

James Venturini¹
 Natália Moretti Violato²
 Maria Sueli Parreira de Arruda³

INFLUÊNCIA DA TESTOSTERONA NA ATIVIDADE MACROFÁGICA FRENTE AO *TRICHOPHYTON MENTAGROPHYTES*.

Influence of testosterone on macrophages activity cocultured with Trichophyton mentagrophytes.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da testosterona sobre a atividade funcional de macrófagos murinos residentes frente ao *Trichophyton mentagrophytes*. Nas condições ensaiadas, a testosterona influenciou a liberação da H₂O₂ levando a redução da atividade microbicida dos macrófagos, facilitando o crescimento e diferenciação dos conídeos fagocitados.

PALAVRAS-CHAVE: *Trichophyton mentagrophytes*; macrófagos; testosterona.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluating the influence of male sexual hormone on activity of Swiss mice resident macrophages cocultured with *Trichophyton mentagrophytes*. In assayed conditions, testosterone influenced H₂O₂ release, leading to inhibition of killed macrophage activity in ingested conidia, facilitating its growth and differentiation inside macrophage.

KEY-WORD: *Trichophyton mentagrophytes*; macrophage; testosterone.

INTRODUÇÃO

Os dermatófitos compreendem um grupo de fungos filamentosos, que exibem a capacidade de invadir e colonizar os tecidos queratinizados do organismo do homem e dos animais, bem como restos de queratina

Venturini J, Violato NM, Arruda MSP. Influência da testosterona na atividade macrofágica frente ao *Trichophyton mentagrophytes*. Hansen Int. 2008; 33(1): 19-24.

encontrados no solo¹. As manifestações clínicas das dermatofitoses são heterogêneas, podendo abranger desde lesões não inflamatórias, até infecções crônicas, difíceis de erradicar². Estas infecções estão entre as zoonoses mais comuns do mundo, afetando aproximadamente 40% da população; elas representam 30% de todas as infecções micóticas cutâneas e são consideradas o terceiro distúrbio de pele mais comum em crianças menores de 14 anos e o segundo da população adulta^{3,4}.

Embora a resistência efetiva a este fungo seja multifatorial, poucos autores têm focalizado o papel dos macrófagos nesse processo⁵. Recentemente essas células vêm sendo apontadas como susceptíveis à influência da testosterona⁶; tem sido sugerido, por exemplo, que esse hormônio poderia inibir o crescimento *in vitro* dessas células, promover apoptose⁷ e afetar a produção de citocinas^{8,9} e de reativos intermediários do nitrogênio^{10,11}.

Considerando que os macrófagos desempenham papel importante na instalação e disseminação de patógeno¹², essas alterações funcionais, se instaladas,

Enviado em: 13/03/2008

Correção em: 21/08/2008

Aceito em: 10/02/2009

1 Biólogo, Mestre em Doenças Tropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

2 Graduanda do Curso de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências, UNESP, Bauru, SP.

3 Doutora, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências, UNESP, Bauru, SP. Correspondence: Prof^a Dr^a Maria Sueli Parreira de Arruda. Faculdade de Ciências, UNESP/Bauru. Av. Eng. Luiz Edmundo Coube, 14-01. CEP 17033-360. Bauru – SP. sueli@fc.unesp.br.

certamente favoreceriam o desenvolvimento de infecções. Contudo, a extensão e as conseqüências desses achados para a saúde do homem não se encontram bem estabelecidas. Enquanto vários autores têm chamado à atenção para o maior acometimento de algumas das formas clínicas nas dermatofitoses em indivíduos do sexo masculino^{13,14,15,16}, outros não apoiam essas observações^{17,18}. Buscando dados que permitissem o melhor entendimento da participação dos hormônios sexuais na resistência do organismo às infecções, no presente estudo, avaliamos o papel da testosterona sobre a liberação de H₂O₂, a produção de óxido nítrico (NO) e das citocinas IL-10 e TNF- α por macrófagos provocados com *Trichophyton (T) mentagrophytes*.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 5 camundongos Suíços, fêmeas, com 45 dias de idade, provenientes do Biotério Central de Botucatu- UNESP. O protocolo experimental foi realizado de acordo com os princípios éticos para pesquisas com animais, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências, UNESP, Campus de Bauru.

