

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Maira Eduarda Zanin

**Pneumopatia experimental : expressão gênica de Fas,
Fas-ligante, Bcl-w e citocinas em pulmões de
camundongos da linhagem BALB/c submetidos à
exposição fúngica
(*Lentinus edodes* – Shiitake e *Aspergillus fumigatus*)**

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner
2002

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Maira Eduarda Zanin

**Pneumopatia experimental : expressão gênica de Fas,
Fas-ligante, Bcl-w e citocinas em pulmões de
camundongos da linhagem BALB/c submetidos à
exposição fúngica
(*Lentinus edodes* – Shiitake e *Aspergillus fumigatus*)**

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica na Área de Ciências Básicas.

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner
2002**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Z16p Zanin, Maira Eduarda
 Pneumopatia experimental : expressão gênica de Fas, Fas-ligante,
Bcl-w e citocinas em pulmões de camundongos da linhagem BALB/c
submetidos à exposição fúngica (*Lentinus edodes* – Shiitake e
Aspergillus fumigatus) / Maira Eduarda Zanin. Campinas, SP : [s.n.],
2002.

 Orientador : Ricardo de Lima Zollner
 Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

 1. Apoptose . 2. Resposta imune. 3. Inflamação . I. Ricardo
de Lima Zollner. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

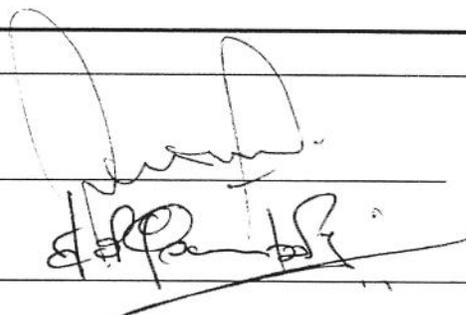
Orientador(a): *Prof.Dr. Ricardo de Lima Zollner*



Membros:

1. Professor Doutor Ericson Bagatin

2. Professor Doutor Walderez Gambale



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/08/02

200747489

“...Se alguma coisa me consome e me envelhece é que a roda furiosa da vida não me permite ter sempre ao meu lado, morando comigo, andando comigo, falando comigo, vivendo comigo, todos os meus amigos, e, principalmente os que só desconfiam ou talvez nunca vão saber que são meus amigos!”

Vinícius de Moraes

Para

Papai, Mamãe e Cindi

Aos meus pais, a quem devo a capacidade de aprender e por sempre me proporcionarem o estudo, incentivando e acreditando. Ainda quando criança, me ensinaram que essa é a maior herança que podemos receber, mas mesmo sem ele a vida é digna e por isso, menosprezar alguém por sua formação simples já mostra que na verdade não houve aprendizado. Pelo orgulho que demonstram por mim, saibam que tenho muito mais de vocês, além de respeito e admiração às pessoas que são!

À minha irmã Cindi, que pacientemente soube respeitar meu espaço e meus momentos. Sinto muito pelo tempo “roubado” de nós e por não ter vivido sua experiência acadêmica tal qual viveu a minha, entretanto, obrigado pela amizade e admiração, que são recíprocos. Espero participar de seus momentos pessoais e profissionais intensamente...

Reconhecimento

Ao prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner, pela orientação e confiança debitada em mim como profissional e pessoa, apoiando decisões e “puxando a orelha” quando necessário. Agradeço por sua dedicação como professor, ajudando em minha formação, mesmo quando “a dúvida era tanta, que existia dúvida na dúvida”, por me apresentar ao mundo acadêmico, por mostrar que a pesquisa é um caminho árduo, porém estimulante e por me acolher como parte integrante de sua equipe de pesquisa. Como pessoa, obrigada por me encorajar sempre, por seu empenho em me ajudar a ser mais confiante, sua prontidão em me ouvir nos momentos difíceis, suas manifestações de contentamento diante das conquistas.

Agradecimentos

Essas palavras não são suficientes para realmente agradecer a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho se realizasse, entretanto, algumas pessoas especiais fizeram parte de todo o processo, e que certamente sem elas esse momento jamais chegaria, portanto, vale a pena mencioná-las.

Aos Profs. Dr. Walderez Gambale e Dr. Ericson Bagatin, pela participação na banca, sugestões e comentários.

Ao prof. Dr. Walderez Gambale, por gentilmente fornecer as colônias de *A. fumigatus*.

À bióloga Márcia A. Uemura, por gentilmente fornecer os esporos de Shiitake.

Ao prof. Dr. Áureo Yamada, por ceder o microscópio para captação de imagens.

Ao prof. Dr. Kleber Gomes Franchini, por ceder o fotomicroscópio.

Ao prof. Dr. José Burtori Lopes de Faria pelo uso das instalações de seu laboratório.

Ao prof. Dr. Paulo Juazeiro, pelo auxílio na análise dos corte histológicos de pulmão.

À profa. Dra. Sara Saad, por permitir a captação de imagens de eletroforese enquanto nosso equipamento estava em conserto.

À profa. Dra. Maria Júlia Marques, por treinar e disponibilizar o uso do microscópio confocal à laser para obtenção das imagens de TUNEL.

À “Cris do Biotério”, por sempre ser prestativa.

À Patrícia da Nefrologia, por sua contribuição nas captações fotomicroscópicas.

À Renata Maia, secretária da Pós-Graduação, por sempre ser tão solícita e pelas inúmeras vezes em que resolveu todos os problemas burocráticos.

À Luciana Maluf que, apesar do sobrenome, é “gente boa” e me ensinou a perfundir os animais, procedimento tão importante nesse trabalho, além do bom-humor impagável.

À Maristela Canavezzi, pelo auxílio na análise das imagens de Feulgen.

À Letícia Dias e Ingrid Espejo, pelo companheirismo no início do trabalho. Obrigada Lelê por me ensinar a “abrir o camundongo sem fazer sujeira” e à Ingrid por me apoiar.

Aos aprimorandos Gil, Bethânia, Marcelo e Maria Júlia, cada qual a seu tempo me proporcionou momentos de alegria e incentivo.

A toda minha família (tias, tios, primas e primos) que por vezes teve que aceitar minha ausência, mas sempre esteve presente quando precisei “da força do colo”. À vovó Clotilde, vovó Zaré e vovô Bebem, desculpe pela ausência nos aniversários e obrigada pelo carinho e dedicação, tão importantes e reconfortantes. Esse trabalho também é uma conquista de vocês! Ao Rodolfo e Hiago, meus amores, pelas risadas e brincadeiras tão inocentes e edificantes.

À Conceição Conceixan, que no início era a pessoa que me ensinava a ter confiança em mim e mexia carinhosamente nos meus cabelos, e, de súbito tornou-se minha referência de dignidade e caráter! Nossa relação pessoal transcende a profissional, sendo hoje minha grande amiga, de quem ouço sempre as piores e melhores críticas profissionais e pessoais, que às vezes me trata como irmã mais nova, outras como mais velha, de quem jamais poderei duvidar do quanto acredita em mim, pois “joga confetes” quando mereço e me traz à dura realidade quando necessito, enfim, é a irmã mais velha que não tive por laços sangüíneos, mas por laços mais fortes e pessoais. Além de ter me ajudado incansavelmente na leitura das mais de 200 lâminas, na coleta de materiais, nas críticas ao texto final....

À Gláucia, ou Glau Glau para os íntimos, com quem brigo infinitas vezes (porquê sabemos que ainda não acabou), que a cada dia me dá um novo apelido, e junto, uma nova bronca, um novo incentivo, apoio, carinho e, principalmente, novas demonstrações de amizade e companheirismo. Sem a Glau, eu jamais admiraria “aquele monte de células juntas”, não teria as primeiras pranchas com fotos histológicas e nem passaria madrugadas e madrugadas na Unicamp. Perdi as contas de quantas vezes saímos de lá às 2, 3 horas da manhã por conta dos meus procedimentos intermináveis e dos relatórios Fapesp, nos quais sempre tive seu apoio e crítica, além da paciência e calma, que me deixavam impaciente e irritada, e da impaciência e irritação, que me acalmavam e me colocavam “no meu lugar”, afinal de contas, “quem não pensa, sofre”. Sem esquecer as discussões em mesa de bar, onde descobrimos soluções para vários problemas. São tantos os “itens” em que tenho que agradecer a Gláucia que o melhor a fazer é me oferecer, oficialmente, a ajudá-la sempre. Segundo Glau, “as coisas só dão certo quando chega o final”, se for assim, tomara que nossa amizade nunca dê certo!

À Danielle, minha companheira de mestrado. Mas é só isso?! Claro que não Daninha (risos de quem adora atormentar uma ansiosa), agradeço pelos quase 10 anos de convivência, que nos últimos 4 se tornou diária, compartilhamos as mesmas dúvidas, medos e conquistas desde o aprimoramento, vibrando pelas alegrias uma da outra, discutindo às vezes, mas nos divertindo muitas outras. Não me esquecerei das PCRs, gráficos, coleta de imagens, críticas e sugestões em que sempre me ajudou, além, é claro, das mesas de bar, almoços, brincadeiras, bons e maus momentos, dedicação, demonstrações de afeto e carinho, enfim, todas as situações que constroem a amizade entre duas pessoas, por tempo indeterminado.

À Rika Likinha, única japonesa “paraguiaia” que conheço, por ser e estar presente desde que se “afilhou” ao LICA, sempre solícita, companheira e amiga. Suas contribuições durante os procedimentos práticos e nas leituras e releituras do texto final foram fundamentais.

À Paulinha, que além de ser amiga e companheira de laboratório, é minha médica de plantão, ouvindo, acompanhando, me emprestando artigos e artigos, e por deixar o laboratório mais leve, com sua alegria inconfundível.

À Meguinha, nossa, não consigo “inventar” palavras, pois as que existem não são suficientes pra agradecer tudo o que faz por mim. Dizem que sentimentos não se agradecem, se retribuem, então, Meguinha, retribuo todo o carinho, afago, afeto, amizade e amor !

À profa. Dra. Neusa Osti, que ganhou a referência amiga, sem perder o “status” de professora, pois continua a me ensinar a cada conversa. Obrigada por acreditar sempre, me apoiar incondicionalmente, por seu “investimento” em mim, e, principalmente, por seu carinho. Devo a ela o meu interesse pela imunologia e a capacidade de ver a beleza, quase que poeticamente, de uma resposta imunológica (“Isso é belo!”).

Chegou a vez da Ariane (‘Ri), que incansavelmente participou de todas as etapas, sendo crítica, paciente e amiga, nos bons e maus momentos, muitas vezes disponibilizando o “Orfeu Júnior e Orfeu Teen” para digitação e impressão desde o projeto até a última versão, além de fazer observações valiosas no texto final. Nesse momento, um “filme” faz recordar as primeiras lágrimas de felicidade pela aprovação da bolsa de estudos, as lágrimas pelas frustrações, as mesas de bar para comemoração dos resultados, as broncas quando o desânimo batia, seguidas por palavras de consolo e incentivo, além do “treinamento” paciente para apresentação. Quero poder fazer o mesmo nos seus momentos...Com essa socióloga, que acabou virando “sociocêutica” de tanto me ouvir, aprendi que, às vezes, o “Mundo é pequeno e mal freqüentado”, porém, cada pessoa tem em sua história algo para ensinar.

