatórias (Treg). As células Th1, produtoras de IFN- γ (Interferon gama), estão relacionadas principalmente com o controle das infecções por microrganismos intracelulares como bactérias, vírus, protozoários, enquanto as Th2 caracterizadas pelo aumento do número de eosinófilos, mastócitos e nos níveis de IL-5, IL-13 e IgE (Imunoglobulina E) (NOVERR *et al.*, 2005) relaciona-se com a resposta alérgica (NOVERR *et al.*, 2005; AKBARI *et al.*, 2002; ZUANY-AMORIM *et al.*, 2002), e com o controle de infecções por helmintos (WALTER *et al.*, 2006). Já as Tregs são responsáveis pelo controle da resposta de linfócitos Th1 e Th2 (McGEE & AGRAWAL, 2006).

Os estudos sobre as interações de fungos e seus produtos com os componentes do sistema imune inato e adaptativo vem crescendo, porém pouco se sabe sobre a interação de esporos de *T. stromaticum*, espécie fúngica ambiental, utilizada em controle biológico de pragas, e a imunidade de mamíferos. Dessa forma, os objetivos desse trabalho foram investigar o potencial desses esporos em desencadear processo alérgico das vias aéreas, a ação sobre fagócitos e seu potencial imunomodulador no curso da leishmaniose experimental murina, já que a região sul da Bahia, onde são utilizados os esporos do fungo em combate a vassoura-de-bruxa é zona endêmica da leishmaniose.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Uso de *Trichoderma stromaticum* no combate a vassoura-de-bruxa

A vassoura-de-bruxa, doença causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, afeta a lavoura cacaueteira no sul da Bahia com grandes prejuízos econômicos e sociais para a região (DIAS, 2001). Em condições naturais, a disseminação da doença resulta da dispersão abiótica de basidiósporos uninucleados, liberados dos basidiomas formados na superfície externa dos órgãos do hospedeiro. Os basidiósporos podem infectar qualquer tecido meristemático em crescimento, como extremidades de botões germinativos, flores e frutos da planta do cacaueteiro.

Existem quatro estratégias para minimizar o impacto da doença: a fitossanitarização, o controle químico, o uso de plantas resistentes e o controle biológico (SANOGO *et al.*, 2002). Devido à toxicidade associada a muitos pesticidas, pesquisas têm propiciado o desenvolvimento de agentes biológicos para o controle de pragas. Microrganismos incluindo bactérias, vírus e fungos têm sido identificados ou desenvolvidos para o uso no controle de pragas, (ARONSON *et al.*, 1986), danos causados por geada, disponibilidade de suplemento no solo (WARD *et al.*, 1998) e questões relacionadas à poluição (ROJO *et al.*, 1987).

Assim, pesquisas não diretamente ligadas ao ciclo do fungo, mas úteis no estabelecimento de estratégias de controle a curto e médio prazo, também estão sendo implementadas na busca de alternativas que viabilizem a sustentabilidade da lavoura cacaueteira. Dentre essas, destaca-se aquelas realizadas com agentes de controle biológico que visam reduzir a produção de inóculo de *M. perniciosa*.

Os fungos do gênero *Trichoderma* (Ascomicetos) são bem conhecidos por inibirem o crescimento e o desenvolvimento de uma variedade de patógenos de plantas economicamente importantes (HERRERA-ESTRELLA & CHET, 1998; BENHAMOU & CHET, 1993). Várias espécies de *Trichoderma* têm sido avaliadas para o controle de *M. pernicioso*. Dentre essas, destaca-se o fungo antagonista *Trichoderma stromaticum* (SAMUELS *et al.*, 2000), isolado a partir de vassouras secas de cacauzeiros em Belém (PA). Este fungo foi identificado inicialmente como *T. viride* e posteriormente como *T. polysporum* (COSTA *et al.*, 1996).

Devido aos mecanismos de ação diretos e indiretos apresentados tanto em condições controladas como naturais, o micoparasita *T. stromaticum* vem sendo usado no combate à vassoura-de-bruxa do cacauzeiro sob a forma de biopesticida, o “Tricovab”. Este biopesticida tem sido produzido e distribuído pela Unidade de Biocontrole do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC-CEPLAC, Ilhéus-BA) desde 2000. Quando pulverizado em lavouras, o *T. stromaticum* germina e esporula podendo parasitar o fitopatógeno, competir com o mesmo por nutrientes e espaço, além de induzir resistência na planta hospedeira (BASTOS & DIAS, 1992).

Em geral, os biopesticidas são considerados potencialmente seguros para a saúde humana (CASTRO *et al.*, 2001). Entretanto, os microrganismos do ambiente, sozinhos ou associados a moléculas constituintes de bioaerosóis podem desencadear doenças inflamatórias das vias aéreas (HAUSWIRTH & SANDY, 2004), a exemplo de esporos fúngicos de diversas espécies quando inalados (BANERJEE *et al.*, 2000; SAIKAI *et al.*, 2004, HAVAUX *et al.*, 2005).

Apesar dos fungos compartilharem muitas características básicas com as células de mamíferos, a principal distinção entre os dois grupos é a presença de parede celular rígida no fungo (PELCZAR *et al.*, 1996). A parede dos fungos é composta principalmente de polissacarídeos (80%) e proteínas (3 – 20%), com lipídios, pigmentos e sais inorgânicos presente em poucas quantidades. Os componentes macromoleculares principais na parede celular dos fungos (Ascomicetos, Basidiomicetos, Deuteromicetos) são β -glucan, quitina e manoproteínas (glicoproteínas). O β -glucan, a quitina e as microfibras de celulose são responsáveis pela firmeza e forma da parede celular (RUIZ-HERRERA, 1992). Essas estruturas microbianas são geralmente essenciais à sobrevivência

do microrganismo (BROWN, 2006) e fazem parte do grupo de moléculas denominadas padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs). Tais estruturas são de extrema importância na interação patógeno-hospedeiro por serem reconhecidas por receptores de reconhecimento do padrão (PRR) presentes em células da imunidade inata, os quais desencadeiam a cascata de sinais citoplasmáticos que ativam as células para uma resposta imune efetora (SOUSA, 2004 e PASARE & MEDZHITOV, 2004).

2.2. Receptores de membrana

Os receptores de membrana são utilizados para internalização de microrganismos e incluem receptor de manose (EZEKOWITZ *et al.*, 1990), receptores Fc e do complemento (BROWN, 1991) e para desencadear sinais citoplasmáticos necessários para a expressão gênica como a dectina-1 (HERRE *et al.*, 2004) e os receptores *Toll-like* (TLRs) (DOYLE *et al.*, 2004 e BLANDER & MEDZHITOV, 2004). Esses últimos fazem parte do grupo dos PRRs e reconhecem grande quantidade de estruturas microbianas conservadas, possibilitando ao hospedeiro reconhecer uma variedade de patógenos (JANEWAY, 1992).

2.2.1. Receptores *Toll-Like*

Os TLRs foram inicialmente identificados como um receptor essencial para a polarização dorso-ventral no desenvolvimento inicial de *Drosophila* e que mais tarde mostrou-se importante também para a imunidade antifungo (AKIRA, 2004). Esses receptores fazem parte de um grupo de proteínas evolutivamente conservadas pertencentes à superfamília do receptor IL-1R, caracterizado por um domínio extracelular rico em repetições de leucina e um domínio intracelular como o receptor Toll/IL-1 (XU *et al.*, 2004). Posteriormente, identificaram-se receptores Toll em mamíferos (AKIRA, 2004), incluindo humanos e camundongos (MEDZHITOV *et al.*, 1997). A família de receptores Toll inclui 13 (TABETA *et al.*, 2004; TAKEDA & AKIRA, 2005) dessas proteínas que reconhecem uma grande

quantidade de ligantes derivados de microrganismos (TAKEDA *et al.*, 2003) e foram documentados como os principais iniciadores da resposta imune inata (ALDERTON *et al.*, 2001 e MEDZHITOV, 2001) ativando mecanismos microbicidas e inflamatórios em células efectoras como macrófagos e neutrófilos (SOUSA, 2004). Cada membro de receptores da família Toll reconhece diferentes PAMPs, que incluem lipopolissacarídeos, lipoproteínas, peptídeo glicano, ilhas DNA (Ácido Desoxirribonucléico) CpG, RNA fita dupla e flagelina bacteriana (AKIRA, 2004).

Evidências mostram que os TLRs contribuem significativamente para a ativação da resposta imune adaptativa (PASARE & MEDZHITOV, 2003). As citocinas secretadas por células dendríticas e macrófagos em resposta a ligantes de TLR induzem a ativação da resposta de células T e a proliferação de células B (PASARE & MEDZHITOV, 2004). Os PAMPs quando ativam as células através dos receptores Toll podem levar a uma ampla variedade de respostas de diferentes tipos celulares como a produção de citocinas e quimiocinas, o aumento da capacidade de apresentação de antígenos, a expressão de moléculas de adesão e co-estimulatórias, o início da proliferação celular e a produção de fatores antimicrobianos (APPLEQUIST *et al.*, 2002) e radicais tóxicos do oxigênio e do nitrogênio (BROWN, 2006 e KROPF *et al.*, 2004). Em muitos casos, dois diferentes TLR colaboram um com o outro ou com um co-receptor em seqüência para sinalizar a ligação com o ligante microbiano. TLR2, por exemplo, medeia a resposta celular a peptídeo glicano de bactérias, lipoproteína e zimosano, às vezes em cooperação com TLR1, às vezes em cooperação com TLR6 (OZINSKY *et al.*, 2000). A ativação de TLR2 em macrófagos dispara, via TIRAP e MyD88, uma rota de sinalização que culmina na ativação de NF- κ B e na produção de citocinas como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (DOYLE *et al.*, 2002 e KAWAI *et al.*, 2001). O TLR2 pode ainda se associar a um receptor diferente de Toll, como Dectina-1. A sinalização de Dectina-1 integrada com a via de TLR é desconhecida, mas parece estar envolvida no recrutamento de quinase, pela Dectina e subsequente fosforilação e ativação por TLR 2. Visto que Dectina-1 e TLR 2 parecem estar co-localizados, é provável que eles formem uma espécie de complexo de sinalização (ARBIBE *et al.*, 2000 e SHIMAZU *et al.*, 1999).

2.2.2. Reconhecimento de β -glucan por Dectina-1

A Dectina-1 é um receptor de lectina tipo-C que reconhece β -glucan (BROWN, 2006), um dos componentes da parede celular de fungos (KOLLAR et al., 1997). Ele é expresso na superfície de monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (BROWN & GORDON, 2001). Esse receptor tem um motivo semelhante à ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) em sua cauda citoplasmática que está envolvida na ativação celular (GOLDSTEIN et al., 1975; GANTNER et al., 2003; UNDERHILL et al., 2005). ITAM é necessário para a ativação da produção de citocinas pro-inflamatórias, em colaboração com receptores do tipo Toll (TLRs) e para indução da explosão respiratória em resposta a ligantes β -glucan de patógenos fúngicos (Figura 1) (GANTNER et al., 2003 e BROWN et al., 2003). Aproximadamente 50% da parede celular dos fungos apresentam β -glucan em sua constituição (KLIS et al., 2002) e esse carboidrato pode contribuir para a interação com dectina-1 (GANTNER et al., 2005).

Recentemente foi relatado que camundongos deficientes em Dectina-1 são mais susceptíveis a infecções fúngicas, pois este receptor está relacionado com a fagocitose de leveduras (SAIJO et al., 2007; TAYLOR, et al., 2007). Assim, além de disparar a fagocitose, esse receptor estimula a produção de ROS. Steele e colaboradores (2005) mostraram que Dectina-1 é importante na eliminação de *Aspergillus fumigatus* e *Pneumocystis carinii* (STEELE et al., 2005). Entretanto, esse reconhecimento pode ser falho a depender da forma do microrganismo. Dectina-1 não reconhece hifas de *Candida albicans*, porém, reconhece filamentos de *A. fumigatus* (GANTNER et al., 2005; SAIJO et al., 2007).

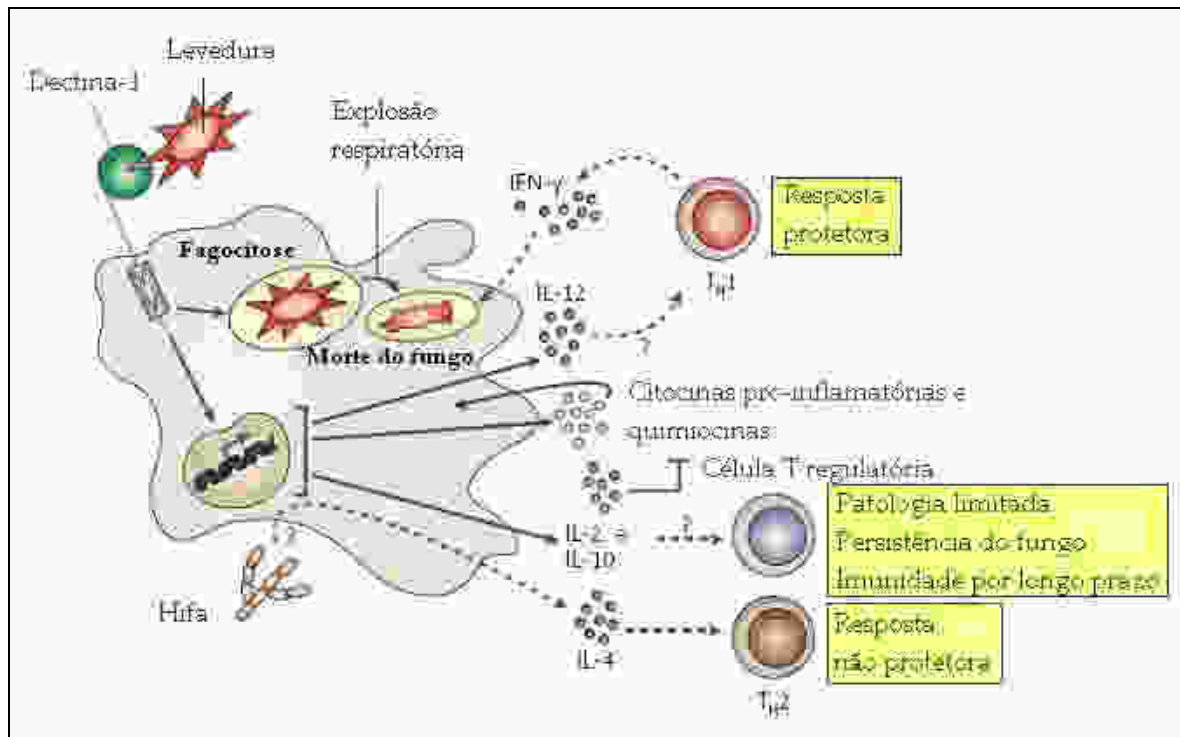


Fig. 1: Resposta celular a β -glucan de fungo mediada por Dectina-1. O reconhecimento de β -glucan em partículas fúngicas, induz várias respostas celulares mediadas por Dectina-1, o que contribui com a imunidade anti-fungo. Isto inclui o ataque e a morte do fungo e a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Extraído e modificado de Brown (2006).

2.3. Mecanismos microbicidas de fagócitos

2.3.1. Fagocitose

As estratégias utilizadas pelas células para internalizar partículas e solutos são a pinocitose e fagocitose mediada por receptor (ALLEN & ADEREM, 1996). A pinocitose geralmente se refere à retirada de fluidos e solutos. Em contraste, a fagocitose é a retirada de partículas grandes (> 0,5 µm) através de um mecanismo dependente de actina. A fagocitose em animais ocorre primariamente em células fagocíticas especializadas, como macrófagos e neutrófilos que englobam e degradam agentes infecciosos, células senescentes, e ainda participam da resposta inflamatória e do desenvolvimento e remodelagem de tecidos (ADEREM & UNDERHILL, 1999).

Os fagócitos profissionais, macrófagos e neutrófilos, são muito eficientes na internalização de partículas (ADEREM & UNDERHILL, 1999) e tal eficiência pode estar relacionada à presença de receptores fagocíticos que aumentam a capacidade fagocítica e a razão da fagocitose (INDIK *et al.*, 1995). A fagocitose é extremamente complexa devido à diversidade dos receptores e à capacidade dos microrganismos influenciarem seu destino, como sua internalização (ADEREM & UNDERHILL, 1999). Uma vez internalizados tais microrganismos tornam-se alvo dos diversos mecanismos microbicidas dos fagócitos incluindo enzimas lisossomais, ROS e NO.

2.3.2. Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Os fagócitos realizam seu papel como células efetoras principalmente através da exposição dos patógenos a diferentes mecanismos destrutivos incluindo proteínas hidrolíticas lisossômicas e de grânulos, espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas pela ação da enzima NADPH oxidase (Nicotinamida Adenina Dinucleotideo Fosfato) (ROOS *et al.*, 2003) e produção de NO.