Fungo

Foram utilizadas cepas de *T. mentagrophytes* mantidas na micoteca do Laboratório de Imunopatologia Experimental, cultivadas por 15 dias em meio Micosel (Difco Lab., Detroit, Mi, USA), à 25° C.

Conídeos de *T. mentagrophytes*

Para obtenção dos conídeos, fragmentos fúngicos do meio de cultura foram ressuspensos em solução salina estéril. A suspensão fúngica foi filtrada em filtro Whatman 1, de modo a remover os fragmentos de hifas e preservar os conídeos⁵. O filtrado foi centrifugado por 10 min a 1500 rpm; o sobrenadante foi desprezado e o botão ressuspense em 1 ml de solução salina estéril. O número de conídeos presentes na suspensão foi obtido através da contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer e a viabilidade determinada pela coloração por Azul Algodão¹⁹. A concentração fúngica foi ajustada para 10⁷ conídeos viáveis /mL.

Lavado intra-peritonal (LIP)

Os animais foram eutanizados por asfixia por CO₂ e as células peritoniais coletadas através da lavagem da cavidade peritoneal com 10 ml de solução tampão fosfato (PBS), pH 7,4 estéril e gelada. A suspensão foi centrifugada e o pellet celular ressuspense em 1 ml de meio RPMI-1640 (Nutricell, Campinas, SP, Brasil) contendo 10% de soro bovino fetal (SBF) inativado (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA). De acordo com critérios morfológicos

utilizando solução vermelho neutro 0,2%, a suspensão celular foi ajustada para conter 10⁶ macrófagos/ml; a viabilidade celular foi verificada utilizando-se azul tripan 0,1%. As suspensões celulares utilizadas no experimento continham, pelo menos, 85% de macrófagos viáveis.

Cultura de macrófagos peritoniais

As células do LIP foram plaqueadas em placas de cultura celular (TPP-Tissue culture cell plate, Suíça) com 10⁵ células/poço. As placas foram incubadas em câmara de CO₂ 5%, à 37°C. Após duas horas, as mesmas foram lavadas com meio RPMI-1640 a fim de eliminar as células não aderidas. Em seguida, foram incubadas na presença ou ausência de testosterona por 30 minutos e, desafiadas com os conídeos do fungo, na proporção 1:1, por 4 horas⁵. Após esse período, o sobrenadante foi coletado e utilizado na determinação da produção de NO e citocinas e, as células nos poços, na determinação da produção de H₂O₂.

Tratamento hormonal

Para preparar a incubação dos macrófagos com testosterona, foi utilizado propionato de testosterona (Tianjin T. Tech. Develop, China) dissolvido em etanol 100%, evaporado por secagem e ressuspensa em meio RPMI-1640. Foi utilizada concentração fisiológica de 10 nM de testosterona⁷.

Avaliação da atividade macrófaga

Ensaio da Fagocitose

As células do LIP foram plaqueadas em placas de 24 poços (TPP) sobre lamínulas de vidro com 13mm de diâmetro com 10⁵ células/poço e cultivadas segundo protocolo acima descrito. Assim, após terem sido desafiadas com os conídeos do fungo, as lamínulas foram lavadas em PBS gelado, fixadas em metanol, coradas por May Grünwald-Giemsa e analisadas em microscópio óptico. Uma média de 100 macrófagos foi contada (T) e o percentual de fagocitose (PF) foi determinado através da média de macrófagos que fagocitaram pelo menos um conídeo (F) sob o total de células contadas (T). Foi determinada, ainda, a porcentagem de hifas formadas (PH) dentro dos macrófagos através da média de hifas formadas (H) sob a média de conídeos fagocitados (C).