Juntamente à Ariane, devo muito ao Turati (Tu), que me ouviu tantas vezes, me ensinou a lidar melhor com o universo digital, teve participação fundamental na focalização de fotos de “bolinhas roxas e vermelhas” em madrugadas `a fio, além de, muitas vezes, me alimentar com seus jantares maravilhosos, agüentando meu mau-humor, me “irritando” com seu “Hã...burger” até me deixar de bom-humor, e “liberando” a ‘Ri para as nossas madrugadas de reflexão...

À Daniela (Danão), agradeço muito pela paciência nos meus instantes de impaciência (“Calma Mairão!”) incentivo e consolo, além de seu bom-humor e confiança contagiantes. Obrigada por zelar por minha “saúde mental” como psicóloga, mas principalmente como amiga, que sempre esteve presente em todas as mesas de bar, para ouvir, brigar, apoiar, rir, comemorar ...E por me ensinar que as pessoas são diferentes, e reconhecer a individualidade é o primeiro passo para o respeito.

Impossível esquecer de Bia (Bião), Luis Fernando (Luciferzinho), Marcinho, Paty, Rosa e Viviane. A Bião, obrigada pelas longas conversas, às vezes só pelo telefone, que animam e fazem sorrir só de lembrar (“ic, Lua vai, ic, Lua vem, ic, ‘tô ficando tonta”), pela amizade desde os tempos de faculdade, quando na república aprendemos a conviver com “fusos horários” diferentes e pela calma e paciência, tão presentes nela...Luciferzinho e Marcinho, meus “provocadores” de plantão, obrigada por me considerarem

integrante dos “pinhalenses”, isso é muito importante, mas “uma coisa é uma coisa, outra coisa é outra coisa!” e “eu venho sempre aqui, sim!” À Paty, por demonstrar amizade e fidelidade em tão poucos, mas intensos, momentos e por sempre me levar pra frente com sua frase “Vamos, evolui”. À “PodeRosa”, por ser amiga, incentivadora, carinhosa e por fundamentais “pres’tenção”. Quanto à Vivi, obrigada por momentos de descontração e conforto, que por vezes foram recheados de “Araras” estridentes, mas muito saudosas, e pela aconchegante sensação de amizade.

À Simone Sips, a irmãzinha que encontrei na faculdade e me acompanha até hoje, e “mesmo que o tempo e a distância digam não” nossa amizade me proporciona momentos de felicidade e a sensação de que esse é o melhor sentimento que duas pessoas podem compartilhar. Além disso, ainda me apresentou à Deisi, que deixou de ser só a mãe da Simone para se tornar a amiga que muitas vezes, no início desse trabalho, me “obrigou” a comer e dormir.

À Nádia (Nadião), que me fez rir com seu “nordestinês” em momentos críticos, discutindo e fazendo observações relevantes durante a fase de biologia molecular, além de se tornar minha amiga nos momentos “extra-Unicamp”, dividindo o apartamento e sempre me lembrando, no seu mau-humor bem humorado matinal, que o “Bom Dia” era pra mim....

Tenho que agradecer novamente, agora em conjunto, à ‘Ri, Tu, Danão, Glau, Daninha, Bião, Luciferzinho, Marcinho, Nadião, Rosa, Vivi e galera da Lu por todas as vezes que fizeram (e fazem) a minha história no dia-a-dia, noite-a-noite nas mesas de bar e festas na Chácara da Lu. Cada um dos momentos vividos teve sua importância na execução desse trabalho...

Não poderia deixar de agradecer às professoras e funcionárias do Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da PUCCAMP, pois foi lá que me tornei profissional e encontrei os primeiros incentivos para seguir a vida acadêmica.

À todos os professores que já passaram pela minha vida, sem eles, certamente, eu nunca chegaria aqui!

Finalmente, a todos os animais experimentais, que têm sua vida em função de proporcionar os avanços da ciência e suas aplicações em benefício de seres humanos!

E à FAPESP, pelo apoio financeiro.

Sumário

| | |
|---|-----------|
| ÍNDICE DE FIGURAS | 27 |
| LISTA DE ABREVIATURAS | 29 |
| RESUMO | 33 |
| ABSTRACT | 35 |
| | |
| I. INTRODUÇÃO | 37 |
| | |
| I.I. <i>LENTINUS EDODES</i> – COGUMELO SHIITAKE | 38 |
| I.I.1. REAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE PROVOCADAS PELO SHIITAKE | 39 |
| | |
| I.II. FUNGO <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i> | 40 |
| I.II.1. LESÕES PULMONARES PROVOCADAS PELO <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i> | 41 |
| | |
| I.III. APOPTOSE | 44 |
| I.III.1. ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA APOPTOSE | 45 |
| I.III.2. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS | 45 |
| I.III.3. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES | 46 |
| | |
| II. OBJETIVOS | 48 |
| | |
| III. MATERIAL E MÉTODOS | 50 |
| | |
| III.I. GRUPOS DE ANIMAIS | 51 |
| | |
| III.II. PREPARO DE SUSPENSÃO PARA INALAÇÃO | 51 |
| III.II.1. SOLUÇÃO FISIOLÓGICA | 51 |
| III.II.2. ESPOROS DE <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i> | 51 |
| III.II.3. ESPOROS DE <i>LENTINUS EDODES</i> – SHIITAKE | 52 |
| | |
| III.III. NEBULIZAÇÃO DOS ANIMAIS | 52 |
| | |
| III.IV. COLETA DE MATERIAL | 54 |
| | |
| III.V. EXTRAÇÃO DE CÉLULAS ESPLÊNICAS | 55 |
| | |
| III.VI. CRIOCORTES PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA | 55 |
| | |
| III.VII. REAÇÃO DE FEULGEN | 56 |
| | |
| III.VIII. REAÇÃO DE TUNEL PARA DETECÇÃO DE APOPTOSE | 57 |

| | |
|--|-----------|
| III.IX. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL (TRNA) | 59 |
| III.X. PRECIPITAÇÃO DO RNA TOTAL (TRNA) | 60 |
| III.XI. ANÁLISE DO TRNA EXTRAÍDO | 60 |
| III.XII. TRANSCRIÇÃO REVERSA DO TRNA EXTRAÍDO (SÍNTESE DE cDNA) | 60 |
| III.XIII. AMPLIFICAÇÃO DO cDNA POR REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR) | 61 |
| III.XIV. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE mRNA (PRODUTOS DE PCR) POR ELETROFORESE | 62 |
| III.XV. ANÁLISE ESTATÍSTICA | 63 |
| IV.RESULTADOS | 65 |
| IV.I. ANÁLISE COMPORTAMENTAL DOS ANIMAIS DURANTE A INALAÇÃO | 66 |
| IV.II. ASPECTOS PULMONARES MACROSCÓPICOS | 66 |
| IV.III. HISTOLOGIA PULMONAR | 66 |
| IV.IV. REAÇÃO DE FEULGEN | 67 |
| IV.V. ANÁLISE QUALITATIVA DE APOPTOSE ATRAVÉS DA TÉCNICA TUNEL | 69 |
| IV.VI. RT-PCR | 72 |
| IV.VI.1. EXPRESSÃO DE mRNA DE CITOCINAS T_H1 E T_H2 EM PULMÕES | 72 |
| IV.VI.2. EXPRESSÃO DE mRNA DE CITOCINAS T_H1 E T_H2 EM CÉLULAS ESPLÊNICAS | 72 |
| IV.VI.3. EXPRESSÃO DE mRNA DE COMPONENTES APOPTÓTICOS EM PULMÃO | 73 |
| IV.VI.4. EXPRESSÃO DE mRNA DE COMPONENTES APOPTÓTICOS EM CÉLS. ESPLÊNICAS | 73 |
| V.DISSCUSSÃO | 78 |
| VI.CONCLUSÕES | 86 |
| VII.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 88 |

Índice de Figuras

| | |
|--|-----------|
| FIGURA 1: CÂMARA INALATÓRIA | 53 |
| FIGURA. 2: ESQUEMA DOS CORTES HISTOLÓGICOS | 58 |
| PRANCHA I – COLORAÇÃO HE EM CORTES HISTOLÓGICOS DE PULMÃO | 68 |
| FIGURA 3: GRÁFICOS DE CELULARIDADE EM PULMÕES | 70 |
| PRANCHA II – COLARAÇÃO FEULGEN E TUNEL EM CORTES HISTOLÓGICOS DE PULMÃO | 71 |
| FIGURA 4: GRÁFICOS DE CITOCINAS EM PULMÃO E CÉLULAS ESPLÊNICAS | 74 |
| FIGURA 5: GRÁFICOS DE COMP. APOPTÓTICOS EM PULMÃO E CÉLULAS ESPLÊNICAS | 76 |

Lista de Abreviaturas

| | |
|-----------------------|---|
| <i>A. fumigatus</i> : | <i>Aspergillus fumigatus</i> |
| ABPA: | Aspergilose Bronco-Pulmonar Alérgica |
| Af: | <i>Aspergillus fumigatus</i> |
| APC: | Célula Apresentadora de Antígenos |
| Caspases: | “cysteinyll <i>aspartate</i> -specific proteinases” |
| CD: | Células Dendríticas |
| cDNA: | DNA complementar |
| CEMIB: | Centro de Bioterismo da UNICAMP |
| DEPC: | DietilPiroCarbonato |
| DNA: | Ácido Desoxirribonucléico |
| dNTP: | Nucleotídeo Tri-Fosfato |
| DTH: | Hipersensibilidade do tipo tardia |
| EDTA: | Ácido Etilendinitrilotetracético |
| Fcε: | Receptor para região Fc de IgE |
| GAf: | Grupo <i>Aspergillus fumigatus</i> |
| GC: | Grupo Controle |
| GSh: | Grupo Shiitake |
| HCl: | Ácido Clorídrico |
| HE: | Hematoxilina-Eosina |
| IFN-γ: | Interferon Gama |
| IgA: | Imunoglobulina A |
| IgE: | Imunoglobulina E |
| IgG: | Imunoglobulina G |
| IL: | Interleucina |
| ip: | Intraperitoneal |
| IPA: | Aspergilose Pulmonar Invasiva |
| it: | Intratraqueal |
| iv: | Intravenoso |
| LE: | Extrato aquoso do micélio de Shiitake |

| | |
|-------------------|--|
| LTc: | Linfócito T citotóxico |
| mRNA: | RNA mensageiro |
| NK: | Célula “Natural Killer” |
| OD: | Densidade Óptica |
| pa: | pró-análise |
| PAF: | Fator Ativador de Plaquetas |
| pb: | Pares de bases |
| PBS: | Tampão Salina Fosfato |
| PCD: | Morte Celular Programada |
| PCR: | Reação de Polimerase em Cadeia |
| PMC: | Células Mononucleares Periféricas |
| PMN: | Polimorfonucleares |
| RNA: | Ácido Ribonucléico |
| RT-PCR: | Reação de Polimerase em Cadeia por Transcrição Reversa |
| SK-2: | Extrato alcoólico de micélio de Shiitake |
| SPF: | Sala livre de patógenos específicos |
| TBE: | Tampão Tris Borato-EDTA |
| T _H 1: | Linfócito T auxiliar do tipo 1 |
| T _H 2: | Linfócito T auxiliar do tipo 2 |
| TNF- α : | Fator de Necrose Tumoral Alfa |
| TNF-R: | Receptor de Fator de Necrose Tumoral |
| TRNA: | RNA Total |
| TUNEL: | “TdT-mediated dUTP Nick End Labeling” |
| UA: | Unidades Arbitrárias |
| UV: | Luz Ultra Violeta |

Resumo

Atualmente, o interesse pelas reações provocadas pelo fungo *Lentinus edodes*, cogumelo Shiitake, tem aumentado acompanhando sua popularidade nos países do Ocidente, onde ele é cada vez mais empregado na culinária e como “elixir de boa saúde”. Paralelamente, tem crescido o número de relatos de reações alérgicas provocadas pelo consumo e manuseio do cogumelo, principalmente em produtores, que entram em contato com os esporos, facilmente inalados, e desenvolvem reações como tosse, calafrios e febre após o contato.