A NADPH oxidase é um componente vital para a defesa do hospedeiro. É uma enzima com multicomponentes com um centro redox que transfere elétrons da NADPH para o oxigênio molecular extracelular (ou intrafagossomal) gerando o

ânion superóxido (O_2^-). A reação geral catalisada pela NADPH oxidase é dada por:



Após estímulo na membrana celular, os componentes protéicos gp91^{phox} e p22^{phox} (associados à membrana), p47^{phox}, p67^{phox} e p40^{phox} (citoplasmáticas) do complexo enzimático NADPH oxidase se unem (AMBRUSO *et al.*, 1990; NAUSEEF *et al.*, 1991; HEYWORTH *et al.*, 1991) e iniciam a reação de conversão do O_2 em ânion superóxido O_2^- (DeCOURSEY & LIGETI, 2005 SBARRA & KARNOVSKY, 1959; ROOT & METCALF, 1977; COHEN & CHOVANIEC, 1977) (**Figura 2**). Esse radical está envolvido na eliminação de muitos microrganismos invasores (HAMPTON *et al.*, 1998; CHAPMAN *et al.*, 2002; RADA *et al.*, 2004) por ser o precursor para a formação de espécies extremamente tóxicas do oxigênio como o radical hidroxila (OH^\cdot) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Certos estímulos como o forbol éster ou miristato-acetato de forbol (PMA) produzem atividade intensa e prolongada da NADPH oxidase. O PMA induz a montagem da NADPH oxidase na superfície da membrana, que então libera os O_2 para dentro do espaço extracelular. Assim como o PMA, o zimosano opsonizado produz uma resposta forte e contínua com uma fase lag pronunciada, mas a explosão respiratória é curta e é iniciada pela estimulação de receptores de membrana (DeCOURSEY & LIGETI, 2005) como dectina-1, FcyRs (Receptores Fc) (BROWN, 2007) e TLR4 (ASEHNOUNE *et al.*, 2004).

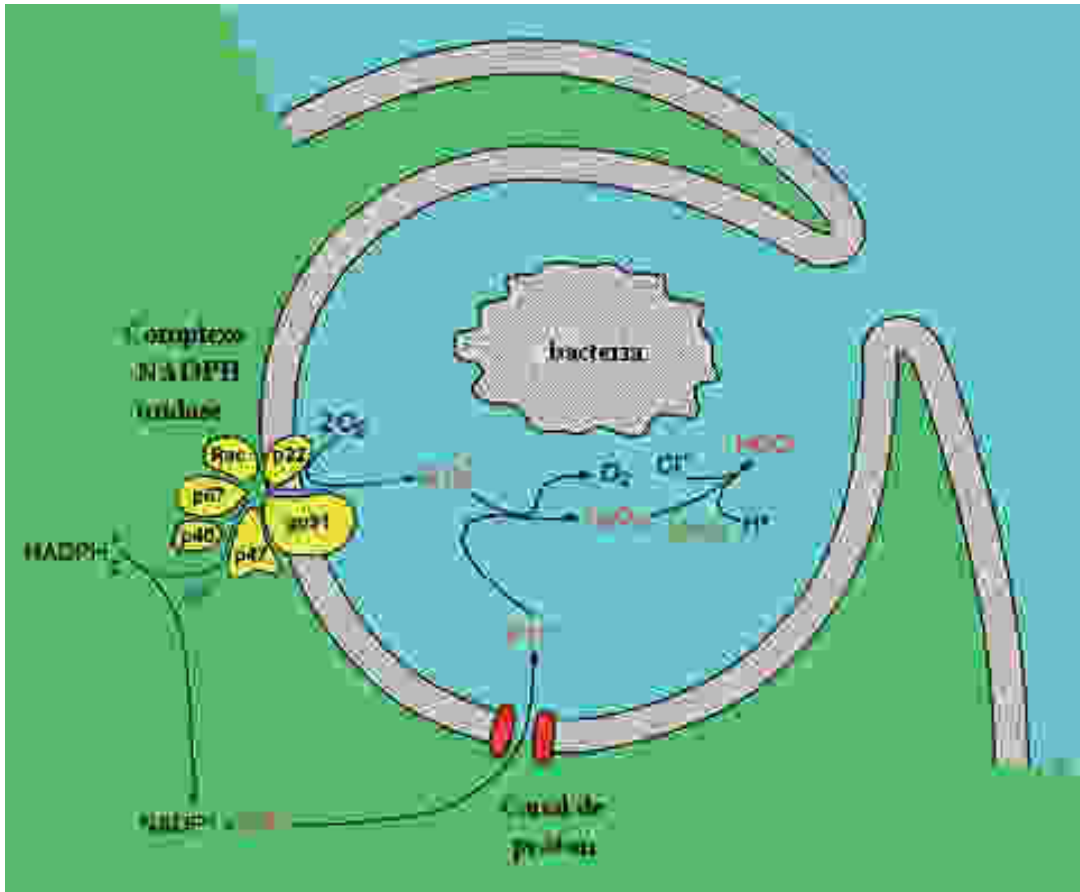


Fig. 2: Componentes da explosão respiratória. Extraído e modificado de DeCOURSEY & LIGETI (2005).

2.3.3. Produção de Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO), descoberto em 1987 (STUEHR & MARLETTA, 1985; PALMER *et al.*, 1987; IGNARRO *et al.*, 1987), é uma molécula gasosa sinalizadora que regula várias respostas fisiológicas e fisiopatológicas no corpo humano incluindo a circulação e pressão sanguínea, a neurotransmissão no sistema nervoso central e periférico e a defesa do hospedeiro. O papel do NO na resposta imune foi relatado em macrófagos de camundongos em resposta a lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (MIWA, 1987). Assim, o NO tem sido identificado como uma molécula com efeitos pró-inflamatórios destrutivos, está envolvida na defesa do epitélio brônquico do hospedeiro (KORHONEN *et al.*, 2005) e é efetora na citotoxicidade mediada por macrófagos (HIBBS *et al.*, 1987 e HIBBS *et al.*, 1989). Níveis elevados de NO são produzidos por células inflamatórias e tecidos em resposta a produtos bacterianos como LPS, ácido lipoteicóico (LTA), peptidoglicano, DNA bacteriano ou bactéria intacta (MacMICKING *et al.*, 1997),

A síntese do NO ocorre a partir da L-arginina em uma reação catalisada pela família de enzimas do óxido nítrico sintetase (NOS). A NOS ativada é um tetrâmero formado por duas proteínas NOS e duas moléculas calmodulina. A conversão de L-arginina em NO e L-citrulina requer NADPH e O₂ como co-substratos e (6R)-tetrahydrobiopterina (BH₄), FAD (Flavina Adenina Dinucleotídeo), FMN (Flavina Mononucleotídeo) e ferro protoporfirina IX como co-fatores (KNOWLES & MONCADA, 1994).

Três isoformas diferentes de NO têm sido caracterizadas. A NOS neuronal (nNOS, NOS I) é predominantemente expressa em neurônios cerebrais e nervos do sistema nervoso periférico (BOISSEL *et al.*, 1998). O NOS endotelial é principalmente expresso nas células do endotélio (SHAUL, 2002). A terceira isoforma da família do NOS é a induzida (iNOS, NOS II). A exposição a produtos microbianos, como LPS e dsRNA ou citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral- (TNF-) e IFN- γ induz a expressão do gene para iNOS em várias células inflamatórias e tecidos. A ligação da calmodulina a iNOS é forte mesmo em poucas concentrações de Ca²⁺, e conseqüentemente, a iNOS é também chamado de NOS independente de cálcio, podendo produzir níveis elevados de NO por períodos prolongados (ALDERTON *et al.*, 2001; BOGDAN, 2001; KLEINERT *et al.*, 2003).

A transcrição do gene para iNOS é um processo bem estabelecido em roedores (KORHONEN *et al.*, 2005) sendo regulada por um promotor de ~1 kb (XIE *et al.*, 1993 e LOWENSTEIN *et al.*, 1993), que contém sítios de ligação para fatores de transcrição. O promotor de iNOS em camundongos contém dois elementos NF- κ B (*Nuclear Factor kappa B*) que são críticos para a expressão da enzima. A inibição química do NF- κ B previne a expressão de iNOs e a produção de NO (KIM *et al.*, 1997; DIAZ-GUERRA *et al.*, 1996; KLEINERT *et al.*, 1996; XIE *et al.*, 1994).

O IFN- γ aumenta eficientemente a expressão de iNOS em muitas células e a sua expressão é prejudicada em macrófagos de camundongos deficientes para o sinal transdutor e ativador da transcrição 1 (Stat 1) (KORHONEN *et al.*, 2005), para o fator regulatório de IFN 1 (IRF-1) (KAMIJO *et al.*, 1994) ou para a seqüência de ligação de proteína consenso a IFN (ICSBP - *Interferon Consensus Sequence-Binding Protein*) (CONTURSI *et al.*, 2000) demonstrando a importância dos fatores de transcrição em resposta ao IFN na expressão de iNOS (GAO *et al.*, 1997).

O óxido nítrico é uma molécula reativa que tem uma variedade de efeitos dependendo de sua concentração relativa. Existem efeitos diretos do NO que são medidos pela própria quantidade da molécula e efeitos indiretos que são medidos pela quantidade de espécies reativas de nitrogênio (RNS) produzidas pela interação do NO com ânion superóxido e com oxigênio. O mecanismo molecular que medeia a atividade biológica do NO pode ser dividido em três categorias. Primeiro, o NO reage rapidamente com metais de transição, como ferro, cobre e zinco. Esses metais são abundantemente presentes em grupos prostéticos de enzimas e outras proteínas. Segundo, o NO está disponível para a indução da formação de S-nitrosilados por resíduos de cisteína em uma reação chamada S-nitrosilação. A nitrosilação tem mostrado modificar a atividade de muitas proteínas envolvidas no mecanismo regulatório celular (STAMLER *et al.*, 2001). Por último, o NO reage muito rapidamente com ânion superóxido (O_2^-), resultando na formação de peroxinitrito ($ONOO^-$). Este é um agente nitrante e um poderoso oxidante que tem a capacidade de modificar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (KORHONEN *et al.*, 2005). Assim, a produção de óxido nítrico torna-se um potente agente microbicida contra microrganismos invasores.

2.4. Resposta imune alérgica a esporos fúngicos

A imunidade protetora contra infecções em mamíferos é iniciada pela resposta imune inata a qual interage e pode direcionar a imunidade adaptativa. Nesta, após o estímulo antigênico, as células T virgens podem se diferenciar em células T *helper* tipo 1 (Th1), Th2 ou T regulatória (Treg). As células Th1 controlam infecções intracelulares e estão envolvidas em doenças inflamatórias. As células Th2 protegem o hospedeiro contra infecções de parasitas extracelular, mas também são responsáveis por resposta alérgica (NOVERR *et al.*, 2005; AKBARI *et al.*, 2002; ZUANY-AMORIM *et al.*, 2002) e contra helmintos.

Murali e colaboradores (1993) demonstraram que em processos de alergia/asma há um aumento de IgE específica e eosinofilia pulmonar em camundongos da linhagem BALB/c sensibilizados via intranasal e intraperitoneal com *Aspergillus fumigatus*. Kurup e colaboradores (1997) também relataram eosinofilia em sangue periférico e inflamação pulmonar com influxo de eosinófilos para o pulmão de camundongos expostos a antígenos solúveis de *A. fumigatus*, além de um aumento discreto de IgE total no soro. Neste mesmo trabalho, os autores mostraram um aumento no nível de expressão de mRNA para o gene de IL-5 de células de baço estimuladas com antígeno do fungo. Segundo Noverr e colaboradores (2005), o aumento dos níveis de eosinófilos, mastócitos, IL-5, IL-13, IFN- γ , IgE e células secretando muco caracterizam a resposta alérgica em pulmões.

A resposta Th2 é dominante pela produção de IL-4, IL-5 e IL-13 e leva a indução da resposta por IgE. Alérgenos e vários vermes eucarióticos induzem a resposta Th2 (PASARE & MEDZHITOV, 2004). O controle da alergia não é apenas uma questão do balanceamento Th1/Th2 da resposta imune. Foi demonstrado para antígenos de cogumelo, que contém substâncias altamente imunogênicas, ativação de PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) por esses antígenos e resposta Th2 dominante. Porém essa resposta foi influenciada por componentes celulares da imunidade inata que direcionaram a resposta adaptativa e induziram doenças alérgicas respiratórias (SAIKAI *et al.*, 2004).

Possivelmente, mecanismos que são restritos a resposta inflamatória são importantes na patogênese da inflamação e doenças das vias aéreas e outras, de células T regulatória que também desempenham um papel importante na regulação desses processos (AKBARI *et al.*, 2002; ZUANY-AMORIM *et al.*, 2002).

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi investigar o potencial alérgico de esporos de *Trichoderma stromaticum* em camundongos e o seu efeito em células da imunidade inata. Para isto teve como objetivos específicos:

Descrever a perfil histológico do tecido pulmonar de camundongos submetidos à exposição de esporos de *T. stromaticum* por via nasal;

Quantificar a produção de IgE total do sangue periférico de animais submetidos à inalação dos esporos de *T. Stromaticum*;

Quantificar a produção de citocinas (IFN- γ , IL-5 e IL-10) do lavado broncoalveolar e do sobrenadante da cultura de células do baço estimuladas com concanavalina A;

Avaliar os efeitos dos esporos de *T. Stromaticum* na funcionalidade de fagócitos peritoneais utilizando os seguintes parâmetros: viabilidade celular, produção de espécies reativas de oxigênio produção de óxido nítrico e expressão da proteína iNOS;

Determinar os níveis de expressão do mRNA de receptores de macrófagos e neutrófilos, incluindo Toll Like 2 e 4 (TLR-2, TLR-4) e Dectina-1 (Dec-1);

Avaliar o efeito sistêmico do esporo de *T. stromaticum* na resistência de camundongos à leishmaniose cutânea.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho apresentaram teor de pureza (P.A) elevado e foram provenientes dos seguintes fabricantes: Sigma Chem. Co, Amresco, Invitrogen, Merck, Bioehringer Mannheim, Difco, BDH Laboratory Supplies e Santa Cruz.

4.2. Obtenção de esporos do fungo *Trichoderma stromaticum*

O isolado do fungo *Trichoderma stromaticum* ALF 64, usado na preparação do Tricovab® (Cepec-Ceplac), foi gentilmente cedido pelo Dr. Alan Pomella (Almirante Cacau, Itajuípe, BA). O fungo foi cultivado em placas de Petri em meio Batata Dextrose Agar (BDA). Após 7 a 10 dias de cultivo, os esporos foram coletados através da lavagem da superfície micelial com PBS estéril. Os esporos foram contados em câmara hemocitométrica de Neubauer e foram utilizadas, nos experimentos *in vitro*, diluições contendo 1×10^3 ou 1×10^4 esporos. Alternativamente foram utilizados 1×10^4 esporos mortos por aquecimento, conforme descrito por HOLH e colaboradores (2005). Nos experimentos *in vivo*, foram utilizadas diluições contendo 1×10^5 .

4.3. Animais

Para os experimentos *in vivo* e *in vitro* foram utilizados camundongos fêmeas e machos entre 8 e 12 semanas de idade das linhagens BALB/c e C57Bl/6. Ambas as linhagens foram produzidas no Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e mantidos no biotério do Departamento de Farmácia – UFMG.

4.4. Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 3 experimentos:

1. Experimento *in vitro*: utilizou-se 3 camundongos fêmea da linhagem BALB/c com 8-12 semanas de vida;
2. Experimento *in vivo* – Teste de Alergia: utilizou-se 2 grupos de animais compostos por 5 camundongos fêmeas da linhagem BALB/c com 8-12 semanas de vida;
3. Experimento *in vivo* – *Leishmania major*: utilizou-se 2 grupos de animais compostos por 5 camundongos machos da linhagem C57Bl6 com 8-12 semanas de vida.

4.5. Comitê de Ética

O projeto para desenvolvimento da presente dissertação foi aprovado em 28 de junho de 2006 segundo os critérios éticos adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) protocolo 23/2006 (ANEXO I).

4.6. Ensaio *In Vitro*

4.6.1. Obtenção de neutrófilos peritoneais de camundongos

Para obtenção de neutrófilos peritoneais, camundongos BALB/c foram inoculados por via intraperitoneal com 2 mL de meio tioglicolato 3%. Após 3 a 4 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e, em seguida, 5 mL de PBS 1X foram injetados na cavidade peritoneal e recolhidos em seguida com seringa. A solução contendo células foi purificada em gradiente de Ficoll-Hypaque (densidade 1.114 g/mL), sendo centrifugada a 3500 rpm por 30 minutos a 24 °C

(REST & SPEERT, 1994). As células foram contadas em câmara hemocitométrica de Neubauer e alíquotas de 1×10^5 células foram utilizadas para ensaio de viabilidade, explosão respiratória e expressão gênica.

4.6.2. Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos

Para obtenção de macrófagos peritoneais, camundongos BALB/c foram inoculados por via intraperitoneal com 2 mL de meio tioglicolato 3%. Após 4 a 5 dias, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e em seguida, 5 mL de PBS 1X, gelado, foram injetados na cavidade peritoneal e recolhidos em seguida com seringa. O lavado rico em células peritoneais foi centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Após descarte do sobrenadante, as células foram diluídas em 5 mL de meio RPMI 1640 com 10% de Soro Fetal Bovino (RPMI/SFB) e gentamicina (40 mg/mL). As células foram contadas em câmara hemocitométrica de Neubauer e alíquotas contendo 1×10^5 células foram utilizadas para os ensaios de viabilidade, quantificação da produção de óxido nítrico, e quantificação dos níveis de expressão de proteína e mRNA.

4.6.3. Teste de viabilidade

O teste de viabilidade celular foi realizado pelo ensaio de MTT (3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium brometo) conforme descrito por Mosmann (1983). Este método colorimétrico consiste na capacidade da enzima desidrogenase mitocondrial nas células vivas reduzirem o sal MTT no produto colorido denominado formazana.

