

## INFLUÊNCIA DA TESTOSTERONA NA ATIVIDADE MACROFÁGICA FRENTE AO *Trichophyton mentagrophytes*.

Natalia Moretti Violato, Aline Severino Guazelli, James Venturini e Maria Sueli Parreira de Arruda. – Imunologia – Ciências Biológicas. Laboratório de Imunopatologia Experimental, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências, Campus de Bauru.

Os dermatófitos compreendem um grupo de fungos filamentosos, distribuídos em três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. Esses organismos invadem tecidos queratinizados como pele, cabelos e pêlos, de seres humanos e animais, alimentando-se da queratina neles existente (HAINER, 2003). De modo geral, as infecções dermatofíticas podem abranger desde lesões não inflamatórias, até infecções crônicas, difíceis de erradicar (KOBAYASHI et al 2006).

Embora hoje se acredite que a resistência efetiva ao fungo seja multifatorial, envolvendo o funcionamento coordenado de diversos componentes do hospedeiro e características do fungo, nas últimas décadas tem-se avaliado a influência dos hormônios sexuais nesta relação. Resultados obtidos em animais e em humanos têm demonstrado que o estradiol e a progesterona influenciam vários componentes da resposta imune. As mulheres, por exemplo, exibem resposta T e B muito mais vigorosas que os homens; do mesmo modo, apesar da incidência de doenças autoimunes ser maior nas mulheres, estas se tornam menos severas durante a gravidez, possivelmente devido às mudanças hormonais dependentes desta condição (WHITACRE, 2002). Para alguns pesquisadores, o fato dos homens exibirem menor porcentagem de células T que as mulheres (GILTAY, 2000; BOUMAN 2004) estaria relacionado ao aumento da concentração de testosterona, uma vez que a mesma pode aumentar a apoptose dessas células (MCMURRAY, 2001). Segundo Ahmadi; Mccruden (2006), a testosterona atuaria também modulando a liberação de óxido nítrico e de citocinas produzidas por macrófagos. Para os autores, este efeito seria decorrentes da presença de receptores para hormônios andrógenos presentes nessas células.

Embora estas alterações tenham sido bem documentadas, a extensão e as conseqüências das mesmas para a saúde do indivíduo não se encontram bem estabelecidas. Buscando dados que permitam 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  $H_2O_2$ , a produção de óxido nítrico (NO) e das citocinas IL-10 e TNF- $\alpha$  por macrófagos provocados com *Trichophyton mentagrophytes*.

Para tanto, macrófagos peritoniais de camundongos suíços fêmeas foram cultivados ( $10^5$  células/poço) em meio RPMI contendo (ou não) testosterona ( $10^6$  nM). Após 1 hora, conídios de *Trichophyton. mentagrophytes* foram adicionados à cultura (1:1). Após 4 horas, o sobrenadante foi coletado para pesquisa de óxido nítrico (GREEN, 1981) e citocinas IL-10 e TNF- $\alpha$ . Foram conduzidos, ainda, ensaios de fagocitose (CAMPOS et al 2005) e liberação de  $H_2O_2$  (PICK; MISEL, 1981 modificado por RUSSO et al , 1989).

Nas condições ensaiadas, não detectamos liberação de óxido nítrico. De modo geral, macrófagos murinos infectados com fungos tendem a produzir altos níveis de NO, um mecanismo importante para a morte do fungo, (CANO; GONZALES, 1998). Este processo se dá, particularmente, quando estas células são estimuladas por citocinas, principalmente o INF- $\gamma$  (GONZALES, 2000), ou seja, num momento mais tardio da infecção. É possível que, nos momentos mais precoces, ou seja, 4 horas após a provocação com o fungo, a quantidade de NO produzida não tenha sido suficiente para ser detectada pelo método ensaiado. Reforçam esta premissa os dados obtidos por Campos (2005). Trabalhando com *T. rubrum*, este autor também não detectou liberação de NO até 8 horas depois da infecção de macrófagos murinos com este fungo. Em conjuntos, nossos resultados sugerem que outros mecanismos que não o NO participam da modulação das dermatofitoses nos momentos iniciais da infecção.

Estudando o papel das citocinas neste processo, verificamos que à semelhança do NO, os macrófagos peritoniais de camundongos quando provocados com *T. mentagrophytes* não liberam IL-10, uma citocina que, embora seja produzida principalmente por macrófagos ativados, exerce atividade inibidora dessas células. Embora Campos (2005) tenha detectado a presença de IL-10 por macrófagos provocados com *T. rubrum*, seu ensaio ocorreu 8 horas após a provocação com o fungo. Nossos resultados se referem ao estágio mais precoce do processo (4 horas), demonstrando que a liberação

desta citocina ocorre um estágio mais tardio e reforçam seu papel como molécula reguladora, envolvida no retorno dos macrófagos ao estado de repouso, a medida em que a infecção é erradicada (ABBAS, AK 2003).