As respostas iniciadas após a exposição fúngica devem-se aos sistemas de modulação da resposta imune, tais como subtipos de célula T recrutados para a resposta (T_H1 ou T_H2), tipos de citocinas secretadas e apoptose. Nosso estudo foi direcionado para a observação dos mecanismos de resistência e susceptibilidade às reações pulmonares e sistêmicas (células esplênicas) contra o Shiitake, baseados na expressão gênica das citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-12, TNF- α e IFN- γ , e componentes apoptóticos Fas, Fas-Ligante (Fas-L) e Bcl-w nos camundongos BALB/c submetidos à exposição de esporos de Shiitake e *Aspergillus fumigatus*, utilizado como parâmetro de comparação, uma vez que as reações por ele provocadas são amplamente descritas na literatura. Dessa forma, os resultados obtidos evidenciam a modulação direcionada para células T_H1 provocadas pelos esporos de Shiitake e *Aspergillus fumigatus* nos animais estudados, com expressão aumentada das citocinas IL-12, TNF- α e IFN- γ , tanto local quanto sistemicamente, além do aumento de linfócitos nos pulmões. O estudo dos componentes apoptóticos revelou a expressão da molécula Fas apenas nos pulmões e células esplênicas dos animais expostos aos esporos de Shiitake e *Aspergillus fumigatus*, com observação de apoptose *in situ* pelas técnicas de Feulgen e TUNEL realizadas nos pulmões desses animais, sugerindo a modulação desses fungos na ocorrência da apoptose.

Abstract

The *Lentinus edodes* (Shiitake mushroom) is one of the most popular edible mushrooms in the world. The indoor cultivation of Shiitake can lead to allergic symptoms in mushroom workers, in contrast to outdoor cultivation where problems occur sporadically. Simultaneously, growth-related allergic reactions elicited by the consumption and handling of this mushroom, mainly between workers who inhaled the spores released during manipulation of Shiitake. These spores reaching the terminal area of the lung produce symptoms that suggest a delayed hypersensitivity reaction with clinical symptoms of dyspnea, cough, chills, and fever.

The immune response after fungal exposure is attributed to the modulation of this response by the T cell subsets recruited (T_H1 or T_H2), cytokine release and apoptosis. The aim of this study was to verify the resistance and susceptibility to the Shiitake by analyzing the molecular expression of cytokines IL-2, IL-4, IL-5, IL-12, TNF- α and IFN- γ and apoptotic components Fas, Fas-L and Bcl-w, in lung and spleen cells of BALB/c submitted to Shiitake and *Aspergillus fumigatus* spores exposure, as a positive control of response.

We found an overexpression of cytokines IL-12, TNF- α , and IFN- γ , in both compartments, systemic and locally (spleen cells and lung respectively), moreover, the lymphocytes were increased, suggesting the T_H1 driving response evoked by exposure to *Aspergillus fumigatus* and Shiitake spores. The study of apoptotic components demonstrated the expression of Fas only in lung and spleen cells of exposed animals to spores. The presence of apoptosis in lung was confirmed by the Feulgen and TUNEL techniques, suggesting the fungal modulation of apoptosis.



I. INTRODUÇÃO

I.I. *LENTINUS EDODES* – COGUMELO SHIITAKE

O cogumelo *Lentinus edodes*, pertencente à classe Basideomicota, família *Tricholomataceae*, coloniza madeiras mortas, ocorrendo naturalmente no Japão e China na árvore Shii¹. É atualmente o segundo cogumelo comestível mais produzido e consumido no mundo, sendo recomendado para se ter “vida longa”, de acordo com a Medicina Chinesa e, no Japão acredita-se que o Shiitake é um “elixir de boa saúde” (JONG & BIRMINGHAM *et al.*, 1993).

Diversos estudos demonstraram que esse cogumelo possui proteínas, gorduras, carboidratos, vitaminas e sais minerais (JONG & BIRMINGHAM *et al.*, 1993) e, segundo KLEINSCHMIDT (1972), a administração intraperitoneal (ip) do extrato aquoso dos esporos em camundongos infectados com o vírus da encefalite equina, induz a produção de Interferon (IFN), reduzindo a mortalidade desses animais.

Um polissacarídeo obtido de extratos dos esporos do cogumelo melhora as defesas do hospedeiro, promovendo a proteção contra infecções. Esse polissacarídeo foi denominado *Lentinan* e comprovou-se que além de aumentar a produção de Interleucina 1 (IL-1) pelos monócitos, potencializando a diferenciação, maturação e proliferação dos linfócitos T citotóxicas (LT_C) e células *Natural Killer* (NK), também acelera a produção de IL-2 pelos linfócitos T auxiliares (LT_H) (JONG & BIRMINGHAM *et al.*, 1993; NAKAMURA, 1992). MATTILA *et al.* (2000) também descrevem aumento de resistência do hospedeiro contra infecções bacterianas e fúngicas após administração de *Lentinan*, através da indução de IFN. MIYAKOSHI *et al.* (1984) demonstraram aumento nos níveis de IFN no soro de pacientes com câncer após administração de *Lentinan*, com conseqüente aumento da atividade de células NK.

¹ de onde se origina seu nome popular Shiitake –cogumelo da árvore Shii

A administração de Lentinan inibe o crescimento de tumores transplantados em animais experimentais devido suas ações antitumorais, como aumento de células NK e LTc e das respostas de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) contra os antígenos tumorais (LIU M *et al.*, 1998).

Estudos *in vitro* com esplenócitos murinos e células mononucleares periféricas humanas (PMC) tratadas com outro complexo polissacarídeo (LE) proveniente de culturas do micélio do Shiitake demonstraram aumento significativo na expressão gênica de TNF- α e IL-2. O polissacarídeo KS-2, preparado a partir da precipitação com etanol de extratos do micélio, induzem a produção de IFN em camundongos após administração intraperitoneal ou oral, suprimindo o crescimento do Sarcoma 180 nesses animais (LIU F *et al.*, 1999; LIU M *et al.*, 1998; LIU F *et al.*, 1996).

Sabe-se que esses polissacarídeos provenientes do Shiitake aumentam a resposta imunológica pela modulação das células imunes, entretanto, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não estão claros (LIU M *et al.*, 1998).

I.I.1. REAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE PROVOCADAS PELO SHIITAKE

Atualmente na literatura tem crescido o interesse pelas pneumonite de hipersensibilidade ao Shiitake, sendo a mais descrita a alveolite alérgica extrínseca, além das reações alérgicas como a dermatite, que acometem consumidores e produtores devido ao manuseio do cogumelo (NAKAMURA, 1992; VAN LOON *et al.*, 1992).

As dermatites apresentam-se clinicamente por pápulas eritematosas sistêmicas seguidas de prurido intenso principalmente no tronco, extremidades, face e pescoço dos indivíduos expostos, com duração de aproximadamente 9 dias, sendo que a biópsia das pápulas demonstra

células epidérmicas degeneradas, infiltrado perivascular de linfócitos, eosinófilos e neutrófilos. Acredita-se que essa dermatite seja provocada por um polissacarídeo semelhante ao Lentinan, porém, com atividade tóxica (NAKAMURA, 1992).

A inalação dos esporos de Shiitake é facilitada pelo seu diâmetro (entre 4-8 μm), levando ao desenvolvimento de alveolite alérgica extrínseca, cujos sintomas aparecem entre 5 a 8 horas após a exposição sendo os principais, dispnéia, tosse, calafrios e dores musculares. Nos pacientes expostos tem-se redução de anticorpos IgG1 específicos quando comparados com grupos controle, devido a alta produção de IgE específica em resposta a ativação de linfócitos T auxiliar do tipo 2 (T_H2) e liberação de IL-5 (SAKULA, 1967; VAN LOON *et al.*, 1992; HORNER *et al.*, 1993; MURAKAMI *et al.*, 1997; KURUP *et al.*, 1997).

No Japão e na China, onde esse cogumelo é amplamente cultivado, aproximadamente 9% dos produtores expostos durante o manuseio do fungo apresentam sintomas asmáticos (SENTI *et al.*, 2000), entretanto, pouco se conhece sobre os mecanismos de regulação de citocinas exercidos por esses cogumelos.

I.II. FUNGO *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

As espécies do gênero *Aspergillus* apresentam como características gerais a formação de conidióforos simples, capazes de liberar no ambiente esporos entre 2-3 μm de diâmetro que podem ser facilmente inalados² (LACAZ *et al.*, 1991).

A espécie *Aspergillus fumigatus* (A.f.) é freqüentemente relacionada a manifestações clínicas humanas, sendo que a primeira descrição de Aspergilose humana data de 1856. São fungos oportunistas por excelência, podendo provocar infecções em diversos órgãos e processos

² de onde se originou o nome do gênero (do latim *aspergere* – aspergir)

alérgicos. A forma clínica mais freqüente provocada por esses fungos é a pulmonar, com quadros anatomoclínicos variados (LACAZ *et al.*, 1991, ROILIDES *et al.*, 1998)

I.II.1. LESÕES PULMONARES PROVOCADAS PELO *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

Diversas manifestações pulmonares têm sido descritas como secundárias à exposição ao *Aspergillus fumigatus* como as encontradas na asma brônquica, aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) e aspergilose pulmonar invasiva (IPA) (RINALDI, 1983; KURUP *et al.*, 1997). Os conídeos do *Aspergillus fumigatus* possuem aproximadamente 2,5-3,0µm de diâmetro e a estrutura de sua parede celular não é completamente conhecida, mas análises químicas indicam a presença de glucanas, quitina e galactomananas (ROILIDES *et al.*, 1998; HEARN & SIETSMA, 1994). Ao serem inaladas, estas estruturas chegam aos alvéolos através do trato respiratório e, se não forem eliminados pelos movimentos mucociliares, podem iniciar o processo de colonização no hospedeiro (ROILIDES *et al.*, 1998).