Para o ensaio, macrófagos e neutrófilos (1×10^5 células /poço) foram espalhados em placas de Petri de 96 poços juntamente com 1×10^3 , 1×10^4 esporos ou 1×10^4 esporos mortos. Após 24 horas, solução de MTT (10 µL/mL) foi adicionada e as células foram incubadas por 4 horas a 5% CO₂, 37 °C. Após este período, o sobrenadante foi descartado e as células foram lisadas com 150 µL de dimetilformamida em água com SDS 10% (1:1 v/v). A absorbância de 100 µL da solução foi lida a 570 nm e o resultado foi expresso como um percentual do controle definido como 100%.

4.6.4. Ensaio de quimioluminescência para avaliação da Explosão Respiratória

A maioria do oxigênio molecular (O_2) produzido dentro da célula é detectável por medições de quimioluminescência (DeCOURSEY & LIGETI, 2005). Os neutrófilos peritoneais (1×10^5) de camundongos controle ou submetido à interação com diferentes concentrações de esporos (1×10^3 , 1×10^4 esporos ou 1×10^4 esporos mortos) foram incubados com 5×10^{-4} M de luminol (*5-amino-2, 3-dihydro-1, 4-phthalazinedione*), na presença ou ausência de $1 \mu\text{g/mL}$ PMA DMSO (*Dimethyl sulfoxide*)/PBS 1:1. A reação foi realizada em PBS com 10% de soro fetal bovino em volume final de $100 \mu\text{L}$. A emissão de luz foi verificada em luminômetro LKB-Wallac 1250. As leituras foram feitas em intervalos de 1 minuto, durante 60 minutos. Os dados obtidos foram representados na forma gráfica utilizando o programa *Microsoft Excel*.

4.6.5. Quantificação da produção de Óxido Nítrico

Para dosagem de óxido nítrico, placas contendo 1×10^5 macrófagos/poço foram incubadas *overnight* a 37°C com 5% de CO_2 . Após 24 horas, o sobrenadante da placa foi substituído por meio RPMI/SFB tratado com 60 U/mL de Interferon-gama (IFN- γ), $0,1 \text{ ng/mL}$ de LPS (lipopolissacarídeo purificado de *Escherichia coli* 0127) e esporos nas seguintes condições: i) macrófagos em meio RPMI/SFB tratado; ii) macrófagos em meio RPMI/SFB tratado e 1×10^3 esporos; iii) macrófagos em meio RPMI/SFB tratado e 1×10^4 esporos; iv) macrófagos em meio RPMI/SFB tratado e 1×10^4 esporos mortos por aquecimento. Como controle, células e esporos foram utilizados nas mesmas condições, porém em meio RPMI na ausência do tratamento. Após 24 h de interação entre os macrófagos e as diferentes concentrações de esporos, o óxido nítrico foi determinado indiretamente pela quantificação do nitrito (NO_2^-) resultante de sua oxidação no sobrenadante de cultura de macrófagos através da reação colorimétrica de Griess. Para isso, combinou-se em placas de 96 poços, $100 \mu\text{L}$ do sobrenadante com $100 \mu\text{L}$ do reagente de Griess, mistura feita na hora do uso na proporção de 1:1 de 1% de sulfanilamida em 2,5% de H_3PO_4 e 0,1% de

diamina-di-hidroclorido naftaleno (NEED) em 2,5% de H₃PO₄ (HIBBS *et al.*, 1989). Após 10 minutos, a absorbância a 540 nm das diferentes amostras foi comparada com os valores da curva padrão, obtida pela dosagem de nitrito de sódio diluído em meio RPMI em concentrações que variaram de 2 a 200 µM.

4.6.6. SDS-PAGE e Western Blotting

Após 24 h de interação entre os macrófagos e as diferentes concentrações de esporos, em meio tratado ou não com IFN-γ e LPS, os macrófagos aderidos em placa de Petri foram removidos com 50 µL de tampão de lise (1% v/v triton X-100, 0,1 mM EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic Acid*) e 1% v/v aprotinina em 20 mM de tampão HEPES-NaOH, pH 7,5), o qual foi incubado a 4 °C por 30 minutos. O lisado foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos a 4 °C e armazenados a -20 °C até o uso (NODA & AMANO, 1997).

A proteína do lisado foi quantificada utilizando os reagentes para dosagem de proteína da *BIO RAD*, apropriado para amostras contendo detergente. A reação foi lida em espectrofotômetro a 214 nm, de acordo as especificações do fabricante. Em 10 µg de extrato celular, foi acrescentado tampão de amostra [1% de SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*), 5% de -mercaptoetanol, 20% de glicerol, 1 mM de EDTA e 0,05% de azul de bromofenol]. As amostras foram então fervidas por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida a 7,5% sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), e submetido à eletroforese a 200 V.

Para o *Western Blotting*, as proteínas fracionadas por SDS-PAGE foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose a 100 V, por 1 hora, em tampão de transferência (25 mM de Tris, 192 mM de glicina e 20% v/v de metanol). A membrana foi incubada com tampão de bloqueio (PBS contendo 5% de albumina bovina) por 1 hora à temperatura ambiente. Após este período, foi incubada novamente por 1 h com o anticorpo policlonal de coelho anti-iNOS de camundongo (Santa Cruz Biotechnology) (1:200) diluído em PBS contendo 0,05% de Tween 20 e 1% de albumina bovina (tampão do anticorpo). A membrana foi lavada 4 vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (tampão de lavagem) e incubada com um segundo anticorpo, anti-IgG de coelho conjugado com a enzima peroxidase, diluído 1:5000 em tampão do anticorpo ou anti-IgG de camundongo

na mesma diluição. Após 1 hora à temperatura ambiente, a membrana foi lavada 3 vezes com tampão de lavagem e 2 vezes com PBS. Para a revelação por autoradiografia foi utilizado o kit não radioativo ECL Plus, que é baseado na oxidação do luminol (diacilidrazida cíclico). As soluções foram misturadas de acordo com as especificações do fabricante e incubadas com a membrana por até 5 minutos. A membrana foi exposta a um filme de raios-X (X-OMAT, KODAK) por alguns segundos, que foi em seguida revelado.

4.6.7. Extração de RNA total de macrófagos e neutrófilos e síntese de cDNA

O RNA total dos macrófagos e neutrófilos (1×10^5 células/poço) foi isolado utilizando TRIzol[®] (Invitrogen). As células foram lisadas diretamente nas placas, homogeneizadas, e a solução foi transferida para tubos de 1,5 mL de volume. Após a adição de clorofórmio, os tubos foram centrifugados para separação das fases aquosa e orgânica. A fase aquosa contendo o RNA foi transferida para outro tubo ao qual foi adicionado álcool isopropílico para precipitação do RNA. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos. O sedimento formado foi lavado 1-2 vezes com etanol 75%, novamente centrifugado a 9000 rpm por 5 minutos e dissolvido em água Milli-Q estéril livre de RNase.

O RNA isolado foi tratado com 4 M de Cloreto de Lítio (LiCl) em 10 mM de Tris, 10 mM EDTA, pH 7,4 em igual volume de RNA. Os tubos foram refrigerados a -20 °C *overnight*. Após este período, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 10000 rpm, a 4 °C. O sedimento foi coberto com etanol 70% gelado e centrifugado a 12000 rpm por 30 minutos. O sedimento formado foi diluído em água Milli-Q estéril livre de RNase (NADERI, *et al.*, 2004).

A transcrição reversa foi efetuada empregando-se o kit *First Stand cDNA Synthesis*, seguindo as instruções do fabricante (Fermentas, EUA).

O cDNA (DNA complementar) fita simples foi quantificado em espectrofotômetro *GeneQuant*. Para isso, 2 µL de cDNA foi diluído em 98 µL de Tris-HCl 10mM, pH 7,4. As concentrações de cDNAs foram ajustadas para 10 µg/µL (macrófagos) e 20 µg/µL (neutrófilos) e usados na quantificação relativa por PCR em tempo real.

4.6.8. Quantificação Relativa de Transcritos

O RNA total de macrófagos e neutrófilos, após interação com as diferentes concentrações dos esporos de *T. stromaticum*, foi extraído conforme descrito anteriormente. O par de *primers* para a amplificação dos genes para TLR2, TLR4 e dectina-1, bem como para o gene controle (18S) foram desenhados com base na seqüência específica de cada gene disponível no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e são mostrados na Tabela 1. A quantificação relativa dos transcritos foi realizada por PCR em tempo-real (*ABI Prism 7700 Sequence Detection System*). Uma mistura de 20 µl de reação foi preparada para cada amostra de cDNA, e continha: 20 ng/uL de cDNA para neutrófilos ou 10 ng/uL de cDNA para macrófagos, 0,4 uL de cada *primer* (5 pmol), 10 uL de *Power SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems, EUA) e água Milli-Q autoclavada para o volume final de reação. O qRT-PCR foi realizado utilizando-se os seguintes passos: (1) ativação da Taq DNA polimerase a 50 °C por 2 minutos; (2) desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos; (3) desnaturação a 95 °C por 15 segundos; (4) anelamento 55 °C por 30 segundos, (5) extensão a 60 °C por 1 minuto. Os passos 3-5 foram repetidos por 40 ciclos.

A confirmação da amplificação de produtos específicos foi efetuada por análise de T_m utilizando-se o programa *Dissociation Curve 1.0* (Applied Biosystems, EUA). Para isso, as amostras foram aquecidas a 95 °C por 15 segundos, resfriadas a 55 °C por 30 segundos e o anelamento foi lido a 60 °C por 1 minuto.

Tabela 1: *Primers* para os genes de interesse desenhados a partir de seqüências obtidas no GenBank do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Gene	Forward (5' – 3')	Reverse (5' – 3')
18S	TTCGTATTGCGCCGCTAGA	CTTTCGCTCTGGTCCGTCTT

Dectina-1	CCTTGGAGGCCCATTCG	GCAACCACTACTACCACAAAGCA
TLR2	CACCACTGCCCGTAGATGAA	GCCTCGGAATGCCAGCTT
TLR4	GCAGCAGGTGGAATTGTATCG	TGTGCCTCCCCAGAGGATT

4.7. Experimentos *In Vivo*

4.7.1. Teste de Alergia

4.7.1.1. Grupos experimentais

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: grupo controle, que inalou 10 µL de PBS 1X (Solução Fosfato Tamponada) e grupo teste, que inalou 10 µL de PBS 1X contendo 1×10^5 esporos de *Trichoderma stromaticum*. Ambos os grupos inalaram as soluções 1 vez por semana durante 4 semanas.

Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c foram anestesiados utilizando-se ketamina e xilazina diluídos em PBS 1X estéril nas proporções de 1:1:4 (v/v/v). Em cada animal do grupo teste foram inoculados oralmente 10 µL de solução contendo 1×10^5 esporos em PBS 1X estéril. Para o grupo controle foi utilizada a mesma quantidade de PBS 1X estéril por animal. Após 24 horas da última inoculação os camundongos receberam uma dose subletal de anestésico e o sangue periférico, o lavado broncoalveolar (LBA) e os pulmões e o baço foram coletados.

4.7.1.2. Obtenção de sangue periférico e lavado broncoalveolar

Após anestesia foi coletado o sangue periférico usando pipeta Pasteur através de uma incisão na veia cava superior. O sangue coletado foi centrifugado a 8000 rpm por 10 minutos. O soro foi transferido para outro tubo de 1,5 mL e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da dosagem de IgE total.

Após coleta do sangue periférico, os animais foram submetidos à traqueostomia para coleta do lavado broncoalveolar (LBA). Um mililitro de PBS estéril e gelado foi injetado, via traquéia, nos pulmões dos animais.

Imediatamente após a injeção, o lavado foi recuperado e conservado em gelo. O LBA foi centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi armazenado a aproximadamente -4 °C até o momento da dosagem de citocinas.

4.7.1.3. Dosagem de IgE Total e citocinas

Para quantificar a produção de IgE total e citocinas produzidas por camundongos BALB/c expostos, por via nasal, a esporos de *T. stromaticum* foi utilizado o ensaio imunoenzimático (ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Resumidamente, uma placa de ELISA de 96 poços foi sensibilizada com solução de Rat antimouse IgE UNLB de Coating Buffer (1:250) e incubada *overnight* em câmara úmida a 4 °C. Após este período, a placa foi lavada com salina-Tween (salina fisiológica NaCl 0,15M contendo 0,05% de Tween 20) por 3 vezes, bloqueada com PBS-Caseína (Tampão Fosfato pH 7,2 com 0,25% de caseína) e incubada por 1 h a temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada por 3 vezes e o soro dos animais teste e controle foi adicionado. Após 2 h, a placa foi lavada por 5 vezes. O anticorpo Rat antimouse IgE Biotina (1:500) foi adicionado à placa e incubada por 1h a temperatura ambiente. Após este período, a placa foi lavada por 3 vezes e adicionado streptovidina-peroxidase diluída conforme instrução do fabricante. A placa foi incubada por 1 h a temperatura ambiente. Em seguida, foi lavada por 3 vezes e revelada, utilizando-se para isso, H₂O₂ com OPD diluído em tampão citrato pH 5 (4 mg de OPD com 2 µL de H₂O₂ a 30%). A reação foi bloqueada adicionando ácido sulfúrico 2N. A reação foi lida no leitor de microplacas BioRad Model 450, a 492 nm.

Para a dosagem de citocinas, placas de ELISA foram sensibilizadas com anticorpo específico para cada citocina a ser quantificada (IFN- γ , IL-5 e IL-10) e incubadas *overnight* em câmara úmida a 4 °C. Após este período, seguiram-se as mesmas etapas para a dosagem de IgE, substituindo o anticorpo Rat antimouse IgE Biotina (1:500) por anticorpos específicos biotinizados para cada citocina [IFN- γ (20µL/mL – Caltag®), IL-5 (1µL/mL) e IL-10 (10µL/mL) (1:500)]. Além disso, adicionou-se o branco (meio RPMI) e o padrão para cada citocina (5 ng/mL para IL-5 e 10 ng/mL para IL-10 e IFN- γ). A revelação e a leitura foram realizadas de maneira semelhante a utilizada.

4.7.1.4. Histologia do Pulmão

O pulmão esquerdo dos camundongos BALB/c foi retirado e fixado em formol 10% até o momento da confecção das lâminas histológicas. Após os procedimentos de rotina para desidratação em etanol e clarificação em xilol, os pulmões foram inclusos em parafina. Secções de 0,5 µm de espessura foram cortadas em micrótomo Layca, coradas pela técnica de hematoxilina-eosina e as lâminas examinadas em microscópio OLYMPUS B12 com objetivas de 40 vezes ou de imersão.

4.7.1.5. Cultura de células do baço

O baço dos animais dos grupos controle e teste foi retirado e macerado em 2 mL de meio RPMI (ambiente estéril). A solução foi centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi diluído em água estéril e imediatamente após acrescentou-se 10% do volume total de PBS 10X. A solução foi novamente centrifugada sob as mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi diluído em 1 mL de RPMI com SFB 10% e gentamicina (40 mg/mL).

As células (predominantemente linfócitos) foram contadas e 1×10^6 células/poço foram distribuídas em placas de cultura de 24 poços. Estas células foram estimuladas com Concanavalina A e mantidas a 37 °C com 5% de CO₂. Após 48h, IFN-γ, IL-5 e IL-10 foram dosados do sobrenadante da cultura de células pelo ensaio de ELISA.

4.7.2. Infecção *In Vivo* com *Leishmania major*

Camundongos machos da linhagem C57Bl6 foram anestesiados utilizando-se Ketamina e Xilazina diluídos em PBS 1X estéril nas proporções de 1:1:4 (v/v/v). Em cada animal do grupo teste foram inoculados oralmente 10 µL de

solução contendo 1×10^5 esporos em PBS estéril. Para o grupo controle foi utilizada a mesma quantidade de PBS estéril por animal. Foram realizadas 4 inoculações com intervalos de tempo de 7 dias. Cerca de 24 horas após a última inoculação foram injetados aproximadamente 1×10^6 protozoários de *Leishmania major* (formas promastigotas) na pata esquerda dos animais dos dois grupos.

Medições das patas esquerdas, inoculadas com *L. major*, e das patas direitas (não-inoculadas) foram realizadas semanalmente entre os dois grupos, utilizando-se para isso um paquímetro. O tamanho da lesão era determinado pela diferença entre a pata infectada e a contra lateral não infectada.

4.8. Documentação fotográfica

Para a documentação dos dados histológicos, utilizou-se o microscópio Leica DNRA2 e para o sistema de captura de imagem o software IM50.

4.9. Análise Estatística

Análise de Variância (ANOVA) e os testes T e de Tukey foram efetuados para determinar a diferença significativa entre os grupos, empregando-se o programa BioEstat 4.0. A significância foi avaliada utilizando valor $p < 0,05$ ou $< 0,01$. Cada tratamento conteve 3-6 repetições. Cada experimento foi repetido 2-4 vezes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Esporos de *Trichoderma stromaticum* sozinhos não causam alergia

As substâncias liberadas de fragmentos de micélio e esporos fúngicos quando inaladas e liberados nos pulmões de mamíferos podem desencadear inflamação das vias aéreas e/ou doenças alérgicas incluindo alveolite alérgica e asma, possivelmente devido aos seus constituintes protéicos (PYLKKÄNEN, *et al.*, 2004).