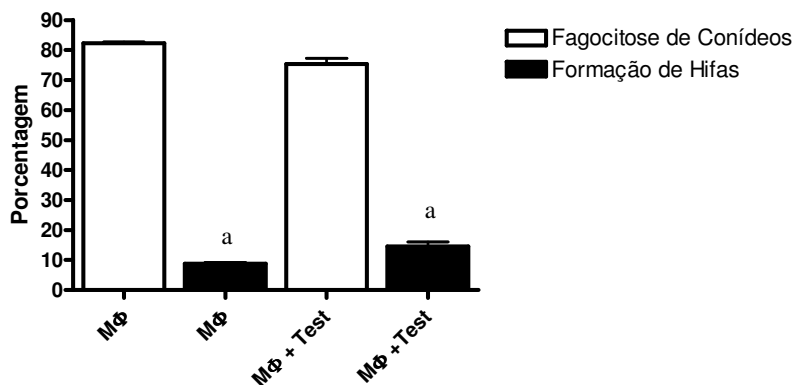
No que concerne à produção de TNF- $\alpha$ , verificamos que, embora o fungo induza a liberação dessa citocina, a adição de testosterona ao cultivo não afetou esse parâmetro. O efeito da testosterona sobre a produção de citocinas residentes no peritônio dos macrófagos já havia sido estudado por FRIED (2000). Segundo o autor, altas concentrações deste hormônio, diminuiria a produção da fita protéica correspondente à síntese de IL- $\beta$  e, assim, afetariam a produção de citocinas. Contudo, Fried utilizou concentrações hormonais 40 vezes superior às condições fisiológicas, de modo que seus dados não podem ser comparados com os nossos. Assim, nas condições ensaiadas, nossos resultados apontam que a testosterona não interfere na produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos estimulados por *T. mentagrophytes*.

Do mesmo modo, a testosterona não afetou o percentual de fagocitose dos conídios. Contudo, sua adição à cultura, resultou no aumento do número de hifas dentro dos macrófagos (Figuras 1 e 2). Trabalhando com *T. rubrum*, Campos et al (2005) demonstraram que a formação de hifas foi determinada após 6 horas de cultivo; nossos resultados sugerem que a testosterona acelerou este processo e, assim, pode atuar como fator facilitador da infecção por dermatófitos.

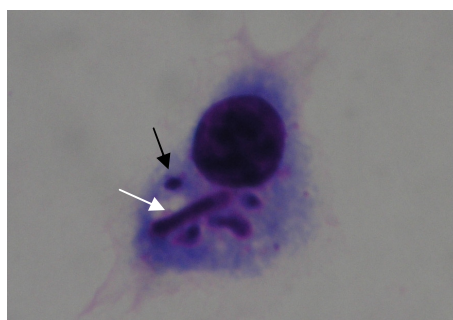
Esta premissa é reforçada pela ação inibidora que a testosterona exerceu sobre a liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tanto na presença como na ausência do fungo (figura 3), sugerindo que ação independe da presença do estímulo, no caso, dos dermatófitos. À semelhança do proposto para outros eventos, é possível que essa ação se dê a partir de receptores para a testosterona, presentes na membrana celular (MURAT). De qualquer modo, os mecanismos da ação dos hormônios sexuais sobre o metabolismo do peróxido de hidrogênio durante a atividade macrofágica não se encontram bem esclarecidos. Assim, a atuação desse hormônio poderia ainda estar relacionada à inibição de eventos que antecedem a produção da água oxigenada, (quebra da glicose 6-fosfato, a respiração mitocondrial ou produção de superóxidos) (FORMAN H J; TORRES M, 2002).

Cabe ressaltar ainda que a adição de conídios as culturas resultou no aumento expressivo da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reforçando a premissa que aponta a liberação deste metabólito como um mecanismo importante no controle da proliferação fúngica nos momentos iniciais a infecção.

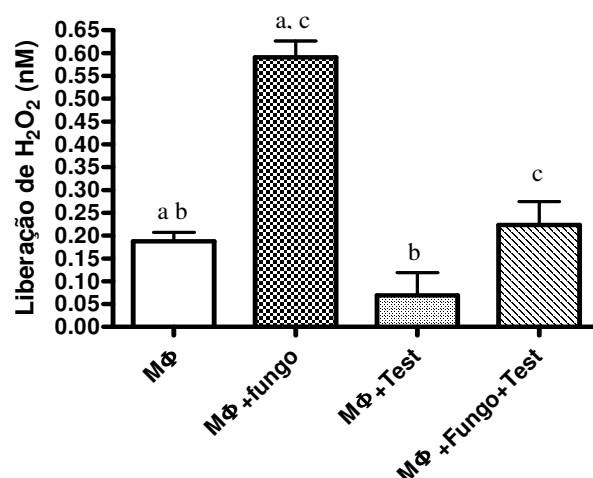
Em conjunto, nossos resultados revelam que, nos momentos iniciais da infecção, a testosterona suprime diretamente a produção e/ou liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, atuando assim, como um facilitador das infecções em geral. Além desta ação inespecífica, este hormônio atuaria ainda favorecendo o estabelecimento das dermatofitoses, por contribuir para o crescimento e diferenciação de conídios ingeridos pela célula, perpetuando assim a infecção.