Estudos demonstram que a fixação do conídeo ao epitélio ou à membrana basal subepitelial pulmonar é o passo chave para a invasão e colonização fúngica. A fixação no tecido hospedeiro é possivelmente mediada por receptores para o fibrinogênio e/ou laminina (de natureza glicoprotéica) presentes na superfície do conídeo (ROILIDES *et al.*, 1998; BROMLEY & DONALDSON, 1996). O fibrinogênio é uma das principais proteínas plasmáticas envolvidas nas respostas inflamatórias e sua deposição no epitélio pulmonar forma sítio de ligação para os receptores nos conídeos (ROILIDES *et al.*, 1998; ANNAIX *et al.*, 1992; COULOT *et al.*, 1994). Da mesma forma, pode ocorrer interação entre um dos componentes estruturais da membrana basal e matriz extracelular e receptores expressos nos conídeos em repouso. Esses receptores

desaparecem gradativamente durante o desenvolvimento até a germinação de hifas (ROILIDES *et al.*, 1998; TRONCHIN *et al.*, 1997).

Após a fixação às células pulmonares, o conídeo inicia a germinação para a formação de hifas (formas invasivas do fungo), com subsequente produção de proteases e fosfolipases. Essas enzimas podem provocar a digestão das junções intercelulares e a hidrólise das membranas celulares, facilitando a penetração nas barreiras alveolares e invasão do tecido pulmonar, iniciando-se, deste modo, a infecção pelo fungo (KOLATTUKUDY *et al.*, 1993; MONOD *et al.*, 1993; BIRCH *et al.*, 1996; RODRIGUEZ *et al.*, 1997; ROILIDES *et al.*, 1998).

Com a chegada dos conídeos aos pulmões, a resposta imune inata do hospedeiro ativa duas linhas de defesa para evitar a instalação da infecção: macrófagos pulmonares e fagócitos do sangue periférico. Os macrófagos alveolares fagocitam e destroem os conídeos em repouso, evitando a formação de hifas. Esses macrófagos possuem pouca capacidade de produzir metabólitos oxigênio-dependentes, entretanto, têm potente atividade fagocítica, além de produzirem proteínas catiônicas e enzimas antifúngicas.

No caso de alguns conídeos escaparem aos macrófagos alveolares e formarem hifas, os fagócitos circulantes (polimorfonucleares -PMN- e monócitos) também liberam seus metabólitos não oxidativos, metabólitos antifúngicos mieloperoxidase-dependentes e proteínas catiônicas capazes de destruir as hifas, evitando a doença invasiva. A atividade antifúngica dos monócitos não é tão potente quanto à dos PMN, mas em compensação, quando essas células entram em contato com componentes da parede celular do fungo (como as manoproteínas), ocorre a secreção de IL-1 e Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) (SHAFFNER *et al.*, 1982; DIAMOND *et al.*, 1983; WALDORF *et al.*, 1984; CENCI *et al.*, 1998; ROILIDES *et al.*, 1998).

As citocinas pró-inflamatórias, particularmente o TNF- α , desempenham papel central no recrutamento de células para os pulmões. Camundongos susceptíveis à IPA apresentam diminuição nos níveis de TNF- α e no modelo murino de Criptococose pulmonar, o TNF- α endógeno possui efeito protetor devido a indução de IL-12, que regula positivamente a secreção de Interferon γ (IFN- γ) pelas células T e Células NK, resultando em reações inflamatórias do tipo linfócitos T auxiliar 1 (T_H1). A administração de IFN- γ em camundongos tem efeito protetor contra a IPA devido a sua propriedade de potencializar as respostas oxidativas das células fagocíticas contra as hifas do *Aspergillus fumigatus* (BERNHISEL-BROADBENT *et al.*, 1991; ROILIDES *et al.*, 1993, 1994, 1995, 1996; KAWAKAMI *et al.*, 1996; KURUP *et al.*, 1998; CENCI *et al.*, 1998).

Por outro lado, as citocinas produzidas pelos LT_H1 (IFN- γ e IL-12) e LT_H2 (IL-4, IL-5) possuem efeitos opostos sobre os fagócitos (CENCI *et al.*, 1998), e a predominância de um subtipo celular sobre o outro determina o curso da resposta imune. Como mencionado anteriormente, as citocinas derivadas do subtipo celular T_H1 geram efeitos que levam à resistência do hospedeiro, enquanto as respostas do tipo T_H2 levam à susceptibilidade a infecção pelo *A. fumigatus*, com diferentes manifestações.

O desenvolvimento de alergia a esse fungo depende do modo e frequência de exposição. O *A.f.* libera na árvore brônquica diversos antígenos, que são processados e apresentados pelas células apresentadoras de antígeno (APC) às células T. A ativação das células T provoca a produção de citocinas que em pacientes asmáticos leva à ABPA, caracterizada por eosinofilia periférica, reatividade cutânea imediata ao antígenos *A.f.* e aumento de IgE total e específica. Essas reações são resultado da produção de citocinas pelas células T_H2, como IL-4, IL-5, IL-10 e

IL-13 (GREENBERGER, 1994; BROWN *et al.*, 1995; ABBAS *et al.*, 1996; BORISH & ROSENWASSE, 1996; GRUNIG *et al.*, 1997; KURUP *et al.*, 1998).

A IL-4 age sobre o linfócito B induzindo a produção de IgE específica (KURUP *et al.*, 1998). As células envolvidas na resposta alérgica em casos de ABPA são predominantemente T_H2, mastócitos e eosinófilos. Com a ligação do antígeno ao anticorpo IgE específico presente na membrana do mastócito através dos receptores Fcε, ocorre a degranulação dessa célula e liberação de mediadores inflamatórios, como a histamina, leucotrienos e fator ativador de plaquetas (PAF), entre outros, que induzem a contração do músculo liso dos brônquios e aumento da permeabilidade vascular, permitindo a chegada de um número cada vez maior de células no local da degranulação. O leucotrieno B4 e o PAF são moléculas quimiotáticas para os eosinófilos, e como a IL-5 promove a maturação e diferenciação de eosinófilos na medula óssea, essas células estarão presentes em número aumentado nos locais de injúria (KURUP *et al.*, 1998). Por sua vez, IL-4 e IL-5 induzem também a expressão de receptores para região Fc de IgA e IgE na superfície dos eosinófilos (BRACKE *et al.*, 1997). Na ABPA, os anticorpos anti-*Aspergillus* IgA e IgE ligam-se aos eosinófilos através desses receptores e provocam a liberação dos mediadores inflamatórios, levando à resposta alérgica mediada por eosinófilos nos pulmões.

I.III. APOPTOSE

A apoptose, ou morte celular programada (PCD), é um importante mecanismo de controle entre diferenciação e proliferação celular, sendo fundamental para a manutenção de organismos multicelulares (GAVRIELI *et al.*, 1992). Esse fenômeno está presente em diversos sistemas do organismo e tem papel central no controle das respostas imunológicas, sendo responsável pela eliminação de células imunes após a resposta imunológica, favorecendo o

retorno à homeostasia. Dessa forma, atualmente o estudo desse processo nas reações imunológicas elaboradas contra fungos vem sendo cada vez mais empregado para compreensão dos mecanismos responsáveis pelo sucesso ou não na eliminação desses agentes.

I.III.1. ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA APOPTOSE

A apoptose ocorre tipicamente em células individuais, ou pequenos grupos de células, sem que ocorram alterações na organização tecidual ao redor da célula apoptótica. As alterações morfológicas são rápidas e por isso, dificilmente observadas nos tecidos.

A principal característica da célula apoptótica é a retração, que provoca a perda de contato com células vizinhas, seguida de condensação do citoplasma, compactação das organelas celulares, picnose nuclear e formação de massas de cromatina ao redor da membrana nuclear. Na membrana plasmática das células apoptóticas encontram-se numerosas vesículas (também chamadas corpos apoptóticos) contendo fragmentos nucleares e organelas intactas, que são rapidamente fagocitados pelas células vizinhas ou macrófagos, sem causar reações inflamatórias nas células vizinhas (GAVRIELI *et al.*, 1992; GRANVILLE *et al.*, 1998).

I.III.2. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

O acontecimento bioquímico mais marcante na apoptose envolve o DNA nuclear. Inicialmente ocorre clivagem do DNA em fragmentos de elevado peso molecular, que provavelmente representam fragmentos de cromatina condensada. Posteriormente ocorre rápida clivagem internucleossômica do DNA por enzimas ativadas durante o processo (GAVRIELI *et al.*, 1992). Esses fragmentos formam o padrão característico designado por “DNA em escada”³

³ DNA “ladder”

observado na eletroforese em gel de agarose. Contudo, este padrão não pode ser definido como exclusivo para a degradação do DNA apoptótico já que a clivagem aleatória de DNA e degradação das histonas em células com ultraestrutura típica de necrose também se traduz como padrão de rasto na corrida eletroforética, colocando em dúvida a utilização isolada da degradação do DNA para caracterização da apoptose (COLLINS *et al.*, 1992).

I.III.3. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES

As principais vias moleculares efetoras/moduladoras da apoptose envolvem as moléculas Fas, Fas Ligante (Fas-L), Fator de Necrose Tumoral (TNF), Receptor-Fator de Necrose Tumoral (TNF-R), Família das caspases e família Bcl-2 (GRANVILLE *et al.*, 1998).

A molécula Fas é uma proteína transmembrana expressa constitutivamente em algumas células e tecidos que atua como receptor para a molécula Fas-L, proteína de superfície que pode estar expressa em alguns tecidos linfóides e não-linfóides (SUDA *et al.*, 1997). A ligação de Fas-L à molécula Fas resulta na sinalização intracitoplasmática na célula “receptora”, onde ocorrem diversas alterações moleculares que disparam o processo apoptótico. Essas moléculas são responsáveis pela exclusão de células auto-reativas do sistema imune e pela atividade citolítica dos linfócitos T CD8⁺ (NAGATA, 1997).

O sistema TNF/TNF-R funciona de forma semelhante ao sistema Fas/Fas-L, ou seja, após a interação do ligante com seu receptor ocorre, no interior da célula TNF-R⁺, transformação bioquímica com ativação de diversas enzimas conduzindo à apoptose.