Apesar de já ter sido demonstrado a ausência de infectividade e toxicidade do fungo *T. stromaticum* para mamíferos (CASTRO *et al.*, 2001), seu papel na alergia ainda não foi estudado. Assim, para investigar se os esporos de *T. stromaticum*, na ausência de adjuvante, apresentam potencial para desencadear processos alérgicos das vias respiratórias foram avaliadas, em fêmeas de camundongos BALB/c expostos ou não aos esporos, características clínicas incluindo inflamação do tecido pulmonar, quantificação de IgE total e citocinas associadas à resposta de linfócitos Th1 e Th2.

5.1.1. Análise histológica do tecido pulmonar de camundongos BALB/c submetidos à inalação de esporos de *T. stromaticum*.

A análise histológica do tecido pulmonar de animais inoculados com esporos (**Fig. 3A e B**), ao contrário dos animais normais (**Fig. 3C**), mostrou uma intensa infiltração celular no tecido conjuntivo, preferencialmente naquele que compõe a parede de ductos como os bronquíolos e vasos sanguíneos. A infiltração celular na porção alveolar provocou uma diminuição evidente do espaço luminal e conseqüente desorganização da arquitetura destes alvéolos. Os neutrófilos foram as células predominantes no infiltrado celular. Além destes, estiveram presentes nos infiltrados os linfócitos e macrófagos, sendo estes muitas vezes observados com a presença de vacúolos fagocíticos.

5.1.2. Esporos de *T. stromaticum* não interferem na produção de IgE total

A elevação dos níveis de anticorpo IgE total no sangue periférico é uma característica clássica dos processos alérgicos para diferentes substâncias incluindo os alérgenos ambientais. Para avaliar a produção de IgE total, o sangue periférico dos animais teste e controle foi recolhido e centrifugado para a

obtenção do soro. Deste, foi quantificada a produção de IgE pelo ensaio de ELISA. Verificamos que os níveis de IgE no soro dos animais teste e controle foram de aproximadamente 0,6 pmol/ μ L mostrando que os esporos de *T. stromaticum* sozinhos não alteram a concentração de IgE total no soro de camundongos BALB/c quando comparados com o soro de animais controle (**Fig. 4**)

Em contraste aos esporos de *T. stromaticum*, o biopesticida *Metarhizium anisopliae* usado com adjuvante em camundongos BALB/c induziu resposta alérgica apresentando níveis elevados de IgE no soro e no LBA (WARD *et al.*, 1998). Em nossos dados, a produção similar de IgE por animais expostos ou não aos esporos de *T. stromaticum* pode estar associada à ausência de adjuvante, substância importante na potencialização da resposta alérgica a antígeno específicos. Vários modelos murinos de doenças alérgicas das vias aéreas utilizam a imunização sistêmica antes da exposição das vias aéreas ao alérgeno. Camundongos normais previamente sensibilizados com ovalbumina é o modelo animal mais estudado. Um outro modelo usando antígeno de *Aspergillus*, também usa imunização antes do desafio aéreo (HOGABOAM *et al.*, 2000 e MURALI *et al.*, 1993). Porém, já foi demonstrado em *Aspergillus*, proteínas alergênicas com atividade de protease que podem estimular resposta Th2 das vias aéreas na ausência de adjuvantes (KHERADMAND *et al.*, 2002).

Um estudo interessante mostrou que um mesmo alérgeno pode influenciar a maior ou menor produção de IgE e IL-5 a depender da via de sensibilização com o antígeno (REPA *et al.*, 2004). Neste estudo, os autores demonstraram que os camundongos sensibilizados por via subcutânea e posteriormente expostos por via aérea ao antígeno, apresentaram uma maior produção de IgE e IL-5 ao contrário dos animais sensibilizados por via aérea. No entanto, os mesmo autores citam Nelde para mostrar que este encontrou níveis elevados de IgE no soro de animais que foram sensibilizados por instilação do antígeno via intranasal, contradizendo os seus achados. Em uma observação pessoal, Repa (2004) sugere que essa diferença pode ser explicada pelo fato de que a sensibilização pela instilação de antígeno intranasal pode disponibilizar uma maior quantidade de antígenos em comparação a sensibilização pela aplicação de aerosol, utilizada por ele.

Em nosso estudo, buscávamos avaliar se os esporos do fungo isoladamente eram capazes de induzir algum tipo de resposta nas vias aéreas dos camundongos e/ou causar alergia nesses animais modelos. Assim, a sensibilização e as exposições foram realizadas por via aérea e sem adjuvante. Estudos futuros, utilizando adjuvante e vias distintas de inoculação de antígenos podem esclarecer se os esporos de *T. stromaticum* apresentam ou não potencial alérgico.

5.1.3. Regulação local e sistêmica da produção de citocinas por esporos de *T. stromaticum*.

O processo alérgico das vias aéreas é controlado por diversos fatores. Segundo Noverr e colaboradores (2005), a presença de eosinófilos e mastócitos, associado a produção de IL-5 e IL-10 (AKBARI *et al.*, 2002 & ZUANY-AMORIM *et al.*, 2002) sugere um predomínio de células do tipo Th2, as quais participam da resposta alérgica. Já foi demonstrado que a expressão local de IFN- γ no pulmão aumenta a inflamação alérgica das vias aéreas mas diminui a resposta exacerbada em modelo murino de alergia/asma (KOCH *et al.*, 2006).

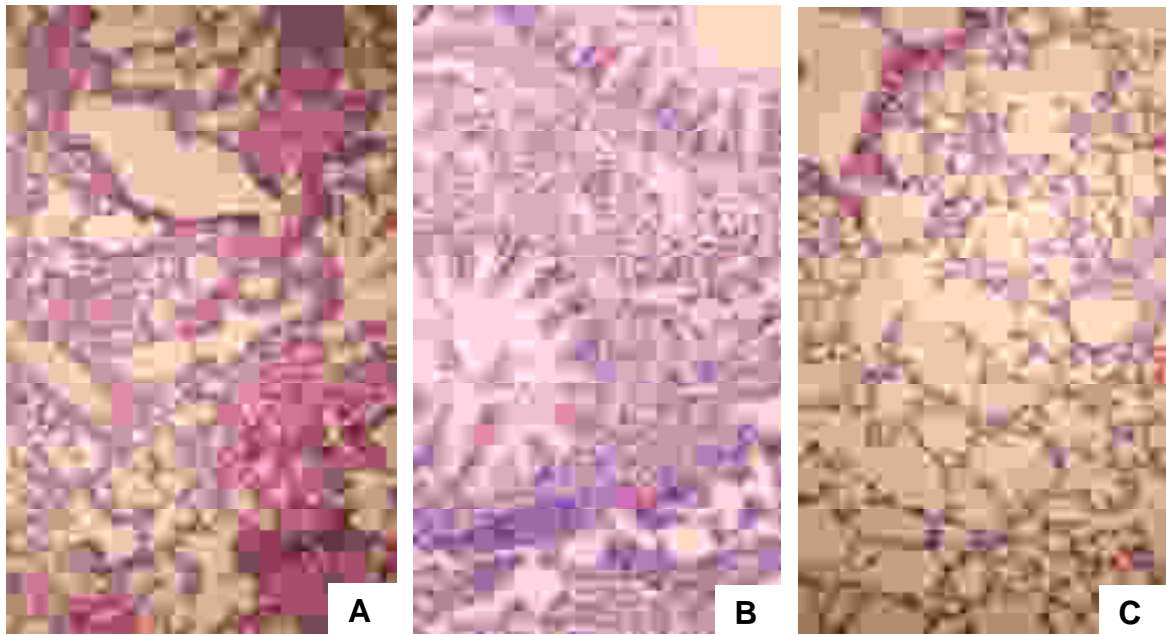


Figura. 3: Histologia de pulmão de camundongos BALB/c submetido ou não a inalação de esporos de *T. stromaticum*. Após desidratação em etanol, clarificação em xilol e inclusão em parafina, secções dos pulmões medindo 5 μ m de espessura, coradas pela técnica de HE, revelaram intensa infiltração celular (A) no tecido conjuntivo próximo aos ductos respiratórios e vasos sanguíneos. Em B, observam-se alvéolos com infiltrado celular e macrófagos alveolares. Em C, histologia normal. Aumentos totais: A: 100X, B: 400X e C: 100X.

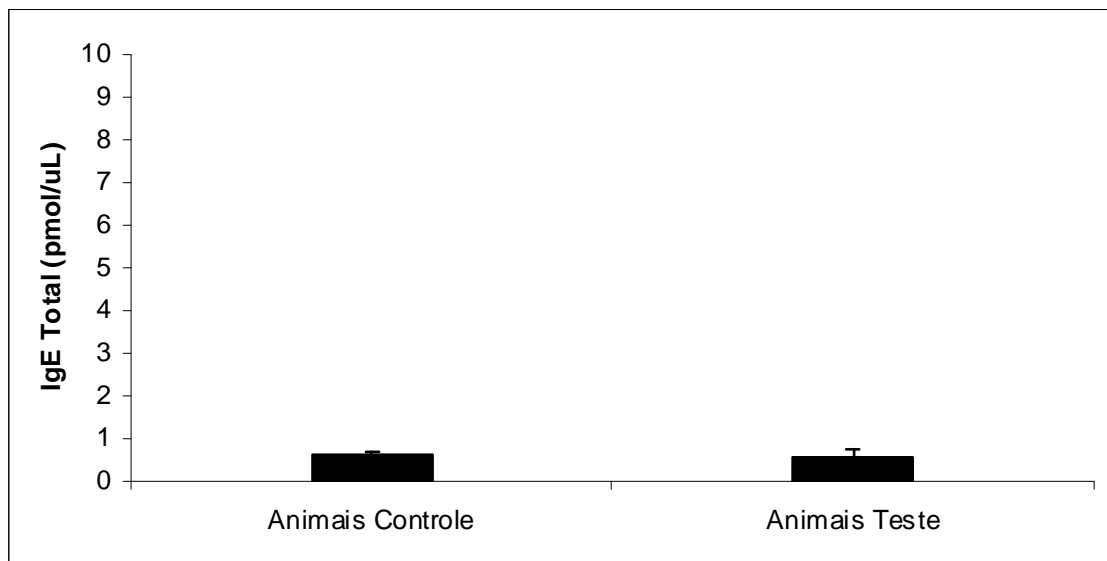


Fig. 4: Produção de IgE total de sangue periférico de camundongos submetidos ou não a inalação com esporos de *T. stromaticum*. Fêmeas de camundongos BALB/c inalaram 1×10^5 esporos de *T. stromaticum*, uma vez por semana, durante 4 semanas. Os animais controle inalaram solução salina 1X durante o mesmo período. Após este período foi coletado sangue periférico e a produção de IgE total foi quantificada, pelo ensaio de ELISA. As barras representam o desvio padrão.

Murali (1993), Kurup e colaboradores (1997) também relataram que em processos alérgico há um aumento de IgE e eosinofilia. Kurup (1997) relatou ainda que células de baço estimuladas com antígenos do fungo de *Aspergillus fumigatus* apresentam um aumento na expressão do gene de IL-5.

A regulação positiva da resposta Th2 é um fator que apresenta grande contribuição para as características fisiopatológicas e imunológicas dos processos

alérgicos. Já foi demonstrado por alguns autores o envolvimento de citocinas, IL-4, IL-5, IL-13, do perfil Th2, no desenvolvimento de resposta induzida por alérgenos. Embora ambas, IL-4 e IL-5, sejam de grande importância no desenvolvimento da inflamação, elas exercem funções bem distintas. Enquanto a IL-5 recruta e ativa eosinófilos, a IL-4 é responsável por promover a mudança de isotipo de imunoglobulina para classe IgE em plasmócitos (ROMAGNANI, 2004; KIPS, 2001; FINKELMAN *et al.*, 1988).

Nosso interesse foi investigar se os esporos regulam a produção local e sistêmica de citocinas. Para este estudo foram selecionadas, citocinas típicas da resposta Th1 (IFN- γ) e Th2 (IL-5), e a citocina regulatória IL-10. As três citocinas foram quantificadas pelo ensaio de ELISA no BAL e no sobrenadante de cultura de células do baço de animais testes e controle, na presença ou ausência de concanavalina. Os dados obtidos das dosagens de IFN- γ e IL-5 tanto do LBA (**Fig. 5**), como no sobrenadante da cultura de células do baço (**Fig. 6**) mostraram que não há diferença na produção dessas duas citocinas por animais teste e controle. No LBA, enquanto a IL-5 detectada apresentou níveis muito baixos, a produção de IFN- γ foi de aproximadamente 500 pg/mL. Na presença de concanavalina A, as células da cultura de baço de animais controle e teste produziram aproximadamente 150 pg/mL de IL-5. Já para IFN- γ , animais controle produziram quase 12 ng/mL e animais teste produziram 7 ng/mL. Apesar de parecer existir uma tendência a inibição da produção de IFN- γ por células do baço de animais expostos a inalação dos esporos de *T. stromaticum* (**Fig. 6A**), o teste estatístico demonstrou não ser significativa a diferença.

Interessantemente, em animais teste, a produção da citocina IL-10 foi regulada negativamente tanto no LBA (**Fig. 5**) como no sobrenadante de cultura de células do baço tratadas com concanavalina A (**Fig. 6C**), esse último resultado sugere a possibilidade de ação sistêmica do esporo de *T. stromaticum*. A IL-10 é um importante modulador negativo da resposta imune e é secretado por vários tipos celulares, incluindo macrófagos, queratinócitos, células B e linfócitos Th1 e Th2. (MOORE *et al.*, 1993). Já está bem estabelecido a ação inibitória de IL-10 na expressão dos níveis pós-transcricionais e transcricionais e conseqüentemente na síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, a IL-10 parece estar envolvida nos mecanismos inibitórios da fosfodiesterase 4 (PDE4) por ação

direta (KAMBAYASHI *et al.*, 1995) ou via aumento de cAMP (Adenosina Monofosfato cíclica) (EIGLER *et al.*, 1998). Dados obtidos em estudos realizados com ratos mostraram que PDE4 pode ser regulada positivamente no pulmão e exerce uma função na patogênese de processos alérgicos das vias respiratórias. Os dados mostraram uma correlação significativa entre o aumento da atividade de PDE4 e o aumento na produção de IL-4 (TANG *et al.*, 2005).

Em conjunto, nossos estudos de alergia em camundongos BALB/c mostraram que os esporos do biofungicida *Trichoderma stromaticum* sozinho não desencadeiam processo alérgico.

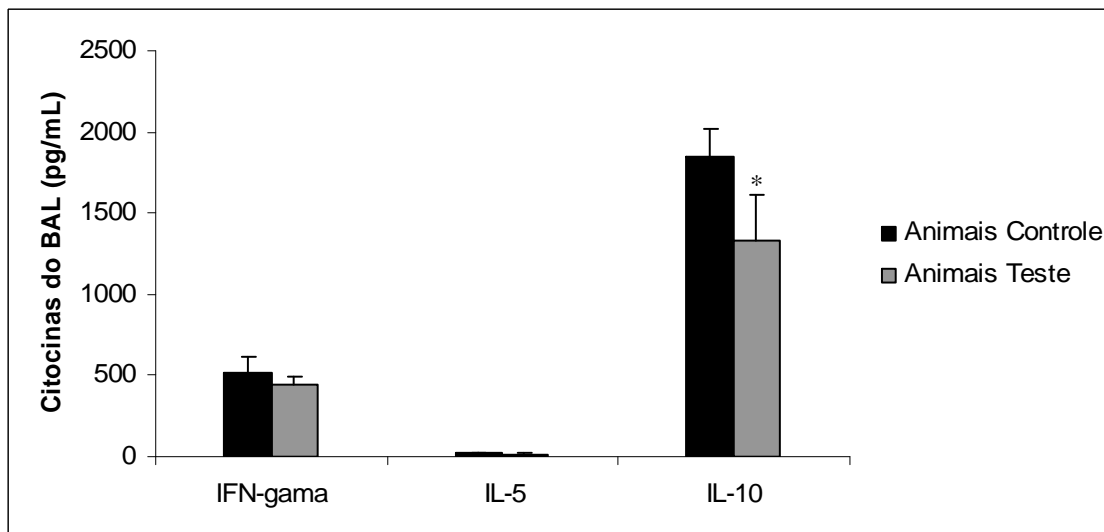


Fig. 5: Produção de citocinas de Lavado Broncoalveolar (LBA) de camundongos submetidos ou não a inalação com esporos de *T. stromaticum*. Fêmeas de camundongos BALB/c inalaram 1×10^5 esporos de *T. stromaticum*, uma vez por semana, durante 4 semanas. Os animais controle inalaram solução salina 1X durante o mesmo período. Após este período foi coletado o LBA e quantificada as concentrações das citocinas IFN- γ , IL-5 e IL-10 por ELISA. Onde as barras representam o desvio padrão e o asterisco (*) $p < 0,05$.