**Figura 1.** Influência da testosterona na fagocitose dos conídios e na formação de hifas dentro dos macrófagos. a = MΦ vs. MΦ + Test ( $p < 0.05$ , Teste t-student).



**Figura 2.** Fagocitose de *Trichophyton mentagrophytes*. Macrófago co-cultivado em presença de conídeos de *T. mentagrophytes*. Seta escura: conídeo; seta clara: hifa (Coloração May Grunwald-Giemsa, aumento de 100X)



**Figura 3.** Influência dos conídeos do *T. mentagrophytes* ou testosterona (Test) na liberação da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por macrófagos (MΦ). a = MΦ vs MΦ+fungo (p<0,05, ANOVA); b = MΦ vs. MΦ + Test (p< 0,05); c = MΦ+fungo vs. MΦ+fungo+Test (p<0,05).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, AK; LICHTMAN, AH; POBER, JS, **Imunologia celular e molecular**, 4ed. Rio de Janeiro. Revinter, 544, 2003.

AHMADI RENANI K, MCCRUDEN AB, Effect of 5α-DHT on cytokine production by peritoneal macrophages of NZB/BALBc mice. **Medical Journal of the Islamic Republic of Iran**, v. 11, p. 223-228, 1997.

AHMADI, K; MCCRUDEN; A.B, Macrophage may responses to androgen via its receptor, **Méd Sci Monit.**, v.12, p.15-20, 2006.

ARANEO BA; DOWELL T; DIEGEL M; DAYNES RA, Dihydrotestosterone exerts influence on the production of IL- 4, IL-5 and G-INF, but not IL-2 by activated cells, **Blood**, v. 78, p 688–699, 1991.

CAMPOS, M.R.M.; RUSSO, M; GOMES, E. et al. Stimulation, inhibition and death of macrophage

infected with *Trichophyton rubrum*, **Microbes and Infection**, v. 8, p. 372-379, 2006.

CANO, L.L.; GONZALES, A. Papel del óxido nítrico en las mycosis. **Medicas UIS**, v. 12, p. 399-306, 1998.

DA SILVA, J.A, Sex hormones, glucocorticoids and autoimmunity: facts and hypotheses. **Annals Rheum Diseases**, v.54, p. 6-16, 1995.

FORMAN H J; TORRES M, Reactive Oxygen Species and Cell Signaling Respiratory Burst in Macrophage Signaling. **Am J Respir Crit Care Med**. v.166. p. S4–S8, 2002.

FRIED L R, BRUNER M, MOESLINGER T, SPIECKERMANN PG, Testosterone inhibits expression of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages. **Life Sciences**, v.62, p.417–29, 2000.

GONZALES, A; GREGORI, W; VELES, D et al. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma-interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Infect Immun**, v. 68, p. 2546-2552, 2000.

HAINER B.L; Dermatophyte infections, **AM FAM Physician**, v.67, p. 101-108, 2003.

KOBAYASHI M; ISHIDA E; YASUDA H, et al Tinea profunda cysticum caused by *Trichophyton rubrum*, **J Am Acad Dermatol**, v. 54 p. S11-3, 2006.

LIVA SM; VOSKUHL RR, Testosterone acts directly on CD4+ T lymphocytes to increase IL-10 production, **I Immunol**, v.167, 2060–2067, 2001.

PACIFICI R, RIFAS L, TEITELBAUM S ET AL, **Proc Natl Acad Sci USA**, v.84, p 461–420, 1987.

A RESTREPO, SALAZAR M E, STEVENS D A, Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect Immun**.v. 56(3), p.711–713, 1988.

SIDRIM, J.J.C.; MOREIRA, J.L.B.; Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica, **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, p. 107-108, 1999.

WANG Y, WANG L, ZHAO J, QIAO Z, Estrogen, but not testosterone, downregulates cytokine production in nicotine-induced murine macrophage, **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, v. 27, p 311–316, 2005.

WHITTACRE, C.C. Sex differences in autoimmune disease. **Nat. Immunol**. v. 2, p. 777-780, 2002.