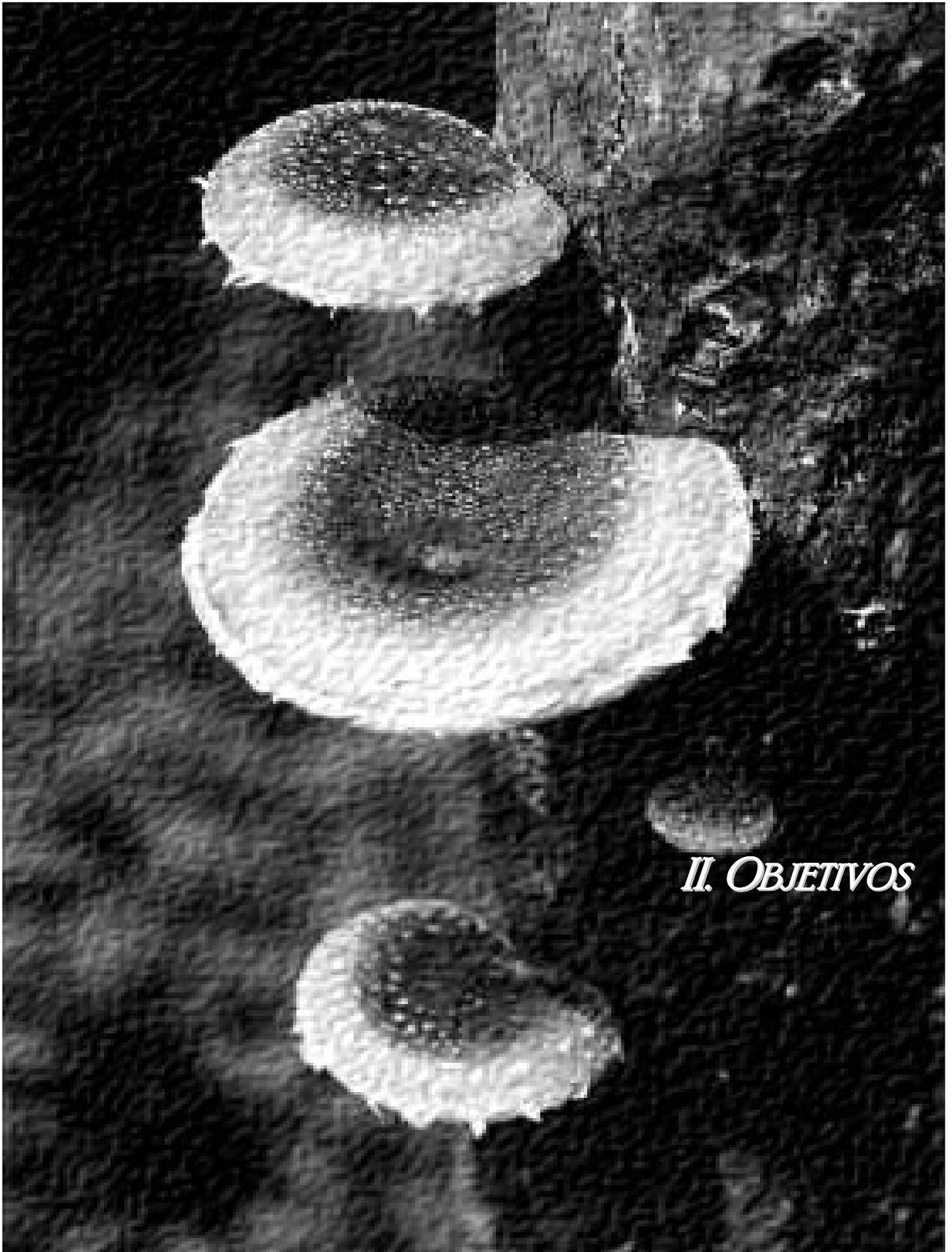
As caspases⁴ são proteases presentes no citoplasma celular nas formas inativas (zimógenos) e quando ativadas iniciam série de clivagens autocatalíticas utilizando como

⁴ *cysteiny aspartate-specific proteinases*

substrato proteínas envolvidas com a homeostase e sobrevivência celular, provocando a apoptose (GRANVILLE *et al*, 1998).

Algumas proteínas que fazem parte da família Bcl-2, entre elas o Bcl-2 e Bcl-w, foram inicialmente descobertos em linfomas de célula B e a expressão aumentada dessas moléculas confere proteção contra a apoptose. Em algumas células, o Bcl-2 evita alterações na membrana mitocondrial pré-apoptótica, inibindo a liberação de enzimas que interagem com o sistema caspase, evitando, dessa forma, o mecanismo apoptótico (GRANVILLE *et al*, 1998).

As respostas imunes são diretamente controladas pelos mecanismos de apoptose. Nas doenças alérgicas, especialmente em indivíduos asmáticos, as células T e os eosinófilos são regulados por este sistema e seu desequilíbrio leva a exacerbação das respostas. As células T podem sofrer apoptose de forma ativa, isto é, linfócitos T antígeno-ativados exibem em sua superfície a molécula Fas e a interação com a proteína Fas-L provoca a morte celular encerrando a resposta inflamatória, protegendo o hospedeiro contra os efeitos nocivos resultantes de uma necrose ou desintegração celular, permitindo que ocorra a remodelação tecidual satisfatória (NOMOTO *et al.*, 1997; SPINOZZI *et al*, 1998).



II. OBJETIVOS

A caracterização em detalhes das respostas imunes contra os esporos de Shiitake torna-se relevante no tratamento das doenças pulmonares. Com isso, esse trabalho teve como objetivos:

- Investigar a modulação pelos esporos de *Lentinus edodes* (Shiitake) na relação entre as citocinas T_H1 e T_H2 nos pulmões e células esplênicas no modelo experimental de inalação de esporos por camundongos da linhagem BALB/c, baseados na expressão gênica de IL-2, IL-4, IL-5, IL-12, TNF- α e IFN- γ , através de RT-PCR, utilizando como referência o fungo *Aspergillus fumigatus*.
- Verificar as alterações pulmonares provocadas pelo Shiitake, quanto ao tipo de células inflamatórias envolvidas.
- Estudar a expressão de mRNA de componentes apoptóticos Fas, Fas-L e Bcl-w no pulmão e células esplênicas nos animais submetidos à exposição de esporos do cogumelo Shiitake, através de RT-PCR.
- Verificar a ocorrência da apoptose *in situ*, através de técnicas morfológicas.



III. MATERIAL E MÉTODOS

III.I. GRUPOS DE ANIMAIS

Os camundongos da linhagem BALB/c utilizados nesse estudo eram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Unicamp, mantidos em condições livre de germes. Os animais eram retirados no CEMIB com 6 semanas de vida e a partir de então, mantidos em biotério livre de patógenos específicos (SPF), com controle de luz, umidade e temperatura, recebendo ração e água *ad libitum*, no Laboratório de Imunologia & Alergia Experimental (LIAE) do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina/UNICAMP.

Dezoito camundongos eram divididos em 3 grupos experimentais definidos como: **Grupo Controle (GC)**, exposto à solução fisiológica, composto de 6 animais; **Grupo *Aspergillus fumigatus* (GAf)**, submetido à inalação de esporos de *Aspergillus fumigatus*, composto de 6 animais; e **Grupo Shiitake (GSh)**, nebulizados com esporos de *Lentinus edodes*, também composto de 6 animais.

III.II. PREPARO DE SUSPENSÃO PARA INALAÇÃO

III.II.1. SOLUÇÃO FISIOLÓGICA

Os animais do grupo controle eram expostos à solução fisiológica estéril, preparada em cada dia de inalação.

III.II.2. ESPOROS DE *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

A partir de uma cultura recente à temperatura ambiente de *Aspergillus fumigatus* em meio Sabouraud inclinado com esporos já formados, fornecida pelo Prof. Dr. Walderez

Gambale⁵, eram preparadas suspensões de inalação para cada dia de inalação utilizando-se 5mL de solução fisiológica estéril pH 7,2 com 0,01% (10µL) de Tween 80 (conservante). Com auxílio de alça em agulha, os esporos da cultura eram raspados e transferidos para a solução fisiológica. Após contagem em câmara hemocitométrica, a concentração era ajustada para $1,5 \times 10^3$ esporos/mL em cada dia de exposição.

III.II.3. ESPOROS DE *LENTINUS EDODES* – SHIITAKE

A partir de esporos, colhidos pela técnica de esporo-print⁶ em placa de vidro, gentilmente fornecidos pela Bióloga Márcia A. Uemura⁷, era preparada suspensão de inalação para cada dia de exposição, utilizando-se 5mL de solução fisiológica estéril pH 7,2.

Após contagem em câmara hemocitométrica, a concentração da suspensão era ajustada para 2×10^3 esporos/mL em cada dia de exposição.

III.III. NEBULIZAÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais eram colocados em câmara de inalação de vidro pirex® (Figura 1), elaborada especialmente para esse fim, em capela de exaustão e com toda segurança biológica. Para nebulização, era conectado à câmara o aparelho inalador compressor (modelo Inalatec Plus, Nevoni®, Brasil) contendo solução fisiológica, esporos de *Aspergillus fumigatus* e esporos de Shiitake, conforme o grupo de animais. Cada ensaio de inalação durava 45 minutos. Entre um grupo e outro, a câmara era lavada e desinfetada.

⁵ Laboratório de Micologia Médica, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo –USP.

⁶ coleta de esporos a partir de cogumelos frutificados e recém coletados, armazenados em ambiente úmido para esporulação.

⁷ Funghi & Flora – Laboratório de Pesquisa e Produção de Cogumelos Comestíveis, Valinhos- S.P.

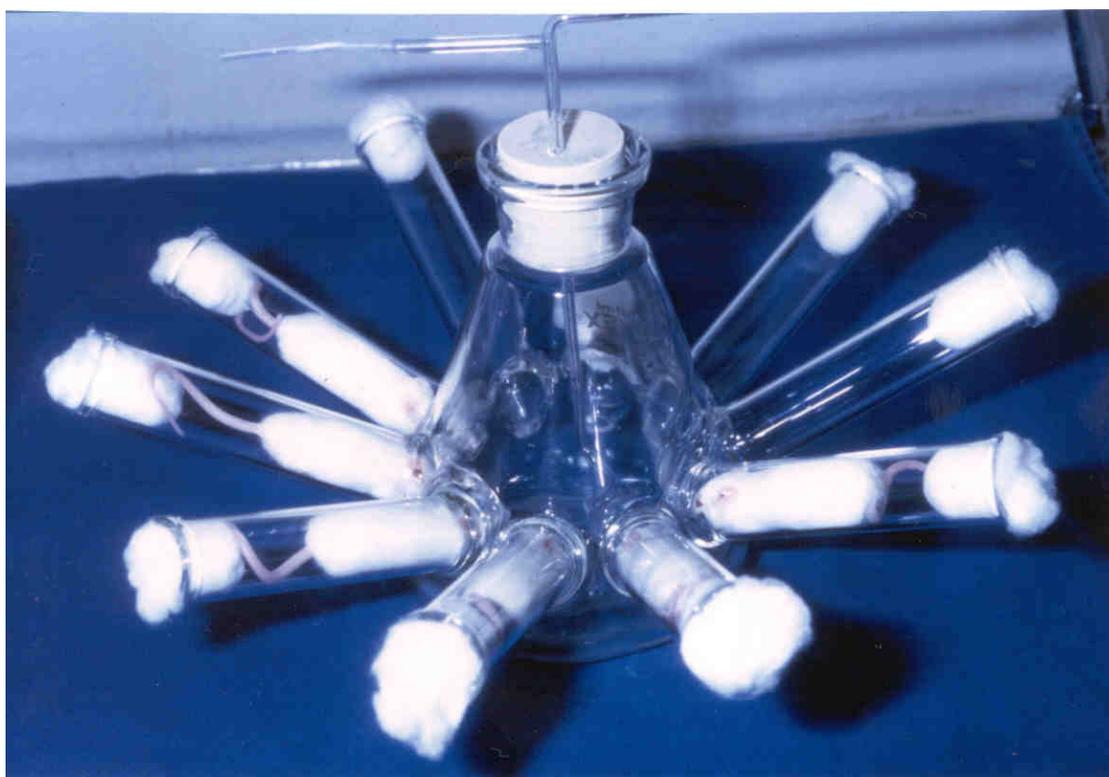


Figura 1: Câmara projetada para nebulização dos animais.