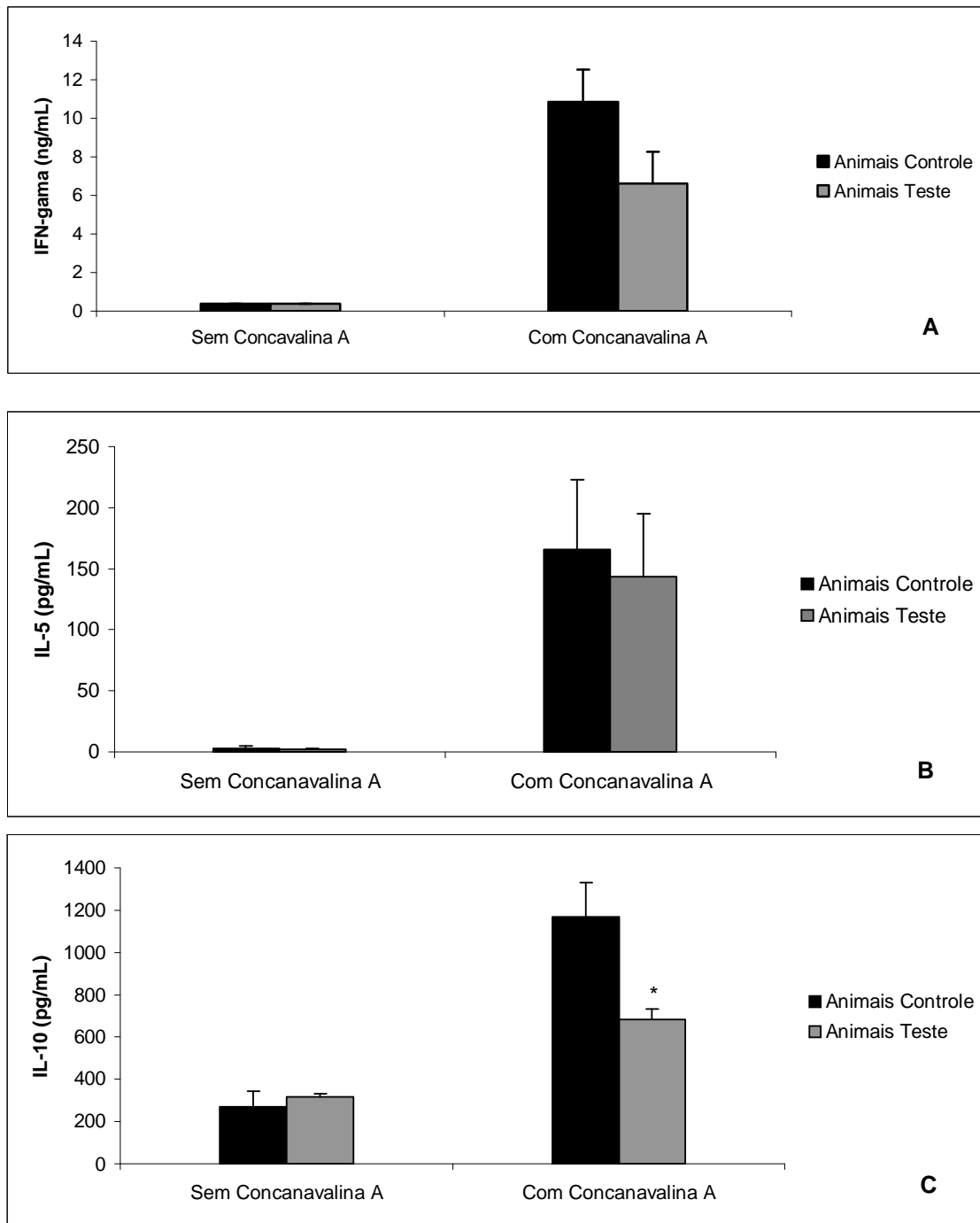


Fig. 6: Produção de citocinas no sobrenadante de cultura de células de baço de camundongos BALB/c submetido ou não a inalação de esporos de *T. stromaticum*. Células de baço de animais que inalaram ou não (controle) esporos de *T. stromaticum* foram tratadas com concanavalina A por 48h em 5% de CO₂ a 37 °C. Após este período, as citocinas IFN- , IL-5 e IL-10 foram quantificadas, por ELISA, no sobrenadante da cultura de células. Onde as barras representam o desvio padrão e o asterisco (*) $p < 0,05$.

5.2. Explosão respiratória de neutrófilos é inibida por esporos de *T. stromaticum*

Dentre as células da imunidade inata, os neutrófilos são os primeiros a migrarem para o local da infecção (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Um dos principais mecanismos microbicidas utilizados por esses fagócitos é a explosão respiratória, processo pelo qual ocorre aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (ROOS *et al.*, 2003).

Devido ao fato dos neutrófilos terem sido as células presentes em maior quantidade no LBA nosso interesse foi investigar a ação de *T. stromaticum* sobre os neutrófilos de camundongos expostos aos esporos. Após coleta, purificação e interação dos neutrófilos com os esporos, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico usando o MTT. Os resultados obtidos mostraram que esporos de *T. stromaticum* não são citotóxicos para neutrófilos peritoneais. Estes permaneceram viáveis após interação com as diferentes concentrações dos esporos (**Fig. 7**).

Uma vez viáveis, a funcionalidade dos neutrófilos submetidos à interação com esporos de *T. stromaticum* foi determinada por ensaio de quimiluminescência, o qual quantifica a capacidade das células produzirem os ROS. Nós verificamos que os esporos de *T. stromaticum* inibem, de forma dose dependente, a produção desses radicais por neutrófilos ativados com PMA (**Fig. 8A**). A leitura, no tempo de 10 minutos, referente à explosão respiratória dos neutrófilos incubados com esporos na concentração de 1×10^4 (10 células/esporo) foi aproximadamente 5 vezes menor que neutrófilos sem esporos. Quando se utilizam 1×10^4 esporos mortos pelo aquecimento, a leitura da atividade de produção de ROS é inibida em apenas aproximadamente 1,25 vezes como observada pelo gráfico de resultado da área embaixo das curvas (**Fig. 8B**).

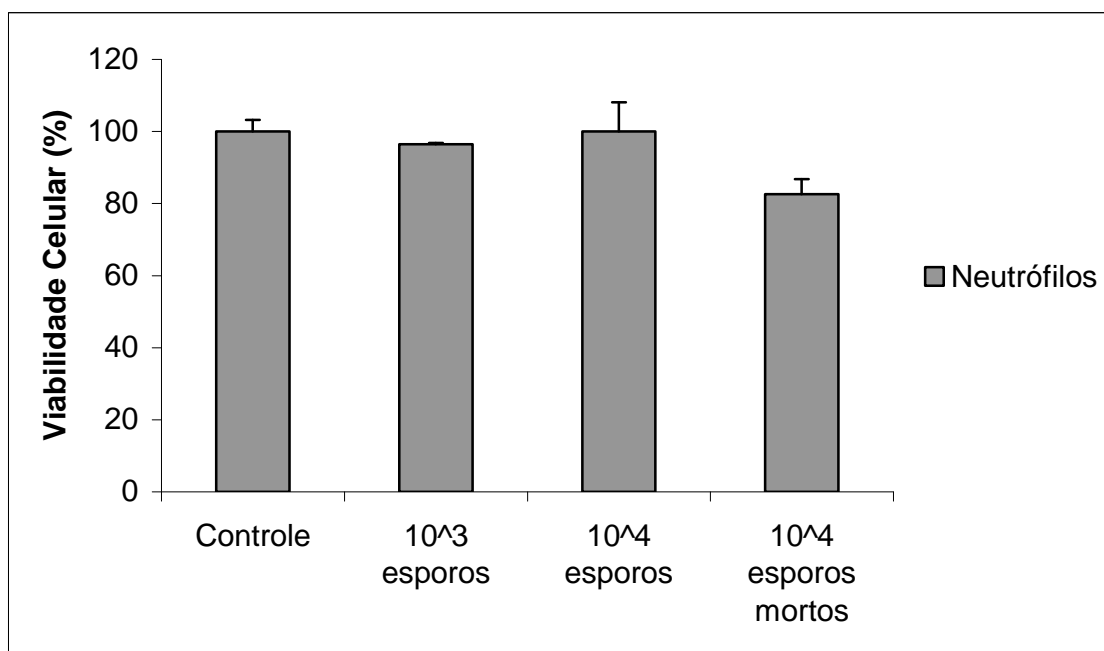


Fig. 7: Viabilidade de neutrófilos de camundongos BALB/c após interação com diferentes concentrações de esporos de *T. stromaticum*. Neutrófilos peritoneais foram cultivados na ausência e na presença de esporos do fungo *T. stromaticum* em diferentes concentrações (1×10^3 , 1×10^4 esporos ou 1×10^4 esporos mortos). Após 24 horas a viabilidade celular foi avaliada adicionando $10 \mu\text{g/mL}$ de MTT. Os cristais formados pela metabolização mitocondrial deste composto foram dissolvidos em dimetilformamida e a solução foi lida em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 570 nm. Onde as barras representam o desvio padrão.

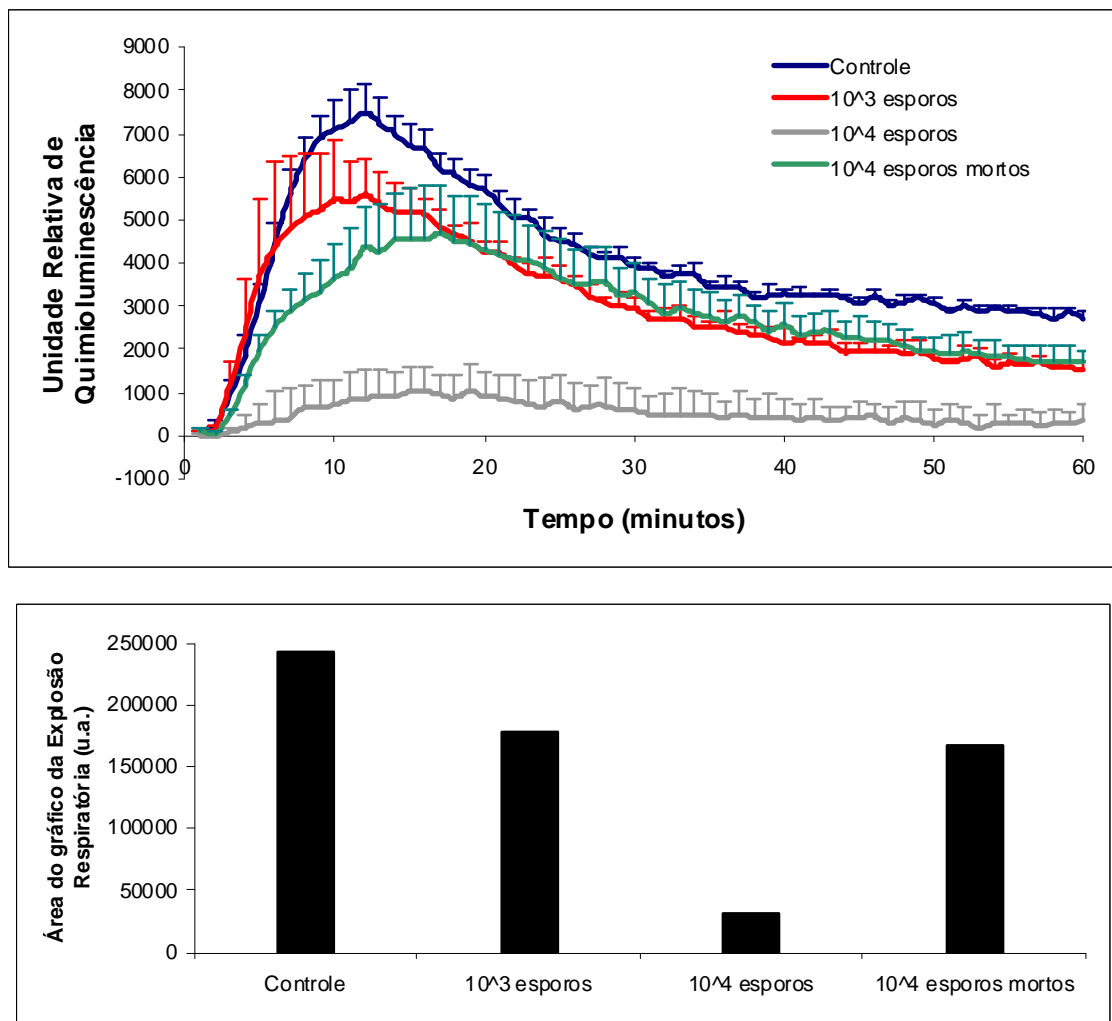


Fig. 8: Efeito das diferentes concentrações de esporos de *T. stromaticum* na explosão respiratória de neutrófilos de camundongos BALB/c. (A) Neutrófilos peritoneais de camundongos interagindo com diferentes concentrações de esporos (1×10^3 , 1×10^4 ou 1×10^4) tiveram sua explosão respiratória avaliada através do ensaio de quimiluminescência. Os neutrófilos foram incubados com 2×10^{-5} M de luminol na presença de $1 \mu\text{g/mL}$ de PMA. Imediatamente após a adição dos dois componentes, a emissão de luz foi lida em luminômetro durante 60 minutos com intervalos de tempo de 1 minuto. Onde as barras representam o desvio padrão. (B) O gráfico foi obtido a partir do cálculo da área sob o gráfico da explosão respiratória (A). Para isso, utilizou-se a fórmula: $I = h [f_2 + f_3 + \dots + f_{(n-1)}] + (f_1 + f_n) h/2$. Onde: I = área sob a curva; h = intervalo de tempo e f_1, f_2, \dots, f_n = unidades de leitura nos tempos 1, 2, ..., n . (n medidas) e a unidade é dada por u.a. (unidade de área).

A produção de ROS por neutrófilos depende da interação inicial do microrganismo invasor e o processo de fagocitose (DeCOURSEY & LIGETI, 2005). Os neutrófilos interagem com o microrganismo através de receptores de membrana (PRRs) que reconhecem PAMPs em patógenos. Um desses receptores, a dectina-1, quando ativado é capaz de iniciar uma sinalização intracelular para a produção de ROS e posterior eliminação do patógeno (GANTNER *et al.*, 2003 e UNDERHILL *et al.*, 2005).

A Dectina-1, o principal receptor para β -glucan de fungos expresso na superfície de macrófagos e neutrófilos e outros tipos celulares (TAYLOR *et al.*, 2002) interage com TLR-2 para a produção de mediadores inflamatórios (GANTNER *et al.*, 2003 e BROWN *et al.*, 2003). Já foi demonstrado que o reconhecimento de β -glucan, liberado de esporos, por dectina-1 de macrófagos alveolares pode induzir a liberação de TNF- α , a qual inicia a resposta inflamatória no pulmão (HAVAUX, *et al.*, 2005).

A inibição de ROS por esporos de *T. stromaticum* observada em nossos resultados pode estar relacionada à presença de moléculas da superfície do fungo que ao interagir com receptores em neutrófilos interferem na via de sinalização importante para explosão respiratória dessas células. Dessa forma, o nosso próximo passo foi avaliar os níveis de expressão de PRRs em neutrófilos incubados com *T. stromaticum*. As células incubadas, com as diferentes concentrações de esporos, por 24 horas foram utilizadas para quantificar a expressão relativa dos transcritos para os genes que codificam dectina-1 e TLR2 por PCR em tempo real. Os resultados mostraram que 1×10^4 esporos inibiram significativamente a transcrição dos genes de Dectina-1 e TLR2 quando comparados ao controle (**Fig. 9**). Entretanto, enquanto a expressão de Dectina-1 foi normal quando se utilizou esporos mortos, a expressão de TLR2 continuou sendo inibida pelos esporos inativados.

A sinalização de dectina-1 e TLR2 podem estar integradas, ocorrendo um recrutamento de quinase pela dectina-1 e subsequente fosforilação pelo TLR2 (ARBIBE *et al.*, 2000; SHIMAZU *et al.*, 1999). A inibição da produção de ROS por neutrófilos observada em nossos resultados pode ser um reflexo da inibição de dectina-1 e TLR2. Relatos de Underhill (2007) mostram que o receptor Dectina-1 não reconhece esporos metabolicamente inativos (aquecimento) de *Aspergillus*.

Esse relato parece ser evidenciado também em nossos experimentos para o receptor Dectina-1, mas não para TLR2.

Estudos descreveram que a produção de ROS é induzida exclusivamente pelo receptor dectina-1 (GANTNER *et al.*, 2003 e UNDERHILL *et al.*, 2005). Ao contrário, outros relataram que dectina-1 e TLR2 parecem estar co-localizados e que formariam uma espécie de complexos de sinalização para a produção de ROS (ARBIBE, *et al.*, 2000; SHIMAZU, *et al.*, 1999). Os nossos resultados referentes à produção de ROS, expressão dos receptores dectina-1 e TLR2 na presença de esporos mortos tendem a confirmar os achados de Arbibe e Shimazu, pois se a produção de ROS de neutrófilos incubados com *T. stromaticum* mortos fosse induzida exclusivamente por dectina-1, tal produção deveria ser igual ao dos neutrófilos controle. Os dados nos permitem sugerir que se a produção de ROS ocorre em resposta a um balanço da expressão, indução e associação de ambos os receptores, a expressão de TLR2 em neutrófilos incubados com esporos de *T. stromaticum* mortos é essencial para a produção normal de ROS.