Produção de H₂O₂

Após a coleta do sobrenadante, 100 μ l de solução vermelho fenol (Sigma) contendo dextrose (Synth, Diadema, SP, Brasil) e peroxidase de raiz forte tipo II (Sigma) foram adicionados aos poços²⁰. Após 1 hora de incubação, a reação foi bloqueada pela adição de 1N NaOH e a absorbância determinada em microleitor de ELISA (ELx 800, Bio-tek Instruments Inc, Winooski, VE, USA) em filtro de 620 nm. Os valores em μ M de H₂O₂ foram determinados

por comparação com curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas de H₂O₂ (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Produção de NO

A produção de nitrito (produto final e estável do NO) foi mensurada no sobrenadante de cultura de macrófagos baseado no método de Ding et. al.¹⁷. Assim, 100 µL do sobrenadante foram incubados com volume igual de reagente de Griess, contendo 1% sulfanilamida (Synth), 0.1% naphthalene diamino dihydrochlorido (Sigma) e 2.5% H₃PO₄, à temperatura ambiente por 10 min. Para quantificar o acúmulo de nitrito, a absorbância das amostras foi mensurada em 540 nm, em microleitor de ELISA. A concentração de nitrito foi determinada utilizando nitrito de sódio (Sigma) diluído em RPMI-1640 como padrão.

Dosagem de TNF-α e IL-10

As citocinas TNF-α e IL-10 foram dosadas no sobrenadante da cultura celular e quantificadas pelo método de ELISA conforme as instruções do fabricante (Kit DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MI, USA).

Análise Estatística

Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPad InStat versão 3.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e o nível de significância estatística estabelecido foi 5% (p < 0.05) para todas as análises. Os valores foram expressos em média ± erro padrão médio (EPM). Para comparar os valores entre duas amostras foi utilizado o t-test *Student*. Para comparação entre três amostras foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA). Quando o ANOVA revelou diferença significativa, utilizamos o teste de comparação múltipla de Bonferroni²¹.

RESULTADOS

Nas condições ensaiadas, não detectamos liberação de NO e de IL-10 por macrófagos peritoneais, independente dos mesmos terem sido provocados ou não com *T. mentagrophytes* ou da presença ou ausência de testosterona.

Verificamos ainda que o fungo, por si só, induz a liberação de TNF-α e que a adição de testosterona ao cultivo celular não afetou esse parâmetro (Fig. 1). A testosterona também não afetou o percentual de fagocitose dos conídios; contudo, sua adição à cultura, resultou no aumento do número de hifas dentro dos macrófagos (Fig. 2 e 3).

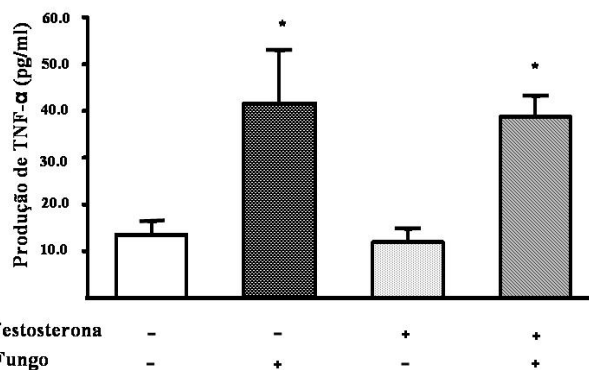


Figura 1 Produção de TNF-α por macrófagos peritoneais na presença ou ausência de conídios de *T. mentagrophytes* e/ou testosterona. Valores expressos em média ± EPM. Significância: * vs culturas livres do fungo; p<0,05 (ANOVA).