Ao final da inalação, os animais eram retirados da câmara inalatória e recebiam “banho” com gaze embebida em álcool 70°GL para eliminação de qualquer esporo em seu corpo. Eram recolocados nas gaiolas, que permaneciam por dez minutos na capela de exaustão, sendo então levados novamente à sala SPF.

A nebulização era feita 2 vezes por semana durante 4 semanas, e os sacrifícios para coleta de órgãos realizavam-se na 5^a. semana após o início das exposições (7 dias após a última exposição).

III.IV. COLETA DE MATERIAL

Os animais eram anestesiados com 100µL de Pentobarbital Sódico 3%, 7 dias após a última inalação. Após a anestesia, os animais eram submetidos a toracotomia e perfusão intracardíaca e traqueal. A perfusão intracardíaca realizava-se através de punção do ventrículo direito com equipo 23G 0,65x20mm (Venofix®, Braun, Malásia) ligado à bomba de perfusão (BP100, Incibrás, Brasil) com solução fisiológica-EDTA estéril para lavagem dos pulmões, durante a perfusão intracardíaca, o átrio direito era retirado. Após os pulmões tornarem-se exangues, iniciava-se a perfusão traqueal de paraformaldeído 4% (Sigma, CA, EUA) visando a fixação dos órgãos para estudo morfológico.

Os pulmões eram então retirados cuidadosamente e o pulmão direito embebido em paraformaldeído 4%. À seguir, eram lavados com solução de tampão salina fosfato 0,1M pH 7,4 (PBS) para retirada do excesso de fixador, incluído em meio tissue tek® (Sakura Finetek, CA, EUA) e congelado em nitrogênio líquido para criocorte. O pulmão esquerdo era transferido para tubo plástico livre de RNase contendo 400µL de Solução de Guanidina-Mercaptoetanol (Gibco-BRL, CA, EUA) para posterior extração de RNA.

Os baços provenientes desses animais eram retirados e submetidos à extração de células.

Todo o material era devidamente identificado e armazenado à -80°C para posterior utilização.

III.V. EXTRAÇÃO DE CÉLULAS ESPLÊNICAS

Após a retirada do baço, este era transferido para peneira estéril (Sigma, CA, EUA) e macerado. Ao macerado adicionava-se 5mL de solução de Hank (Sigma, CA, EUA) pH 7,4 seguido de centrifugação (Jouan, modelo MR 23i, França) a 374g por 10 minutos. O sobrenadante era desprezado por inversão e ao botão celular adicionava-se 2mL de tampão de lise (NH₄Cl/ KHCO₃/ EDTA). Após incubação por 2 minutos, o volume era completado para 5mL com solução de Hank. Essa solução passava por mais 3 lavagens com Hank a 374g por 10 minutos cada uma. O botão de células esplênicas era transferido para tubo plástico livre de RNase contendo 400µL de Solução de Guanidina-Sarcosyl 0,5% (Sigma, CA, EUA) e armazenado à -80°C para posterior extração de TRNA e realização de RT-PCR.

III.VI. CRIOCORTES PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA

A partir dos pulmões congelados em meio tissue tek® provenientes da coleta de material, realizavam-se criocortes para análise histológica (coloração Hematoxilina/Eosina - HE), técnica Feulgen para detecção de apoptose e confirmação pela técnica TUNEL para células apoptóticas. Após o posicionamento do espécime no suporte do criostato (Leica, modelo CM 1850, Alemanha) de maneira a se obter a maior área possível de corte, era coletada uma série de doze cortes consecutivos, com 5µm de espessura, depositados em lâminas histológicas previamente silanizadas (γ-Methacryl-Oxipropil-Methoxysilane, Sigma, CA, EUA). Após a

obtenção da primeira série de cortes, o espécime era desbastado até 60µm e, a seguir, outra série de 12 cortes era igualmente coletada. Este procedimento era repetido mais uma vez para obtenção dos conjuntos de lâminas representados na figura 2.

As lâminas 1, 3, 5, 7 e 9 eram coradas por HE para realização do estudo histológico em microscópio óptico Axioskop (Zeiss, Alemanha) e documentação fotográfica. A lâmina 10 destinava-se à coloração de Feulgen e a lâmina 11 para a técnica TUNEL.

A análise da celularidade nos pulmões era realizada com a contagem de 5 campos microscópicos aleatórios (em aumento de 1000x) de todos os grupos de animais, observando-se a presença ou não de infiltrados inflamatórios. Após coloração com HE, procedia-se a contagem das células (Eosinófilos, Neutrófilos, Macrófagos e Linfócitos), calculando-se a média e erro padrão para cada grupo experimental.

III.VII. REAÇÃO DE FEULGEN

A reação era realizada nos cortes de pulmões congelados para detecção preliminar de células apoptóticas e posterior confirmação pela técnica TUNEL.

A reação de Feulgen envolve duas etapas principais: hidrólise ácida seguida da exposição do material hidrolisado ao reativo de Schiff. Após fixação das lâminas com solução de Carnoy (Ácido Acético pa – Merck, Darmstadt, Alemanha / Etanol pa - Merck, Darmstadt, Alemanha 1:3) durante 5 minutos, o material era submetido a hidrólise ácida com HCl 4N em temperatura ambiente por 110 minutos, quando as purinas do DNA eram removidas, formando-se uma molécula de “DNA apurínico”, expondo as funções aldeído no Carbono 1 da desoxirribose. Em seguida, as lâminas eram tratadas com Reativo de Schiff à temperatura ambiente por 40 minutos, quando o grupamento aldeído do DNA apurínico reagia com o leucoderivado do reativo de

Schiff, em presença de ácido sulfídrico em excesso, fornecido durante lavagens com água sulfurosa, restabelecendo-se, dessa forma, o grupamento cromofórico.

Finalmente, as lâminas eram submetidas a desidratação em série crescente de álcoois, diafanizadas com xilol (Merck, Darmstadt, Alemanha) e montadas com entelan (Merck, Darmstadt, Alemanha) para posterior observação em microscópio de luz (Axioscop, Zeiss, Alemanha).

III.VIII. REAÇÃO DE TUNEL PARA DETECÇÃO DE APOPTOSE

A reação de TUNEL⁸ é um método morfológico específico para detecção da apoptose baseado nas características bioquímicas das células apoptóticas, que sofrem clivagem internucleossômica do DNA. Essa reação é caracterizada pela inserção, mediada pela enzima Terminal desoxi Transferase (TdT), de um nucleotídeo (desoxiuridina -UTP) conjugado a biotina ou fluoresceína nos sítios de quebra do DNA da célula apoptótica. O DNA torna-se um heterodímero marcado, observado em microscopia de luz.

A reação de TUNEL era realizada segundo instruções do fabricante (*In Situ Cell Death Detection Kit*, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). Dessa forma, as lâminas eram fixadas em paraformaldeído 4% por 20 minutos, e em seguida lavadas em PBS pH 7,4 por 30 minutos. A seguir, as lâminas eram incubadas sob gelo por 2 minutos com solução permeabilizante (0,1% Triton-X em 0,1% de Citrato de Sódio), seguida de lavagens por 2 minutos com PBS.

Finalmente, eram adicionados 50µl da mistura da reação (solução de enzima TdT; solução marcadora e nucleotídeos em tampão) aos cortes e incubados em câmara úmida a 37°C por 60 minutos, protegidos contra luminosidade. Em seguida, as lâminas eram montadas com

⁸ *TdT-mediated dUTP Nick End Labeling*

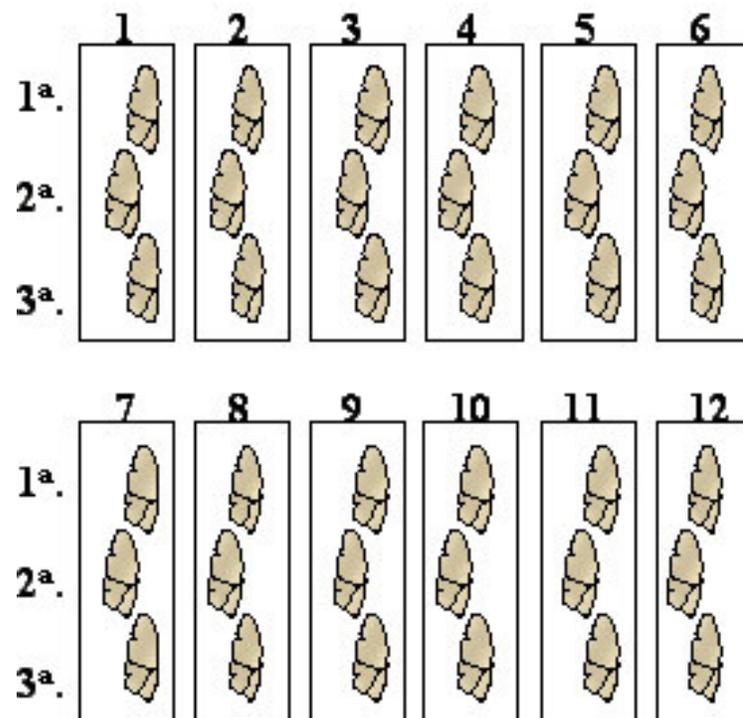


Figura. 2: Esquema representando o procedimento para obtenção dos conjuntos de cortes analisados para estudo morfológico, coloração de Feulgen e técnica TUNEL.

meio de montagem (glicerol pa – Merck) e mantidas resfriadas até o momento da leitura em microscópio confocal de varredura a laser (Bio-Rad-MCR 1024, CA, EUA)⁹.

III.IX. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL (TRNA)

As amostras de RNA total eram extraídas de tecido pulmonar e células mononucleares do baço através do método Guanidina – Fenol - Clorofórmio (CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987).

O tecido em solução de Guanidina-2 β Mercaptoetanol (Gibco-BRL, NY, EUA) e as células em solução de Guanidina-Sarcosyl (Sigma, CA, EUA) eram submetidos a agitação vigorosa em vórtex por aproximadamente 30 segundos. Para separação de proteínas e ácidos nucléicos, adicionava-se tampão Fenol (Gibco-BRL, NY, EUA):Clorofórmio (Gibco-BRL, NY, EUA):Álcool Isoamílico (Merck, Darmstadt, Alemanha) (25:24:1) em igual volume das amostras, agitava-se vigorosamente (vórtex) a solução detergente com formação de emulsão.