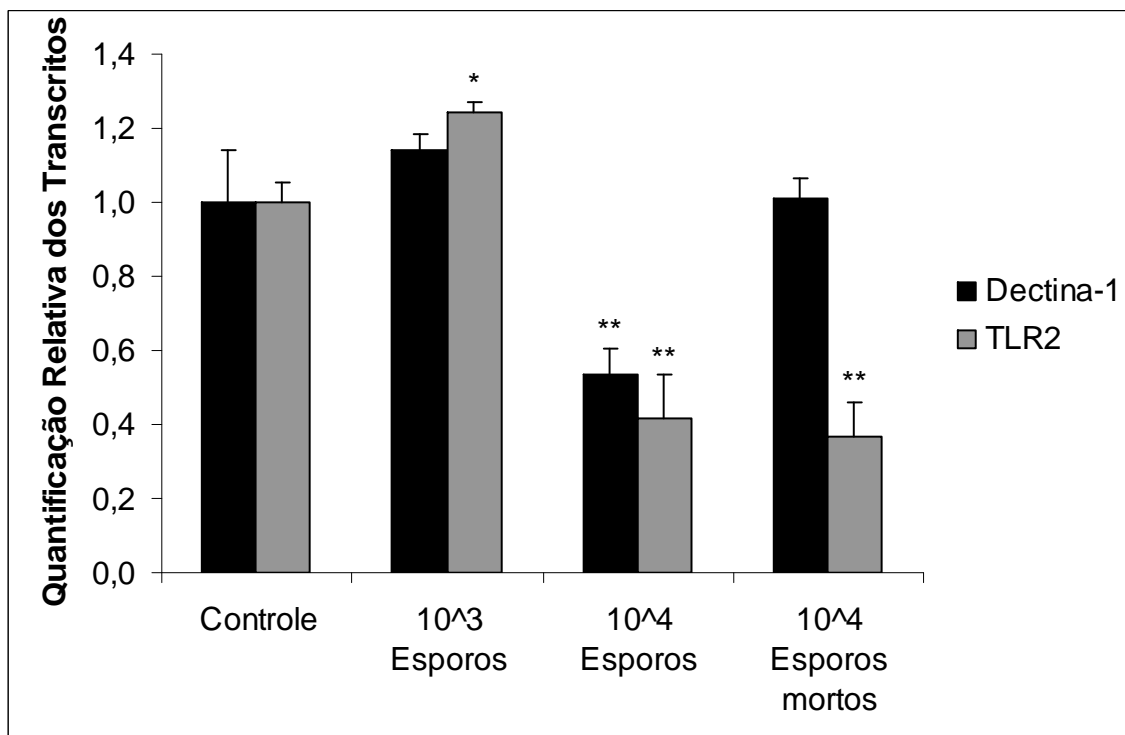


Fig. 9: Expressão relativa de mRNA de neutrófilos de camundongos BALB/c para o gene Dectina-1 e TLR2. Neutrófilos peritoneais de camundongos interagiram com diferentes concentrações de esporos (1×10^3 , 1×10^4 esporos ou 1×10^4 esporos mortos). Após 24h, o mRNA total foi extraído e transcrito reversamente como descrito em Material e Métodos. A quantificação relativa dos transcritos foi realizado em PCR em tempo real para o gene Dectina-1 e TLR2. Onde as barras representam o desvio padrão e os asteriscos * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

5.3. Inibição da produção de NO de macrófagos por *T. stromaticum* parece não ser dependente de TLR 4

Os macrófagos têm um papel importante no combate a microrganismos invasores, realizando fagocitose e produzindo substâncias tóxicas como o óxido nítrico, radical gasoso, que elimina principalmente microrganismos intracelulares (STUEHR & MARLETTA, 1985). Esse radical constitui um dos principais mecanismos microbicidas de macrófagos.

Assim como os neutrófilos, os macrófagos interagem com o microrganismo através de receptores de membrana reconhecendo os PAMPs. A sinalização intracelular para a transcrição do gene iNOS e conseqüente produção de NO depende de receptores, como TLR4 (SCHILLING *et al.*, 2002 e TOSHCHACOV, *et al.*, 2002). Para avaliar a ação dos esporos de *T. stromaticum* sobre os macrófagos, o lavado peritoneal de camundongos BALB/c foi recolhido e as células submetidas à interação com diferentes concentrações de esporos vivos ou mortos por aquecimento. Após 24 h de interação, foram avaliadas a viabilidade celular e a produção de NO dos macrófagos. Nós verificamos que esses fagócitos também permaneceram viáveis após interação com as diferentes concentrações do esporo (**Fig 10**). A partir desses dados, o papel dos esporos de *T. stromaticum* na interação com macrófagos foi avaliado pela quantificação da produção de NO produzida por células tratada com IFN- γ e LPS, potentes indutores da expressão de iNOS.

A produção de NO por macrófagos foi totalmente inibida na maior concentração de esporos (1×10^4 esporos). Entretanto, essa produção não sofreu alteração quando as células interagiram com esporos mortos por aquecimento (**Fig. 11**). Esses dados juntamente com os resultados de inibição de ROS produzido por neutrófilo demonstram o potencial dos esporos de *T. stromaticum* em regular negativamente os mecanismos microbicidas de fagócitos.

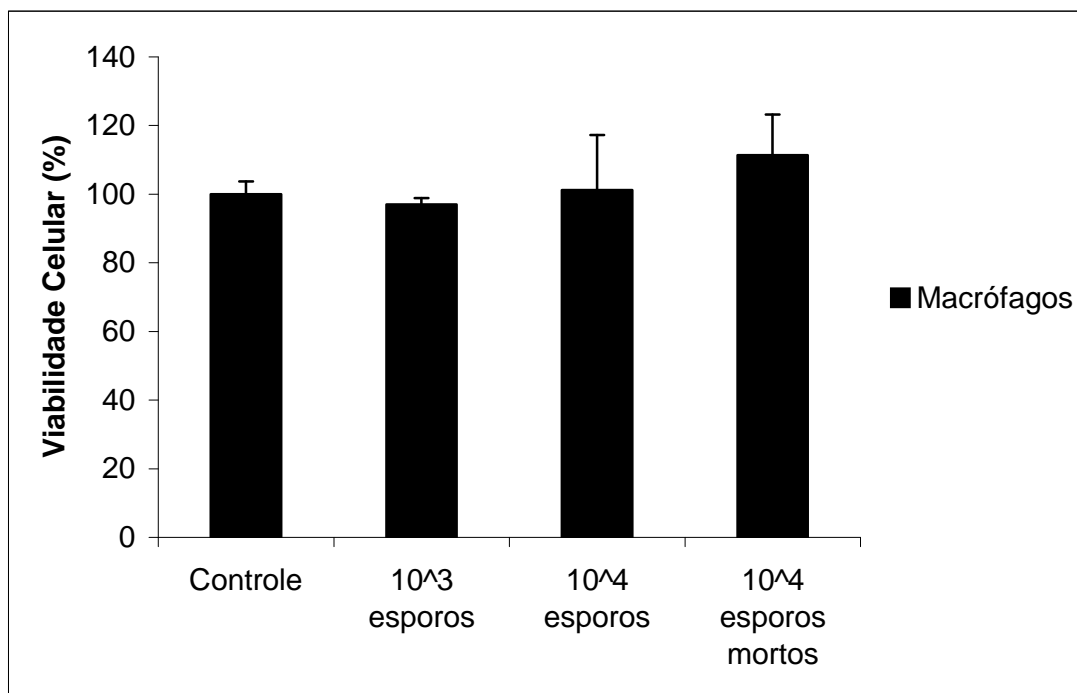


Fig. 10: Viabilidade de macrófagos de camundongos BALB/c após interação com diferentes concentrações de esporos de *T. stromaticum*. Macrófagos peritoneais foram cultivados na ausência e na presença de esporos do fungo *T. stromaticum* em diferentes concentrações (1×10^3 , 1×10^4 esporos ou 1×10^4 esporos mortos). Após 24 h, a viabilidade celular foi avaliada adicionando-se $10 \mu\text{g/mL}$ de MTT. Os cristais formados pela metabolização mitocondrial deste composto foram dissolvidos em dimetilformamida e a solução foi lida em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 570 nm. Onde as barras representam o desvio padrão.

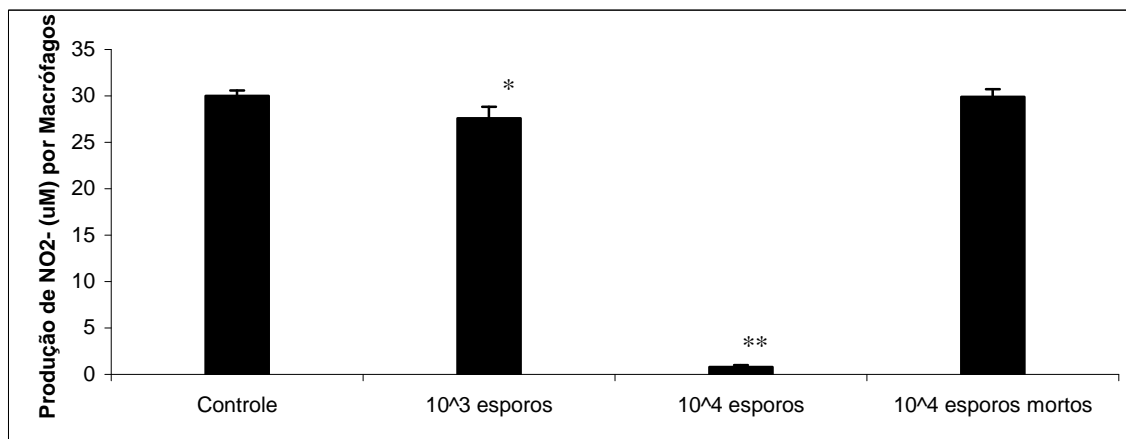


Fig. 11: Produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c em resposta ao *T. stromaticum*. Macrófagos peritoneais de camundongos foram tratados com 60U/mL de IFN- e 0,1 ng/mL de LPS e esporos em diferentes concentrações (1×10^3 , 1×10^4 esporos ou 1×10^4 esporos mortos). Após 24 h, a produção de óxido nítrico foi dosada no sobrenadante através da reação de Griess. A solução foi lida em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 540 nm. Onde as barras representam o desvio padrão e os asteriscos, * $p < 0.05$ e ** $p < 0,01$.

Com a intenção de esclarecer se a redução na produção de NO, induzida por esporos de *T. stromaticum*, é reflexo da inibição dos níveis de expressão da enzima iNOS, proteínas totais de macrófagos foram coletadas após 24 h de interação entre as células e as diferentes concentrações do esporo. Em seguida, 10 µg de proteína total foram submetidas à SDS-PAGE e usadas para ensaio de *Western Blotting*. A revelação da membrana após incubação com anticorpo anti-iNOS mostrou que a maior concentração de esporos (10^4) interfere na expressão de iNOS levando a níveis extremamente reduzidos (**Fig. 12**). Essa redução reflete perfeitamente os níveis do NO quantificados pela reação de Griess. Ao contrário, a expressão de iNOS por macrófagos tendeu a voltar a normalidade quando a interação foi feita com esporos mortos (**Fig. 12**). Esse resultado sugere fortemente a interferência de moléculas de superfície dos esporos na regulação negativa da via de sinalização da expressão da proteína iNOS.

Alguns estudos mostraram que a expressão de iNOS é resultado da ativação de receptores de membranas, como o TLR4 principalmente por LPS e a sinalização induzida por este receptor é essencial na ativação da transcrição do gene de iNOs (SCHILLING *et al.*, 2002 e TOSHCHACOV, *et al.*, 2002). Dessa forma a quantificação relativa por PCR em tempo real para o gene de TLR4 foi a nossa próxima investigação. A **Figura 13** mostra que, comparado ao controle, os esporos inibiram significativamente a expressão de TLR4 na maior concentração testada (1×10^4), inclusive para os esporos mortos. Apesar da expressão de TLR4 em macrófagos apresentar uma tendência a aumentar na presença de 10^3 esporos em relação ao controle, essa diferença não foi significativa (**Fig 13**).

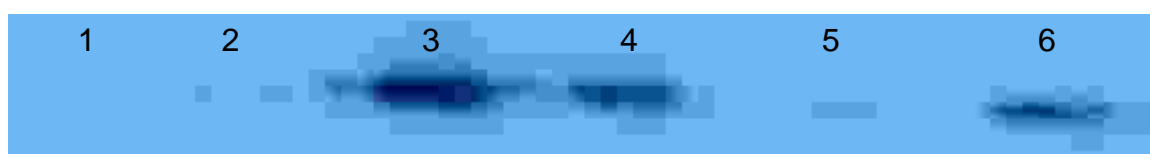


Fig. 12: Efeito das diferentes concentrações de esporos de *T. stromaticum* na expressão de iNOS por macrófagos de camundongos BALB/c. Após dosar a produção de óxido nítrico no sobrenadante da cultura de células. Proteínas totais foram extraídas, quantificadas via ensaio colorimétrico e 10 µg foram submetidas à análise via *Western Blotting* para a proteína iNOS. Onde: 1. Controle (célula e meio); 2. Controle 2 (célula, meio e 10^4 esporos); 3. Controle positivo (célula tratada); 4. Célula tratada e 10^3 esporos; 5. Célula tratada e 10^4 esporos e 6. Células tratadas e 10^4 esporos mortos.

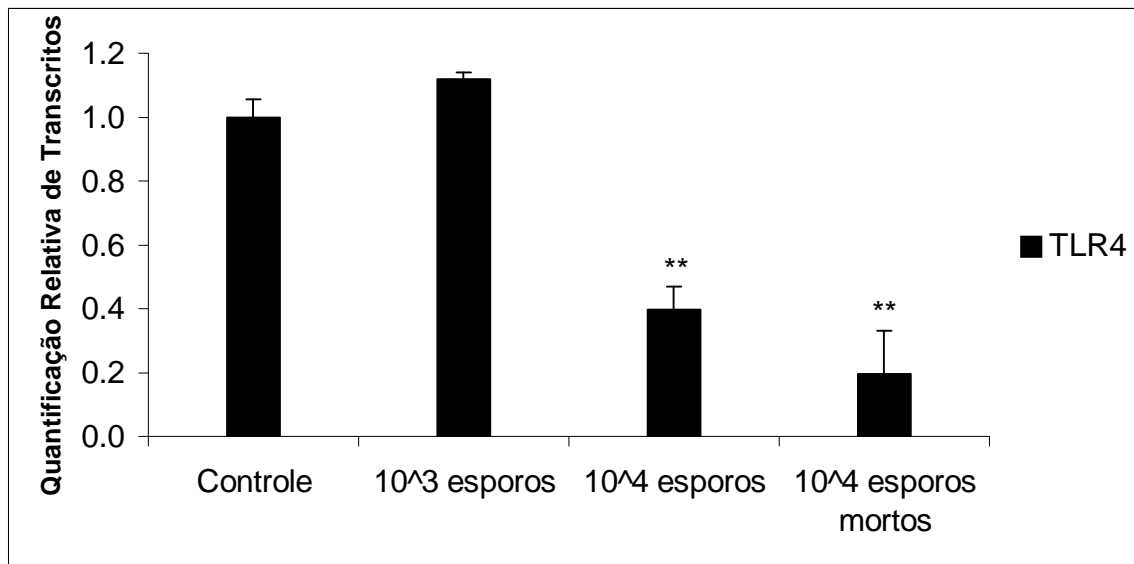


Fig. 13: Expressão relativa de mRNA de macrófagos de camundongos BALB/c para o gene TLR4. Macrófagos peritoneais de camundongos (10^5 células) interagiram com diferentes concentrações de esporos (1×10^3 , 1×10^4 esporos ou 1×10^4 esporos mortos). Após 24 h, o mRNA total foi extraído e o cDNA sintetizado como descrito em Material e Métodos. A quantificação relativa dos transcritos de Toll 4 foi realizada por PCR em tempo real. Onde as barras representam o desvio padrão e os asteriscos (**) $p < 0,01$.

5.4. Esporos de *Trichoderma stromaticum* contribuem para exacerbação da lesão causada por *L. major* em camundongos resistentes.

Os dados obtidos em nossos estudos mostraram que embora esporos de *T. stromaticum* sozinhos não apresentam potencial alérgico, eles são capazes de inibir os mecanismos microbicidas de fagócitos, regular negativamente a expressão de receptores de membrana dessas células, além de inibir a produção sistêmica de citocina regulatória. Esse conjunto de resultados sugere fortemente a existência de moléculas imunossupressoras na superfície dos esporos de *T. stromaticum* permitindo-nos elaborar a hipótese de que apesar de não serem infectivos, a imunossupressão decorrente da interação inicial do PAMPs de *T. stromaticum* com PRRs de células da imunidade inata podem desencadear processos de suscetibilidade em indivíduos, a outros microrganismos, exacerbando assim a progressão da infecção, principalmente as causadas por microrganismos intracelulares.

Devido ao estudo bem estabelecido da infecção por *Leishmania* e também por estes parasitas serem obrigatórios de macrófagos, células com funções reguladas negativamente pelos esporos de *T. stromaticum*, o modelo murino de leishmaniose mostra-se extremamente interessante para os estudos *in vivo* de supressão pelos esporos

As leishmanias, protozoários intracelulares de macrófagos podem infectar vários mamíferos como roedores, cães e o homem (CHARMOY *et al.*, 2007). Os macrófagos servem como células hospedeiras para *Leishmania* sp. e também modulam a resposta imune celular específica. O óxido nítrico produzido por esses fagócitos além de regular a resposta inflamatória, atua como molécula efetora na citotoxicidade contra parasitas invasores. Estudos anteriores mostraram que a geração de NO em resposta ao IFN- γ e TNF- α é importante no controle da infecção para diferentes espécies do gênero *Leishmania* (SERARSLAN & ATIK, 2005). Assim, as formas amastigotas de leishmanias resistentes ao NO se multiplicam significativamente melhor que parasitas susceptíveis ao NO durante a infecção de macrófagos humanos. Além disso, a resistência ao NO está diretamente associada ao tamanho da lesão, que é uma medida clínica da gravidade da doença (GIUDICE *et al.*, 2007).