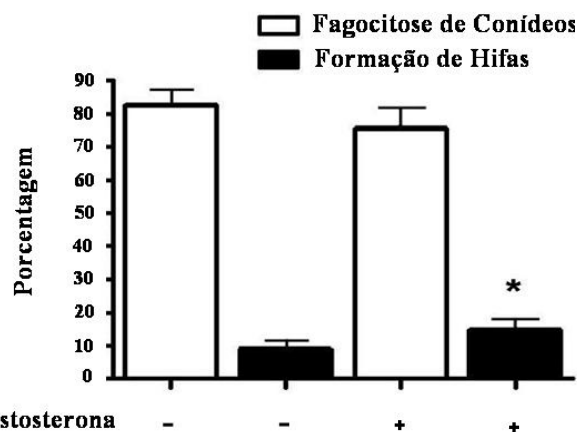


Figura 2 Avaliação da atividade fagocítica de conídios e hifas de *T. mentagrophytes* por macrófagos peritoneais (MΦ) na presença ou ausência de testosterona. Valores expressos em média ± EPM. Significância: * vs MΦ; p<0,05 (Teste T-Student).

Com relação à produção de H₂O₂ verificamos que enquanto a adição de conídios aos macrófagos peritoneais resultou no aumento expressivo da produção de H₂O₂, a adição de testosterona, quer na presença quer na ausência do fungo, levou à diminuição significativa desse metabólito (Fig. 4).

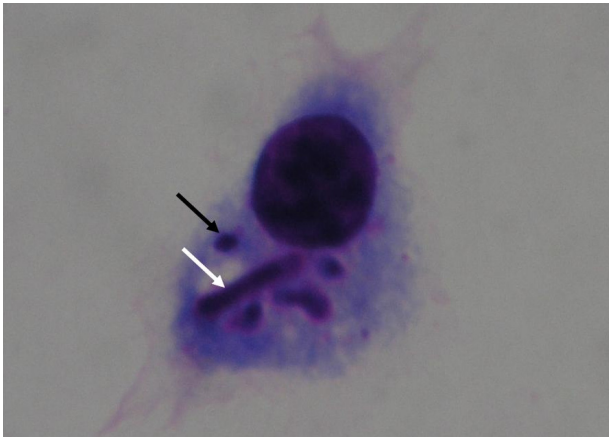


Figura 3. Fotomicrografia ilustrando a atividade fagocítica de macrófagos peritoneais co-cultivado com conídeos de *T. mentagrophytes*. Seta escura: conídeo; seta clara: hifa (Coloração May Grünwald-Giemsa, objetiva de 100X).

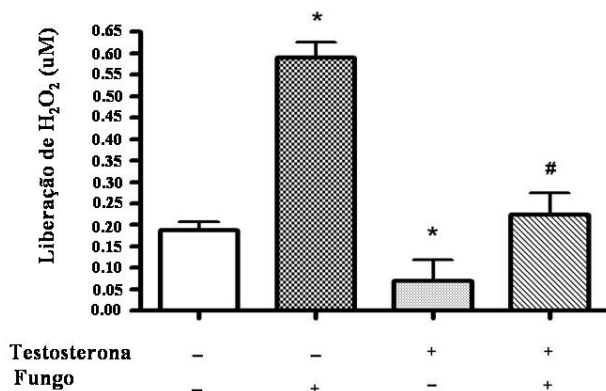


Figura 4. Produção de produção de H₂O₂ por macrófagos peritoneais (MΦ) na presença ou ausência de conídeos de *T. mentagrophytes* e/ou testosterona (MΦ). Valores expressos em média + EPM. Significância: * vs MΦ; # vs MΦ + Fungo; p<0,05 (ANOVA).

DISCUSSÃO

Conforme descrito por Campos et. al.⁵, muitos estudos têm focado a participação dos fagócitos na resposta imune contra fungos; contudo, poucos têm avaliado o papel dessas células na dermatofitose. Investigando alguns aspectos dessa relação, esses autores descreveram que a interação de conídeos de *T. rubrum* com macrófagos peritoneais residentes resultava na produção de TNF- α e IL-10, mas não de IL-12 e NO.

Embora macrófagos murinos infectados com fungos tendam a produzir altos níveis de NO⁹, também no presente estudo e, independentemente da presença de testosterona, não detectamos a liberação desse metabólito. Considerando que essa liberação ocorre de modo mais intenso quando as células são estimuladas por citocinas,

principalmente o INF- γ ¹⁶, um mediador liberado em um momento mais tardio da infecção, é possível que, realmente, o NO não exerça papel preponderante nos momentos iniciais da relação dermatófito-macrófago.