A emulsão era centrifugada por 5 minutos a temperatura ambiente a 14404g. A fase superior (fase aquosa), onde se encontravam os ácidos nucléicos, era recuperada e esse protocolo de separação era repetido por mais 2 vezes, ou até que não houvesse mais proteínas na interface da preparação.

Para eliminação do excesso de fenol na amostra, realizava-se uma extração com Clorofórmio:Álcool Isoamílico (24:1). Enfim, a fase aquosa era adicionada de 2 volumes de Etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemanha) e Acetato de Sódio (Sigma, CA, EUA) 3M pH 5.2 (concentração final de 0,3M). Essa preparação de RNA total (TRNA) era mantida a -80°C até o uso.

⁹ Gentilmente disponibilizado pelo Instituto de Biologia e Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP

III.X. PRECIPITAÇÃO DO RNA TOTAL (TRNA)

Para precipitação do TRNA realizava-se centrifugação a 18404g a 4°C por 20 minutos. Ao precipitado eram adicionados 40µL de água ultrafiltrada preparada com Dietil Pirocarbamato (DEPC) (Sigma), essa solução era armazenada a -80°C como RNA Total precipitado.

III.XI. ANÁLISE DO TRNA EXTRAÍDO

A análise de qualidade do TRNA extraído era dada pela relação espectrofotométrica (SpectraMax 190, Molecular Devices, CA, EUA) de OD260/OD280 das preparações de RNA, e consideravam-se adequadas as amostras com relação entre 1.6 e 1.8.

Para quantificação de TRNA aplicava-se a fórmula:

$$\text{RNA}\mu\text{g}/\mu\text{L} = (\text{OD}260/0,025) \times \text{diluição de leitura}/1000$$

III.XII. TRANSCRIÇÃO REVERSA DO TRNA EXTRAÍDO (SÍNTESE DE CDNA)

O volume de TRNA adicionado para a transcrição era calculado para obtenção de 5µg/50µl de reação. À amostra, eram adicionados 0,5µL de Oligo d (pt) (Gibco-BRL) e água ultrapura em quantidade suficiente para 28µL. Incubava-se a amostra em termocicladora (GeneAmp® 9700, Perkin Ellmer, CT, EUA) por 10 minutos a 65°C e por 5 minutos a 4°C. Adicionavam-se 21µL de solução estoque (10µL de tampão Super RT/ 2µL de dNTP mix 0,5µM/ 5µL de DTT 0,1M/ 1µL de RNAsin – Gibco-BRL) seguindo-se incubação por 2 minutos a 42°C.

Após adição de 1µL de enzima Super Transcriptase Reversa (200U) (Gibco-BRL), a reação processava-se em termocicladora programada para: 42°C por 50 minutos, 70°C por 15

minutos e resfriamento da amostra até 4°C. Nesse ponto, as amostras eram armazenadas a -20°C como DNA complementar (cDNA).

III.XIII. AMPLIFICAÇÃO DO cDNA POR REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR)

Para cada tubo de reação, adicionava-se 1µL de “primer sense” (A), 1 µL de “primer anti-sense” (B), 2µL de cDNA, 45µL de solução de reação (Gibo-BRL) (5µL de tampão Taq polimerase/ 1,5µL de dNTP mix 5µM/ 1,5µL de MgCl₂ 50mM/ 33,5µL de água ultrapura) e 20µL de óleo mineral (Sigma). A seguir, os tubos contendo as misturas de cDNA e reagentes eram transferidos para termocicladora programada para as seguintes condições:

1. Desnaturação a 94°C por 2 minutos
2. Aplicação de 1µL da enzima Taq Polimerase- 5 minutos a 80°C
3. Anelamento 58°C 45 segundos
4. Extensão dos primers 72°C 90 segundos
5. Desnaturação a 95°C por 45 segundos
6. 40 ciclos
7. Extensão final 72°C por 10 minutos
8. Temperatura de espera 4°C.

Todos os produtos de PCR eram armazenados a -20°C.

Para realização das PCRs eram feitos 3 “pools” do total de cDNAs para cada grupo de inalação, tanto para tecido pulmonar quanto para células mononucleares esplênicas, sendo que

eram consideradas amostras diferentes para realização de análise estatística. Os primers utilizados nas amplificações estão listados na Tabela 1.

III.XIV. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE mRNA (PRODUTOS DE PCR) POR ELETROFORESE

As amplificações dos cDNA com os “primers” específicos eram analisadas através de eletroforese em gel de agarose (Gibco-BRL) 1,5% revelada com brometo de etídio (Sigma, CA, EUA), através de excitação em luz UV, e documentadas em sistema de documentação fotográfica NucleoVision® (NucleoTech, CA, EUA).

Para realização da eletroforese, eram preparados 50mL de agarose 1,5% (em tampão TBE – Gibco-BRL) adicionada de 2µL de brometo de etídio. A 8µL de amostra (produto de PCR do cDNA), eram adicionados 1,5µL de tampão de amostra GBX (Glicerol pa – Merck, Azul de Bromofenol – Merck, Xileno Cianol – Sigma, água ultrapura) e 5,5µL de água ultrapura. Utilizava-se como tampão de corrida eletroforética, 100mL do Tampão TBE adicionado de 2µL de brometo de etídio.

Eram aplicados 2µL de padrão de DNA em todas as eletroforeses e 14µL de amostra. As condições de corrida eram de 45 minutos a 70 volts, 150mA.

Em seguida, o tamanho dos fragmentos e o pixel da área das bandas eram calculados com programa Gel Expert® (NucleoTech, CA, EUA). Para análise semiquantitativa dos produtos de PCR, era aplicada a fórmula a seguir, onde a expressão do mRNA era expresso em unidades arbitrárias de densidade óptica (UA):

$$UA = \text{pixel da área do produto amplificado} / \text{pixel da área de ciclofilina} \times 100$$

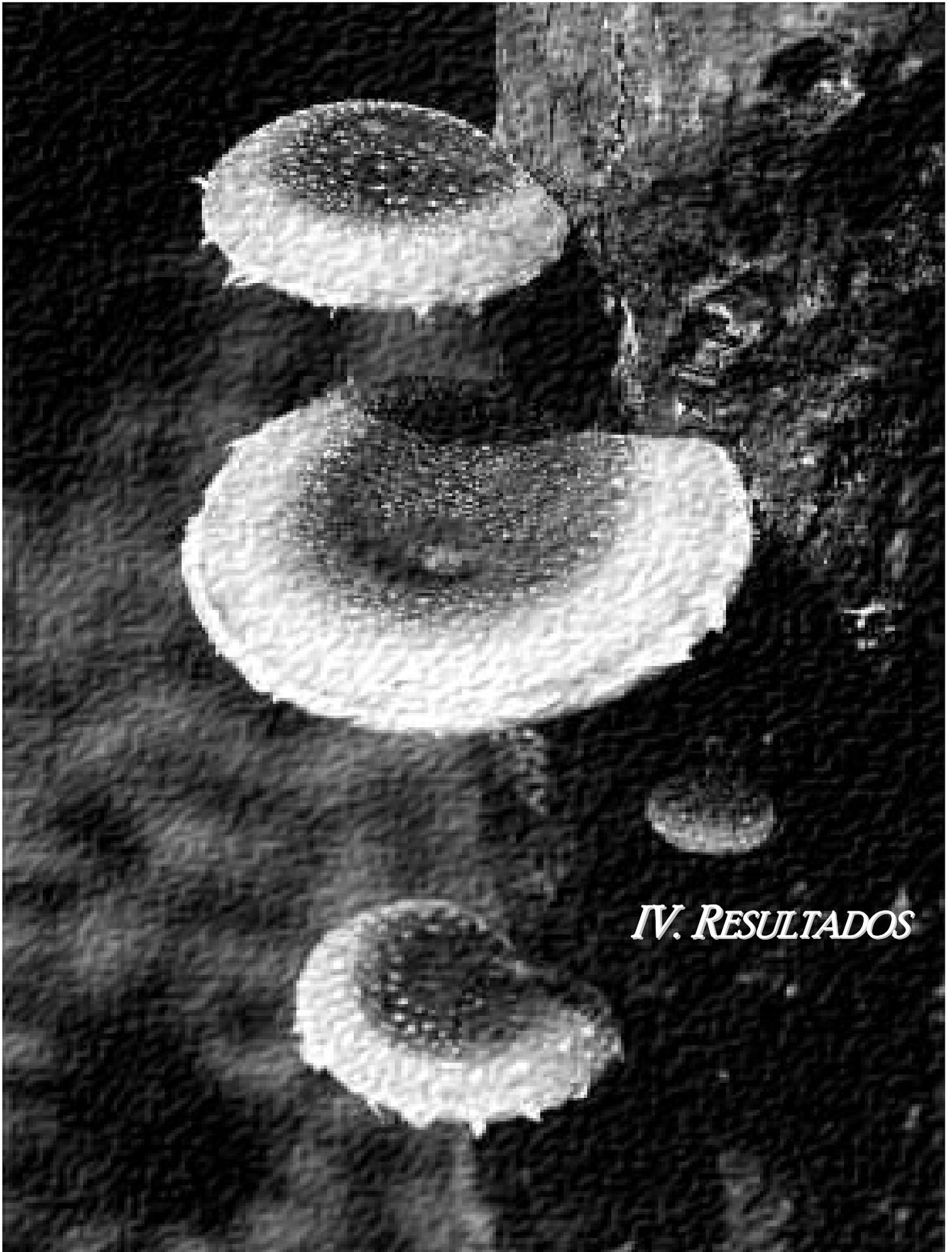
III.XV. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados eram analisados segundo o teste t de Student para dados não paramétricos comparando-se os grupos expostos aos fungos com o grupo controle, considerando-se nível de significância quando $p < 0.05$.

| Primer | Sense | Anti-sense | Produto |
|--------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------|
| Ciclofilina | 5' GACAGCAGAAAAC TTTCGTGC 3' | 5' GGTTCTGACTCACCGACC T 3' | 276 pb |
| IL-2 | 5' CCTGAGCAGGATGGAGAATTACAG 3' | 5' CTTATGTGTTGTAAGCAGGAGGTAC 3' | 366 pb |
| IL-4 | 5' TGTCATCCTGCTCTTCTTTCTC 3' | 5' CTTGGACTCATTTCATGGTGC 3' | 337 pb |
| IL-5 | 5' TCACCGAGCTCTGTTGACAA 3' | 5' GCGGTTTTTCTCTTCACACC 3' | 345 pb |
| IL-12 | 5' AGCTTTTGTGACAACCAATAAGAAC 3' | 5' CAAACTCACAGAGATCTGCCTG 3' | 297 pb |
| TNF-α | 5' CTTAGACTTTGCCGAGTCCG 3' | 5' CCCTGTCACTGGACCTGACA 3' | 254 pb |
| IFN-γ | 5' CGCTACACACTGCATCTTGG 3' | 5' GGCTGGATTCCGGGCAACA 3' | 428 pb |
| Fas | 5' TGCCTCTGGTGCTTGCTGG 3' | 5' CTTGTCCATGTACTCCTTCCCTTCTGTGC 3' | 249 pb |
| Fas-L | 5' CTAGAGGGCCGGACCAAGGAGACC 3' | 5' AGGTGGAAGAGCTGATACATTCTAATCCC 3' | 206 pb |
| Bcl-w | 5' GAGTTTGAGACCCGTTTCCGCCGACCTTC 3' | 5' CCACCATCCAATCCTGCACTTGTCACCA 3' | 230 pb |

Tabela 1: Sequências de primers específicos usados nas ampliações do cDNA

* **Ciclofilina** = Gene estrutural, **pb** = pares de bases



IV. RESULTADOS

IV.I. ANÁLISE COMPORTAMENTAL DOS ANIMAIS DURANTE A INALAÇÃO

Durante os procedimentos de nebulização, o comportamento dos camundongos foi observado com objetivo de se verificar a presença de possível desconforto respiratório. As diferenças entre os grupos experimentais expostos a solução fisiológica, *Aspergillus fumigatus* e Shiitake foram anotados e descritos.