Estudos mostram que camundongos da linhagem C57BL/6 são capazes de controlar a replicação do parasito e desenvolvem a cura da lesão cutânea. No entanto, em camundongos BALB/c, a infecção induz uma proliferação descontrolada associada ao desenvolvimento da lesão que não se cura. A resistência à infecção tem sido correlacionada com o desenvolvimento de células Th1 e a susceptibilidade com o desenvolvimento de células Th2 (CHARMOY *et al.*, 2007), além de outras características incluindo a expressão diferencial da enzima iNOS por camundongos das duas linhagens (SANTOS *et al.*, 2006).

Para testar a hipótese de imunossupressão desencadeada por esporos de *T. stromaticum*, realizamos ensaios *in vivo* onde animais C57BL/6 (grupo teste), foram submetidos a inalação de esporos uma vez por semana, durante 4 semanas, enquanto o grupo controle inalou PBS durante o mesmo período. Ambos os grupos teste e controle foram inoculados com promastigotas de *Leishmania major*. Os resultados mostraram que os animais inoculados com esporos e *Leishmania* tiveram um aumento acentuado das patas em relação ao grupo controle inoculado apenas com *Leishmania*. Além disso, o tempo de regressão da lesão foi superior ao grupo controle (**Fig.14**). Embora nossos estudos até o momento, não serem suficientes para determinar se o tamanho da lesão é consequência da inflamação ou do parasitismo local, podemos afirmar que os dados do curso da infecção causada por *L. major* em camundongos submetidos à inalação do esporo reforçam os nossos resultados de inibição dos mecanismos microbicidas encontrados nos experimentos *in vitro*.

A grande contribuição dos estudos da interação dos esporos de *T. stromaticum* no curso da leishmaniose vem do fato da região sul do estado da Bahia ter sofrido várias mudanças nas lavouras de cacau causadas por *M. pernicioso* dentre tais mudanças, o estabelecimento de novas atividades agropecuárias, as quais acarretaram diminuição da fauna e flora da região em consequência da derrubada das árvores da Mata Atlântica contribuíram para mudanças no comportamento do vetor da *Leishmania sp* e de seus reservatórios. Este fato gerou um aumento significativo na ocorrência da Leishmaniose tegumentar humana e de animais domésticos na região, que já era endêmica para a infecção (MARIANO, 2000).

Os nossos achados são de grande importância e abrem várias linhas de pesquisa referente à interação de esporos de *T. stromaticum* com o sistema imune inato e adaptativo. Assim, devido a prevalência elevada de leishmaniose na região sul da Bahia e de acordo com o conhecimento da importância da resposta imune inata e o direcionamento da resposta adaptativa para um perfil Th1 no controle de protozoários do gênero *Leishmania*, torna-se de extrema importância e foco de investigação o possível potencial imunossupressor apresentado por esporos de *T. stromaticum*. A exposição a esporos desse fungo poderá por um lado desencadear mecanismos imuno-regulatórios das respostas Th1, levando a exacerbação de infecções intracelulares, e por outro poderá estar envolvido na minimização de hipersensibilidades dependentes de resposta Th2.

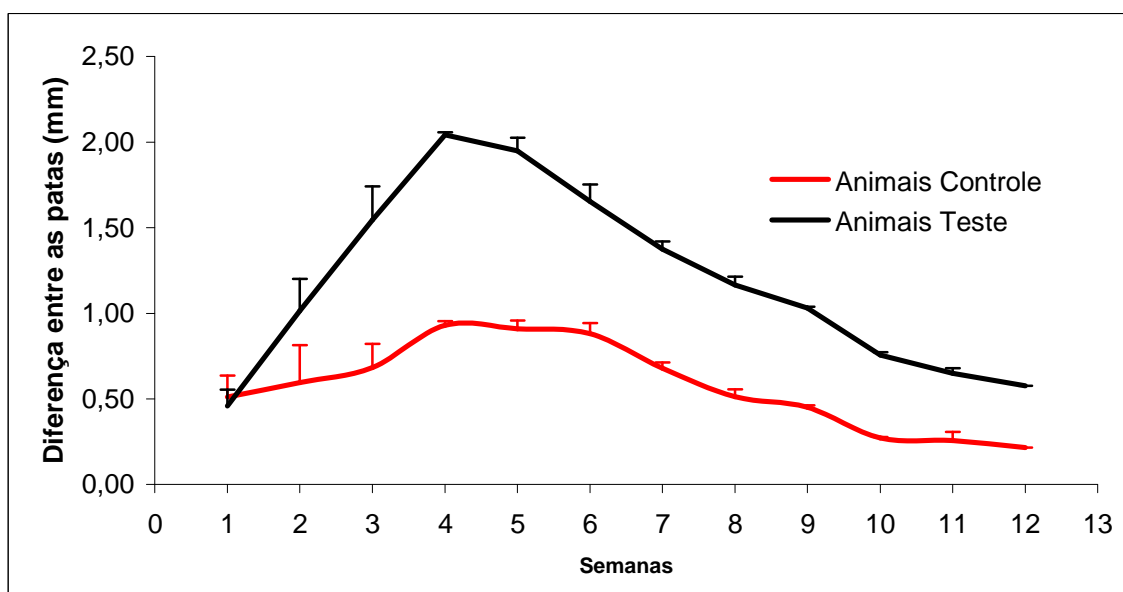


Fig. 14: Lesão causada por *Leishmania major* em animais que inalaram ou não esporos de *T. stromaticum*. Após inalação semanal de esporos do fungo, animais foram inoculados com formas amastigotas de *L. major*. Medidas semanais das patas foram realizadas e o grupo controle – que inalou solução PBS 1X – foi comparado com o grupo teste. Onde as barras representam o desvio padrão.

6. CONCLUSÕES

Podemos concluir que os esporos de *Trichoderma stromaticum*:

- na ausência de adjuvantes e inoculados via nasal não têm ação alergênica;
- apresentam ação sistêmica, mesmo quando inalado, inibindo a produção de IL-10 por células do baço;
- inibem os mecanismos microbicidas de produção de ROS e de NO em neutrófilos e macrófagos, respectivamente.
- A inibição da produção de ROS em neutrófilos sugere uma possível correlação com a inibição dos níveis de expressão do gene para dectina-1.
- A inibição da produção de NO por macrófagos é reflexo da inibição da expressão de iNOS. Entretanto, parece que a inibição de TLR4 não está diretamente relacionada à inibição de iNOS;
- Os esporos de *T. stromaticum* modulam in vitro os mecanismos protetores de camundongos resistentes ao protozoário *Leishmania major* induzindo a suscetibilidade dos animais.

ANEXO I

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K. AND LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. ELSEVIER, Rio de Janeiro, 2005;

ADEREM, A. AND UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu. Rev. Immunol.** 17:593–623. 1999;

AKBARI, O., FREEMAN, G.J., MEYER, E.H., GREENFIELD, E.A., CHANG, T.T., SHARPE, A.H., BERRY, G., DEKRUYFF, R.H., UMETSU, D.T. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. **Nat. Med.** 8, 1024–1032, 2002;

AKIRA, S. Toll receptor families: structure and function (Editorial). *Seminars in Immunology* **ELSEVIER** 16: 1-2, 2004;

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem. J.** 357: 593-615, 2001;

ALLEN, L. A. AND ADEREM, A. Mechanisms of phagocytosis. **Curr. Opin Immunol.** 8(1):36-40, 1996;

AMBRUSO D. R., BOLSCHER B. G. J. M., STOKMAN P. M., VERHOEVEN A. J. AND ROOS D. Assembly and activation of the NADPH:O₂ oxidoreductase in human neutrophils after stimulation with phorbol myristate acetate. **J. Biol. Chem.** 265: 924–930, 1990;

APPLEQUIST, S.E.; WALLIN, R.P.A.; LJUNGGREN, H.G. Variable expression of toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. **Inter. Immunol.** 14:(9) 1065 – 1074, 2002;

ARBIBE, L.; MIRA, J. P.; TEUSCH, N.; KLINE, L.; GUHA, M.; MACKMAN, N.; GODOWSKI, P. J.; ULEVITCH, R. J.; KNAUS, U. G.; Toll-like receptor 2-mediated NF- κ B activation requires a Rac1-dependent pathway. **Nature Immunol.** 1, 533–540, 2000;

ARONSON, J. D.; BECKMAN, W.; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiol. Rev.** 50, 1-24, 1986;

ASEHNOUNE, K.; STRASSHEIM, D.; MITRA, S.; KIM, J. Y.; Abraham, E. Involvement of Reactive Oxygen Species in Toll-Like Receptor 4-Dependent Activation of NF- κ B. **The J. of Immunol.** 172: 2522–2529, 2004;

BANERJEE, B., GREENBERGER, P.A., FINK, J.N., KURUP, V.P. Molecular characterization of aspergillus fumigatus allergens. **Indian J Chest Dis Allied Sci.** 42(4):239-48, 2000;

BASTOS, C.N. AND DIAS, J.C. Reduction in the Production of basidiocarps of *Crinipellis perniciososa* by *Trichoderma viride*. **Summa Phytopathol.** 18:235-238, 1992;

BENHAMOU, N. AND CHET, I. Hyphal interactions between *trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*- ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. **Phytopathol.** 83(10):1062 –1071, 1993;

BLANDER, J. M. AND MEDZHITOV, R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. **Science.** 304: 1014–1018, 2004;

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat. Immunol.** 2(10): 907-16, 2001;

BOISSEL, J.P.; SCHWARZ, P.M.; FORSTERMANN, U. Neuronal-type NO synthase: transcript diversity and expressional regulation. **Nitric Oxide.** 2(5):337-49, 1998;

BROWN G.D. AND GORDON S. Immune recognition: a new receptor for β -glucans. **Nature.** 413:36-37, 2001;

BROWN, G.D.; HERRE, J.; WILLIAMS, D.L.; WILLMENT, J.A.; MARSHALL, A.S.; GORDON, S. Dectin-1 mediates the biological effects of β -glucans. **J Exp Med.** 197:1119-1124, 2003;

BROWN, G.D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. **Nat. Rev. Immunol.** 6:33–43, 2006;

BROWN, E. J. Complement receptors and phagocytosis. **Curr. Opin. Immunol.** 3, 76–82, 1991;

CASTRO, V.L.S.S., JONSSON, C.M., MELO, I.S., NUNES, F. V. Avaliação de Risco Ecotoxicológico de *Trichoderma stromaticum* Usado Como Biopesticida. **Ecotoxicol. and Environmental Restoration**, 4:(1) 18-24, 2001;

CHAPMAN A. L., HAMPTON M. B., SENTHILMOHAN R., WINTERBOURN C. C.; KETTLE A. J. Chlorination of bacterial and neutrophil proteins during phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus*. **J. Biol. Chem.** 277: 9757–9762, 2002;

CHARMOY, M.; MEGNEKOU, R.; ALLENBACH, C.; ZWEIFEL, C.; PEREZ, C.; MONNAT, K.; BRETON, M.; RONET, C.; LAUNOIS, P.; TACCHINI-COTTIER, F. *Leishmania major* induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. **J. Leukoc. Biol.** 82: 1-12, 2007;

COHEN H. J. AND CHOVANIEC M. E. Superoxide production by digitonin-stimulated guinea pig granulocytes: the effects of N-ethyl maleimide, divalent cations, and glycolytic and mitochondrial inhibitors on the activation of the superoxide generating system. **J. Clin. Invest.** 61: 1088–1096, 1977;

CONTURSI, C.; WANG, I.M.; GABRIELE, L.; GADINA, M.; O'SHEA, J.; MORSE, H.C.; OZATO, K. IFN consensus sequence binding protein potentiates STAT1-dependent activation of IFN γ -responsive promoters in macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 97(1) 91-96, 2000;

COSTA, J.C.B.; BEZERRA, J.L.; CARZOLA, I.M. Controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacauzeiro na Bahia com *Trichoderma polysporum*. **Fitopatol. Brasileira** 21(sup.): 397, 1996;

DeCOURSEY, T. E AND LIGETI, E. Regulation and termination of NADPH oxidase activity. **CMLS, Cell. Mol. Life Sci.** 62:2173–2193, 2005;

DIAS, L.A.S. **Melhoramento genético do cacauzeiro**. Viçosa: UFV/Imprensa Universitária, 2001;

DIAZ-GUERRA, M.J.; VELASCO, M.; MARTIN-SANZ, P.; BOSCA, L. Evidence for Common Mechanisms in the Transcriptional Control of Type II Nitric Oxide Synthase in Isolated Hepatocytes **J. Biol. Chem.** 271(47) 30114-20 1996;

DOYLE, S.; VAIDYA, S.; O'CONNELL, R.; DADGOSTAR, H.; DEMPSEY, P.; WU, T.; RAO, G.; SUN, R.; HABERLAND, M.; MODLIN, R.; CHENG, G. IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. **Immunity.** 17:251–263, 2002;

DOYLE, S. E. O'CONNELL, R. M.; MIRANDA, G. A.; VAIDYA, S. A.; CHOW, E. K.; LIU, P. T.; SUZUKI, S.; SUZUKI, N.; MODLIN, R. L.; YEH, W. C.; LANE, T. F.; CHENG, G. Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. **J. Exp. Med.** 199, 81–90, 2004;

EIGLER, A.; SIEGMUND, B.; EMMERICH, U.; BAUMANN, K. H.; HARTMANN, G.; ENDRES, S. Anti-inflammatory activities of cAMP-elevating agents: enhancement of IL-10 synthesis and concurrent suppression of TNF production. **J Leukoc. Biol.** 63: 101-107, 1998;

EZEKOWITZ, R. A.; SASTRY, K.; BAILLY, P.; WARNER, A. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. **J. Exp. Med.** 172, 1785–1794, 1990;

FINKELMAN, F. D.; KATONA, I. M.; URBAN, J. F. JR.; HOLMES, J.; OHARA, J.; TUNG, A. S.; SAMPLE, J. V.; PAUL, W. E.; IL-4 is required to generate and sustain *in vivo* IgE responses. **J. Immunol.** 141:2335–2341, 1988;

GANTNER, B. N.; SIMMONS, R.M.; CANAVERA, S.J.; AKIRA, S.; UNDERHILL, D.M. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. **J. Exp. Med.** 197:1107-1117, 2003;

GANTNER, B. N.; SIMMONS, R. M.; UNDERHILL, D. M. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. **EMBO J.** 24, 1277–1286, 2005;

GAO, J.; MORRISON, D.C.; PARMELY, T.J.; RUSSELL, S.W.; MURPHY, W.J. An Interferon-g-activated Site (GAS) Is Necessary for Full Expression of the Mouse *iNOS* Gene in Response to Interferon-g and Lipopolysaccharide. **J. Biol. Chem.**, 272(2): 1226-30, 1997;

GIUDICE, A., CAMADA, I., LEOPOLDO, P. T. G., PEREIRA, J. M. B., RILEY, L. W., WILSON, M. E., HO, J. L., DE JESUS, A. R., CARVALHO, E. M., ALMEIDA, R. P. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. **BMC Infect. Dis.** 7:7, 1-12, 2007;

GOLDSTEIN, I. M.; ROOS, D.; KAPLAN, H. B.; WEISSMANN, G. Complement and immunoglobulins stimulate superoxide production by human leukocytes independently of phagocytosis. **J. Clin. Invest.** 56,1155–1163, 1975;

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood** 92: 3007–3017, 1998;

HAUSWIRTH, D. W. AND SUNDY, J. S. Bioaerosols and innate immune responses in airway diseases. **Curr. Opin. Allergy. Clin. Immunol.**, 4:361-366, 2004;

HAVAUX, X., ZEINE, A., DITS, A., DENIS, O. A new mouse model of lung allergy induced by the spores of *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum* molds. **Clin. Exp. Immunol.** 139(2):179-88, 2005;

HERRE, J.; MARSHALL, A. S. J.; CARON, E.; EDWARDS, A. D.; WILLIAMS, D. L.; SCHWEIGHOFFER, E.; TYBULEWICZ, V.; SOUSA, C. R.; GORDON, S.; BROWN, G. D. Dectin-1 utilizes novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. **Blood.** 104, 4038–4045, 2004;

HERRERA-ESTRELLA, A. AND CHET, I. Biocontrol of bacteria and phytopathogenic fungi. In: **Altman A. ed. Agricultural Biot.**, Marcel /dekker Inc., New York, 263-282, 1998;

HEYWORTH, P.G.; CURNUTTE, J.T.; NAUSEEF, W.M.; VOLPP, B.D.; PEARSON, D.W.; ROSEN, H. Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly: translocation of p47-*phox* and p67-*phox* requires interaction between p47-*phox* and cytochrome b558. **J. Clin. Invest.** 87: 352–356, 1991;

HIBBS, J.B.J.; TAINTOR, R.R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science**, 235(4787): 473-6 1987;

HIBBS, J.B.J.; TAINTOR, R.R.; VAVRIN, Z.; RACHLIN, E.M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 157(1):87-94 1989;