É possível ainda, conforme descrito para outros patógenos¹⁹, que o *Trychophyton* ou seus produtos, tenham a capacidade de inibir a produção de NO. Bocca et. al.⁵ trabalhando com cromoblastomicose, verificaram que, mesmo em culturas estimuladas com INF- γ , os macrófagos peritoneais submetidos à *Fonsecae pedrosoe*, exibiam diminuição da produção de NO. Avaliando a presença de iNOS em células gigantes de lesões orais de paracoccidioidomicose, Batista et. al.⁴ também encontraram baixa expressão dessa enzima. Assim, esse fenômeno não é específico para dermatófitos, podendo ser encarado como um mecanismo de escape fúngico, pois a ausência de NO, um mecanismo importante para a morte desses patógenos⁹, favoreceria sua multiplicação e manutenção no hospedeiro. Por outro lado, a interação conídeos-macrófagos resultou no aumento expressivo da produção de H₂O₂, reforçando ser esse reativo um elemento importante no controle da proliferação fúngica nos momentos iniciais a infecção¹⁰.

Embora não haja consenso entre os pesquisadores, alguns estudos evidenciam que concentrações fisiológicas de testosterona podem inibir a produção dos reativos intermediários do oxigênio e do nitrogênio pelos macrófagos¹¹.

Para verificar se o caráter inibidor atribuído à testosterona não estaria relacionado à indução precoce de mediadores supressores, avaliamos a presença de IL-10, nos sobrenadantes das culturas de 4 horas. A ausência dessa citocina no material ensaiado, além de reforçar seu papel nos estágios mais tardios da interação patógenos-macrófagos⁵, demonstra que a testosterona não interfere nesse processo.

Aliado a isso, verificamos que o fungo, por si só, induziu a liberação de TNF- α , citocina pró-inflamatória liberada nos momentos iniciais da infecção; verificamos ainda que a adição de testosterona ao cultivo não afetou esse parâmetro. Assim, embora a literatura registre que monócitos de homens produzam maior quantidade de TNF- α que monócitos de mulheres^{3,6,28}, este fato, possivelmente, não está relacionado à presença de níveis fisiológicos de testosterona. Apoiam esta premissa, os dados obtidos por Pasma e colaboradores²⁶, que, à semelhança dos nossos achados, também não observaram qualquer efeito da testosterona sobre a produção do TNF- α por monócitos humanos.

Do mesmo modo, a presença de testosterona também não afetou o percentual de conídios fagocitados; contudo, sua adição à cultura, resultou no aumento do número de hifas dentro dos macrófagos. Trabalhando com culturas de *T. rubrum* livres de hormônios, Campos et al.⁵ determinaram a formação de hifas somente às

8 horas de cultivo; considerando esse achado, nossos resultados sugerem que a testosterona acelera este processo e, assim, pode atuar como fator facilitador da infecção dermatofítica.

Soma-se a isso, a ação inibidora que a testosterona exerceu sobre a liberação da H₂O₂; este fenômeno ocorreu tanto na presença como na ausência do fungo, sugerindo ser esta, uma propriedade inespecífica, ou

seja, que independe da presença de patógenos.