HOGABOAM, C. M.; BLEASE, K.; MEHRAD, B.; STEINHAUSER, M. L.; STANDIFORD, T. J.; KUNKEL, S. L.; LUKACS, N. W. Chronic airway hyperreactivity, goblet cell hyperplasia, and peribronchial fibrosis during allergic airway disease induced by *Aspergillus fumigatus*. **Am. J. Pathol.** 156:723–732, 2000;

HOLH, T. M., EPPS, H. L. V., RIVERA, A., MORGAN, L. A., CHEN, P. L., FELDMESSER, M., PAMER, E. R., *Aspergillus fumigatus* triggers inflammatory responses by stage-specific β -glucan display. **PLoS Pathog.** 1(3): e30, New York, 2005;

IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; BYRNS, R.E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 84: 9265-69, 1987;

INDIK, Z.K.; PARK, J.G.; HUNTER, S.; SCHREIBER, A.D. The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis. **Blood**, 86(12): 4389–99, 1995;

JANEWAY, C. A. JR. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. **Immunol. Today**. 13: 11–16, 1992;

KAMBAYASHI, T.; JACOB, C. O.; ZHOU, D.; MAZUREK, N.; FONG, M.; STRASSMANN, G. Cyclic nucleotide phosphodiesterase type IV participates in the regulation of IL-10 and in the subsequent inhibition of TNF-alpha and IL-6 release by endotoxin-stimulated macrophages. **J. Immunol.** 155: 4909-4916, 1995;

KAMIJO, R.; HARADA, H.; MATSUYAMA, T.; BOSLAND, M.; GERECITANO, J.; SHAPIRO, D.; LE, J.; KOH, S.I.; KIMURA, T.; GREEN, S.J. Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. **Science**, 263(5153):1612-5, 1994;

KAWAI, T. *et al.* Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. **J. Immunol.** 167:5887–5894, 2001;

KHERADMAND, F.; KISS, A.; XU, J.; LEE, S. H.; KOLATTUKUDY, P. E.; CORRY, D. B. A protease-activated pathway underlying Th cell type 2 activation and allergic lung disease. **J. Immunol.** 169(10):5904-11, 2002;

KIM, Y.M.; LEE, B.S.; YI, K.Y.; PAIK, S.G. Upstream NF-kappaB site is required for the maximal expression of mouse inducible nitric oxide synthase gene in interferon-gamma plus lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 236(3):655-60, 1997;

KIPS, J. C. Cytokines in asthma. **Eur. Respir. J. Suppl.**, 34:24–33, 2001;

KLEINERT, H.; EUCHENHOFER, C.; IHRIG-BIEDERT, I.; FORSTERMANN. In Murine 3T3 Fibroblasts, Different Second Messenger Pathways Resulting in the Induction of NO Synthase II (iNOS) Converge in the Activation of Transcription Factor NF-kB. **J. Biol. Chem.**, 271(11): 6039-44, 1996;

KLEINERT, H.; SCHWARZ, P.M.; FORSTERMANN, U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **Biol. Chem.**, 384(10-11):1343-64, 2003;

KLIS, F.M.; MOL, P.; HELLINGWERF, K.; BRUL, S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Rev.**, 26:239–256, 2002;

KNOWLES, R.G.; AND MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem. J.**, 298 (Pt 2):249-58, 1994;

KOCH, M.; WITZENRATH, M.; REUTER, C.; HERMA, M.; SCHÜTTE, H.; SUTTORP, N.; COLLINS, U.; KAUFMANN, S. H. E. Role of local pulmonary ifn-expression in murine allergic airway inflammation. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** 35:211–219, 2006;

KOLLÁR, R.; REINHOLD, B. B.; PETRÁKOVÁ, E.; YEH, H. J.; ASHWELL, G.; DRGONOVÁ, J.; KAPTEYN, J. C.; KLIS, F. M.; CABIB, E. Architecture of the yeast cell wall. (1/6)-glucan interconnects mannoprotein, (1/3)-glucan, and chitin. **J. Biol. Chem.**, 272: 17762–17775, 1997;

KORHONEN, R.; LAHTI, A.; KANKAANRANTA, H.; MOILANEN, E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. **Infla. & Allergy.**, 4: 471-479, 2005;

KROPF, P.; FREUDENBERG, M.A.; MODOLELL, M.; PRICE, H.P.; HERATH, S.; ANTONIAZI, S.; GALANOS, C.; SMITH, D.F.; MULLER, I. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. **Infec. and Immunity.** 72:(4) 1920 – 1928, 2004;

KURUP, V.P.; CHOI, H.; MURALI, P.S.; RESNICK, A.; FINK, J.N.; COFFMAN, R.L. Role of particulate antigens of *Aspergillus* in murine eosinophilia. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, 112(3):270-8, 1997;

LEVITZ, S.M. Interaction of Toll-like receptors with fungi. **Microbes and Infection** 6:1351-1355, 2004;

LOWENSTEIN, C.J.; ALLEY, E.W.; RAVAL, P.; SNOWMAN, A.M.; SNYDER, S.H.; RUSSELL, S.W.; MURPHY, W.J. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 90(20):9730-4, 1993;

MacMICKING, J. D.; NORTH, R. J.; LACOURSE, R.; MUDGETT, J. S.; SHAH, S. K.; NATHAN, C. F. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. **Proc. Natl. Acad. Sc.i USA**, 94(10):5243-8, 1997;

MARIANO, M.L.M. **Leishmaniases: Avanço das Técnicas para Diagnóstico. 2000.** 28 f. Dissertação (Monografia) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2000;

McGEE, H. S. AND AGRAWAL, D. K. TH2 cells in the pathogenesis of airway remodeling: regulatory T cells a plausible panacea for asthma. **Res. Immunol.** 35(3):219-32, 2006;

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.** 1: 135 – 145, 2001;

MEDZHITOV, R. PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A. JR. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, 388(6640):394-7, 1997;

MIWA, M.; STUEHR, D. J.; MARLETTA, M. A.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Nitrosation of amines by stimulated macrophages. **Carcinogenesis**, 8(7):955-8 1987;

MOORE, K. W.; O'GARRA, A.; DE WAAL MALEFYT, R.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T. R. Interleukin-10. **Annu. Rev. Immunol.** 11: 165-190, 1993;

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, 65:55-63, 1983;

MURALI, P. S., KUMAR, A., CHOI, H., BANSAL, N. K., FINK, J. N., AND KURUP, V. P. *Aspergillus fumigatus* antigen induced eosinophilia in mice is abrogated by anti-IL-5 antibody. **J. Leukoc. Biol.**, 53, 264-267, 1993;

NADERI, A.; AHMED, A. A.; BARBOSA-MORAIS, N. L.; APARICIO, S.; BRENTON, J. D.; CALDAS, C. Expression microarray reproducibility is improved by optimizing purification steps in RNA amplification and labeling. **BMC Genomics**, 5:9, 14 pag., 2004;

NAUSEEF W. M., VOLPP B. D., MCCORMICK S., LEIDAL K. G. AND CLARK R. A. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components. **J. Biol. Chem.**, 266: 5911–5917, 1991;

NODA, T. AND AMANO. F. Differences in nitric oxide synthase activity in a macrophage-like cell line, RAW264.7 cells, treated with lipopolysaccharide (LPS)

in the presence or absence of interferon-gamma (IFN-gamma): possible heterogeneity of iNOS activity. **J. Biochem.**, 121(1):38-46, 1997;

NOVERR, M.C.; FALKOWSKI, N. R.; McDONALD, R.A.; McKENZIE, A.N.; HUFFNAGLE, G.B. Development of allergic airway disease in mice following antibiotic therapy and fungal microbiota increase: role of host genetics, antigen, and interleukin-13. **Infec. and Immunity**. 73:(1) 30 – 38, 2005;

OZINSKY A.; UNDERHILL, D. M.; FONTENOT, J. D.; HAJJAR, A. M.; SMITH, K. D.; WILSON, C. B.; SCHROEDER, L.; ADEREM, A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 97(25):13766-71, 2000;

PALMER, R.M.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 327(6122):524-6, 1987;

PASARE, C. AND MEDZHITOV, R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity (Forum). **Microbes and Infection**, 6: 1382 – 1387, 2004;

PASARE, C. AND MEDZHITOV, R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells, **Science**, 299: 1033–1036, 2003;

PELCZAR, M. J. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: Conceitos e aplicações**. Volume I. 2ª Edição. MAKRO Books, São Paulo, 1996;

PYLKKÄNEN, L.; GULLSTÉN, H.; MAJURI, M. L.; ANDERSSON, U.; VANHALA, E.; MÄÄTTÄ, J.; MEKLIN, T.; HIRVONEN, M. R.; ALENIOUS, H.; SAVOLAINEN, K. Exposure to *Aspergillus fumigatus* spores induces chemokine expression in mouse macrophages. **Toxicol.**, 200(2-3):255-63, 2004;

RADA B. K.; GEISZT M.; KÁLDI K.; TÍMÁR C.; LIGETI E. Dual role of phagocytic NADPH oxidase in bacterial killing. **Blood** 104: 2947–2953, 2004;

REPA, A.; WILD, C.; HUFNAGL, K.; WINKLER, B.; BOHLE, B.; POLLAK, A.; WIEDERMANN, U. Influence of the route of sensitization on local and systemic immune responses in a murine model of type I allergy. **Clin. Exp. Immunol.**, 137:12–18, 2004;

REST, R. F. AND SPEERT, D. P. Measurement of nonopsonic phagocytic killing by human and mouse phagocytes. **Methods Enzymol.**, 236:91-108, 1994;

ROJO, R., PIEPER, D. H., ENGESSER, K.-H., KNACKMUSS, H.-J., AND TIMMIS. Assemblage of ortho cleavage route for simultaneous degradation of chloro- and methylaromatics. **Science**, 238:1395-1398, 1987;

ROMAGNANI, S. Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. **J Allergy Clin. Immunol.**, 113:395–400, 2004;

ROOS, D.; van BRUGGEN, R.; MEISCHL, C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. **Microbes and Infection**, 5: 1307 – 1315, 2003;

ROOT R. K. AND METCALF J. A. H₂O₂ release from human granulocytes during phagocytosis: relationship to superoxide anion formation and cellular catabolism of H₂O₂ – studies with normal and cytochalasin B-treated cells. **J. Clin. Invest.**, 60: 1266–1279, 1977;

RUIZ-HERRERA, J. Fungal cell wall: structure, synthesis and assembly. Florida, **CRC Press.**, 1992;

SAIKAI, T. TANAKA, H., SATO, N. ET AL A. Mushroom plant works experience a shift towards a T helper type 2 dominant state: contribution of innate immunity to spore antigen. **Clin. Exp. Immunol.**, 135:119-124, 2004;

SAMUELS, G.J.; PARDO-SCHULTHEISS, R.; HEBBAR, K.P.; LUMSDEN, R.D.; BASTOS, C.N.; COSTA, J.C.; BEZERRA, J.L. *Trichoderma stromaticum* sp. nov.,

a parasite of the cacao witches broom pathogen. **Mycol. Research**, 104: 760-764, 2000;

SANOGO, S.; POMELLA, A.; HEBBAR, P. K.; BAILEY, B.; COSTA, J. C. B.; SAMUELS, G. J.; LUMSDEN, R. D. Production and germination of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of *Crinipellis pernicioso* on cacao. **Phytopathol.**, 92:1032-1037, 2002;

SANTOS, J. L.; ANDRADE, A. A.; DIAS, A. A. M.; BONJARDIM, C. A.; TEIXEIRA, S. M. R.; REIS, L. F. L.; HORTA, M. F.. Differential Sensitivity of C57BL/6 (M-1) and BALB/c (M-2) Macrophages in IFN- γ /LPS for the Production of NO: Correlation with iNOS mRNA and Protein Expression. **J. of Interferon & Cytokine Research**, 26:67–72, 2006;

SAIJO, S.; FUJIKADO, N.; FURUTA, T.; CHUNG, S. H.; KOTAKI, H.; SEKI, K.; SUDO, K.; AKIRA, S.; ADACHI, Y.; OHNO, N.; KINJO, T.; NAKAMURA, K.; KAWAKAMI, K.; IWAKURA, Y. Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. **Nat. Immunol.**, 8:39–46, 2007;

SBARRA A. J. AND KARNOVSKY M. L. The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. **J. Biol. Chem.**, 234: 1355–1362, 1959;

SCHILLING, D.; THOMAS, K.; NIXDORFF, K.; VOGEL, S.N.; FENTON, M.J. Toll-like receptor 4 and Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter protein (TIRAP)/myeloid differentiation protein 88 adapter (Mal) contribute to maximal IL-6 production in macrophages. **J. Immunol.**, 169: 5874 – 5880, 2002;

SERARSLAN, G. AND ATIK, E. Expression of inducible nitric oxide synthase in human cutaneous leishmaniasis. **Mol. and Cell. Bioch.**, 280: 147–149, 2005;

SHAUL, P.W. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. **Annu. Rev. Physiol.**, 64:749-74, 2002;

SHIMAZU R, AKASHI S, OGATA H, NAGAI Y, FUKUDOME K, MIYAKE K, KIMOTO M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. **J. Exp. Med.**, 189(11):1777-82, 1999;

SOUSA, C.R. Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Seminars in Immunology*. **ELSEVIER**, 16: 27 – 34, 2004;

STAMLER, J. S.; LAMAS, S.; FANG, F. C. Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. **Cell**, 106(6):675-83, 2001;

STEELE, C.; RAPAKA, R. R.; METZ, A.; POP, S. M.; WILLIAMS, D. L.; GORDON, S.; KOLLS, J. K.; BROWN, G. D. The α -glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. **PLoS Pathog.**, 1(4):e42, 2005;

STUEHR, D.J. AND MARLETTA, M.A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 82(22):7738-42, 1985;

TABETA, K., GEORGEL, P., JANSSEN, E., DU, X., HOEBE, K., CROZAT, K., MUDD, S., SHAMEL, L., SOVATH, S., GOODE, J., ALEXOPOULOU, L., FLAVELL, R.A., BEUTLER, B. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 101:3516–3521, 2004;

TAKEDA K, KAISHO T, AKIRA S. Toll-like receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, 21: 335–376, 2003;

TAKEDA, K. AND AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **Int. Immunol.**, 17, 1–14, 2005;

TANG, H. F.; SONG, Y. H.; CHEN, J. C.; CHEN, J. Q.; WANG, P. Upregulation of phosphodiesterase-4 in the lung of allergic rats. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 171(8):823-8, 2005;

TAYLOR, P. R.; BROWN, G. D.; REID, D. M.; WILLMENT, J. A.; MARTINEZ-POMARES, L.; GORDON, S.; WONG, S. Y. The α -glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. **J. Immunol.**, 169:3876–82, 2002;

TAYLOR, P. R.; TSONI, S. V.; WILLMENT, J. A.; DENNEHY, K. M.; ROSAS, M.; FINDON, H.; HAYNES, K.; STEELE, C.; BOTTO, M.; GORDON, S.; BROWN, G. D. Dectin-1 is required for α -glucan recognition and control of fungal infection. **Nat. Immunol.**, 8:31–38, 2007;

TOSHCHAKOV, V.; JONES, B. W.; PERERA, P. Y.; THOMAS, K.; CODY, M. J.; ZHANG, S.; WILLIAMS, B. R.; MAJOR, J.; HAMILTON, T. A.; FENTON, M. J.; VOGEL, S. N. TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. **Nat Immunol.**, 3(4):392-8, 2002;

UNDERHILL, D. M. Collaboration between the innate immune receptors dectin-1, TLRs, and Nods. **Immunol. Reviews**, 219: 75–87, 2007;

UNDERHILL, D. M., ROSSNAGLE, E., LOWELL, C. A.; SIMMONS, R. M. Dectin-1 activates SYK tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. **Blood**, 106:2543–2550, 2005;

WALTER, K.; FULFORD, A. J. .C.; MCBEATH, R.; JOSEPH, S.; JONES, F.M. ; KARIUKI, H. C.; MWATHA, J. K.; KIMANI, G.; KABATEREINE, N. B.; VENNERNALD, B. J.; OUMA, J. H.; DUNNE, D. W. Increased human ige induced by killing *Schistosoma mansoni* in vivo is associated with pretreatment th2 cytokine responsiveness to worm antigens. **J. Immunol.**, 177: 5490–5498, 2006;

WARD, M. D. W.; SAILSTAD, D. M.; SELGRADEF, M. K. Allergic Responses to the Biopesticide *Metarhizium anisopliae* in Balb/c Mice. **Toxicol. Sciences**, 45: 195-203,1998;

XIE, Q.W.; KASHIWABARA, Y.; NATHAN, C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. **J. Biol. Chem.**, 269(7):4705-8, 1994;

XIE, Q.W.; WHISNANT, R.; NATHAN, C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. **J. Exp. Med.**, 177(6):1779-84, 1993;

XU, D., LIU, H., KOMAI-KOMA, M., Direct and indirect role of Toll-like receptors in T cell mediated immunity. **Cell. & Mol. Immunol.**, 239-246, 2004;

ZUANY-AMORIM, C., SAWICKA, E., MANLIUS, C., LE MOINE, A., BRUNET, L.R., KEMENY, D.M., BOWEN, G., ROOK, G., WALKER, C., Suppression of airway eosinophilia by killed *Mycobacterium vaccae*-induced allergen-specific regulatory T-cells. **Nat. Med.**, 8:625–629, 2002;