Assim, nossos resultados revelam que a testosterona suprime diretamente a produção e/ou liberação de H₂O₂, atuando como um facilitador das infecções em geral. Além desta ação inespecífica, ainda contribuí para o estabelecimento das dermatofitoses, por favorecer o crescimento e diferenciação de conídios ingeridos pelos macrófagos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Hainer BL. Dermatophyte infections. *Am Fam Physician* 2003; 67(1):101-8.
- 2 Kobayashi M, Ishida E, Yasuda H, Yamamoto O, Tokura Y. Tinea profunda cysticum caused by *Trichophyton rubrum*. *J Am Acad Dermatol* 2006; 54(2 Suppl):S11-3.
- 3 Evans EGV. Causative pathogens in onychomycosis and the possibility of treatment resistance: a review. *J Am Acad Dermatol* 1998; 38(5 Pt 3):S32-S56.
- 4 Murray PR, Drew WL, Korbay JGS. Superficial, Cutaneous, an Subcutaneous Mycosis. In: Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi G, Pfaller MA. *Microbiology Medical*. 3 ed. St. Louis: Mosby Co; 1997. p.566-76
- 5 Bocca AL, Brito PP, Figueiredo F, Tosta CE. Inhibition of nitric oxide production by macrophages in chromoblastomycosis: a role for *Fonsecaea pedrosoi melanin*. *Mycopathologia* 2006;161(4): 195-203.
- 5 Campos MRM, Russo M, Gomes E, Almeida SR. Stimulation, inhibition and death of macrophage infected with *Trichophyton rubrum*. *Microbes and Infect* 2005;8(2): 372-9.
- 6 Miller L, Hunt JS. Sex steroid hormones and macrophage function. *Life Sci* 1996; 59(1):1-14.
- 7 Cutolo M, Capelino S, Montagna P, Ghiorzo P, Sulli A, Villaggio B. Sex hormone modulation of cell growth and apoptosis of the human monocytic/macrophage cell line. *Arthritis Res Ther* 2005; 7(5):R1124-32.
- 8 Bouman A, Heineman MJ, Faas MM. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update*. 2005;11(4): 411-23.
- 9 Weinstein Y, Berkovich Z. Testosterone effect on bone marrow, thymus, and suppressor T cells in the (NZB 3 NZW) F1 mice: its relevance to autoimmunity. *J Immunol* 1981; 126(3):998-1002.
- 10 Ahmadi K, Mccruden AB. Macrophage may responses to androgen via its receptor. *Med Sci Monit* 2006; 12(1):15-20.
- 11 Fried LR; Bruner M, Moeslinger T, Spieckermann PG. Testosterone inhibits expression of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages. *Life Sci* 2000; 62(4):417-29.
- 12 Segal BH. Role of macrophages in host defense against aspergillosis and strategies for immune augmentation. *Oncologist* 2007; 12(Suppl 2):7-13
- 13 Chinelli PAV, Sofiatti AA, Nunes RS, Martins JE. Dermatophyte agents in the city of Sao Paulo, from 1992 to 2002. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2003;45(5): 259-63.
- 14 Fernandes NC, Akiti T, Barreiros MGC. Dermatophytoses in children: study of 137 cases. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2001; 43(2):83-85.
- 15 Gupta AK, Jain, HC, Lynde CW, Watteel GN, Summerbell RC. Prevalence and epidemiology of unsuspected onychomycosis in patient visiting dermatologists' offices in Ontario, Canada – a multicenter of 2001 patients. *Int J Dermatol* 1997; 36(10):783-7.
- 16 Silva-Tavares H, Alchorne MM, Fischman O. Tinea cruris epidemiology (Sao Paulo, Brazil). *Mycopathologia* 2001; 149(3):147-9.
- 17 Araujo AJG, Souza MAJ, Bastos OMP, Souza MAJ, Oliveira JC. Occurrence of onychomycosis among patients attended in dermatology offices in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *An Bras Dermatol* 2003;78(3): 299-308.
- 18 Moraes MS, Godoy-Martinez, P, Alchorne, MM, Boatto HF, Fischman, O. Incidence of Tinea capitis in Sao Paulo, Brazil. *Mycopathologia* 2006; 162(2):91-5.
- 19 Vilani-Moreno FR, Arruda MSP, Escudero H. Candidíase Experimental: estudo comparativo de dois Métodos de coloração vital na determinação da viabilidade dos fungos em suspensão. *Salusvita* 1999; 18(1):139-42.

- 20 Russo M, Teixeira, HC, Marcondes MC, Barbuto JA. Superoxide-independent hydrogen peroxide release by activated macrophages. *Braz J Med Biol Res* 1989; 22(10):1271-3.
- 21 Norman GR, Streiner DL. *Biostatistics - The Bare Essentials*. Hamilton. Canadian: B.C. Decker Inc; 1998. 260 p.