Os animais dos grupos *Aspergillus* e Controle mantiveram-se calmos durante toda a exposição. Entretanto, os animais expostos ao Shiitake manifestaram irritação durante o experimento, caracterizada pela insistente tentativa de fuga da câmara inalatória, prurido nasal persistente e agressividade no momento de retirada da câmara, sendo esse comportamento sugestivo da ação irritativa desses esporos.

IV.II. ASPECTOS PULMONARES MACROSCÓPICOS

Após a toracotomia observamos o aspecto normal dos pulmões para os animais dos grupos controle e *Aspergillus fumigatus*. Por outro lado, os animais submetidos à inalação de esporos de Shiitake apresentaram pulmões com pontos hemorrágicos (*sufusões*).

IV.III. HISTOLOGIA PULMONAR

Os corte histológicos corados por HE obtidos de animais submetidos a nebulização com solução salina (GC) apresentaram preservação da estrutura pulmonar, com alvéolos límpidos sem sinais de agressão inflamatória (PRANCHA I). A presença eventual de células mononucleares no interstício pulmonar observadas nestes cortes é normal neste órgão.

Da mesma forma, observamos a presença de eosinófilos que, dada sua escassez, não pode ser caracterizado como resposta infiltrativa (PRANCHA I). Deve-se salientar que a

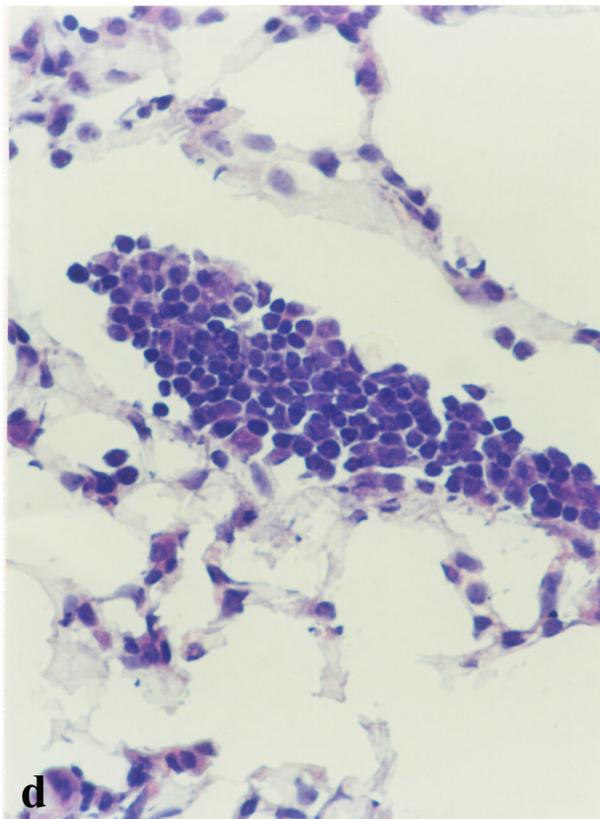
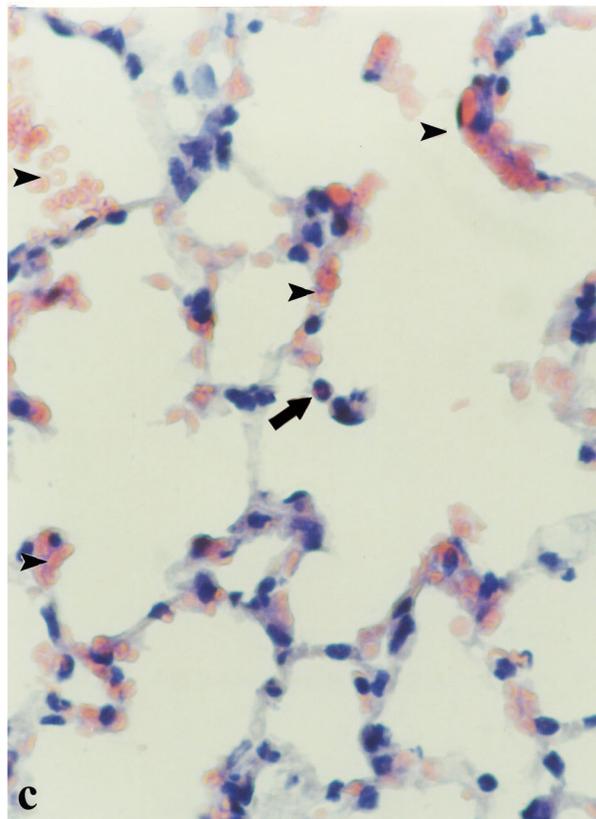
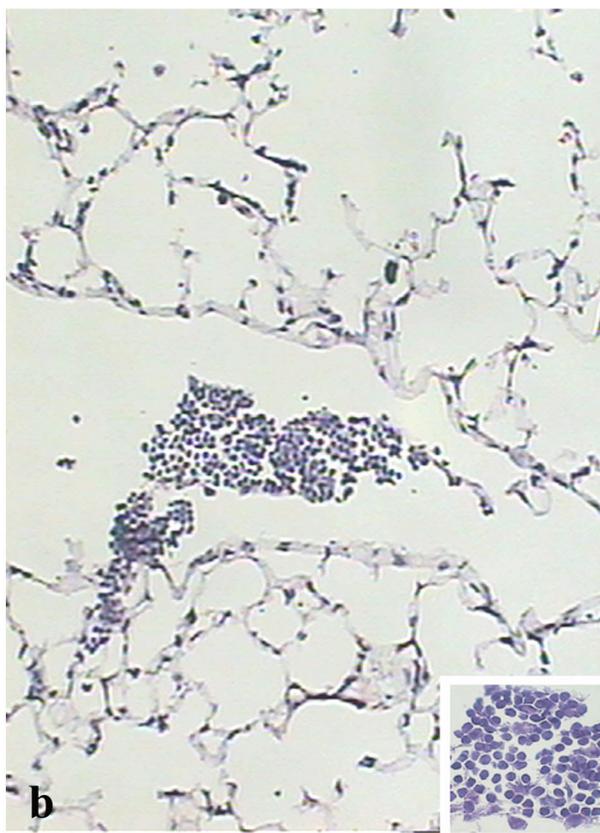
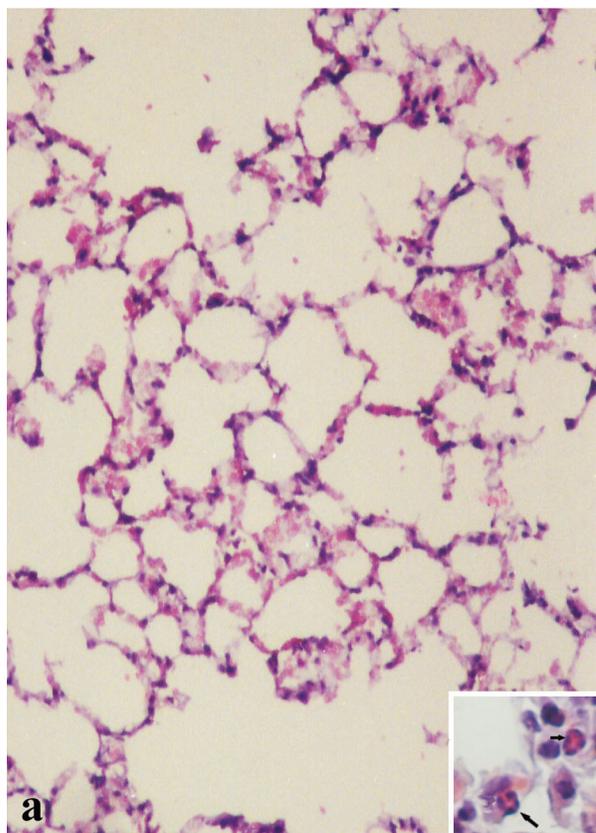
linhagem de camundongos BALB/c apresenta predisposição genética para resposta do tipo T_H2, portanto, a presença de eosinófilos é normal (GIENI *et al.*, 1996).

Nos animais submetidos à inalação com esporos de *Aspergillus fumigatus* (Gaf) foram observadas alterações na estrutura pulmonar, com presença de eritrócitos dispersos e em focos hemorrágicos, além de espessamento das paredes alveolares (PRANCHA I). Em relação ao Grupo Controle, houve aumento de linfócitos e neutrófilos no Gaf, sem significância estatística, e não houve alterações entre os dois grupos quanto ao número de eosinófilos e macrófagos. (Figura 3).

Por outro lado, os cortes histológicos obtidos de pulmões dos animais expostos aos esporos de Shiitake (GSh) mostraram lesões mais exuberantes, com presença de eritrócitos distribuídos difusamente e intra-alveolares (PRANCHA I), em relação ao Grupo Controle, apenas o número de linfócitos apresentava-se significativamente aumentado ($p < 0.05$). Entretanto, a comparação da celularidade entre os grupos Gaf e GSh não mostrou diferença estatística no número de neutrófilos, macrófagos e linfócitos (Figura 3).

IV.IV. REAÇÃO DE FEULGEN

Esta técnica é descrita como reação específica para DNA onde o material cromossômico é evidenciado pelo reativo de Schiff. As células eram caracterizadas como sugestivas de processo apoptótico ao apresentarem condensação e marginalização da cromatina no envoltório nuclear. Células contendo cromatina descondensada com aspecto definido eram classificadas como normais.



Dessa forma, foi possível comprovarmos a especificidade da reação, uma vez que apenas o núcleo das células foi corado, por essa razão a identificação dos tipos celulares foi prejudicada. Células com condensação da cromatina, sugestivas de apoptose, foram identificadas em cortes de pulmões dos grupos GAf e GSh, sendo que as lâminas do GSh apresentaram essas alterações com maior frequência. No grupo controle, encontramos apenas poucas células com características apoptóticas por lâmina, e além disso, essas células não foram observadas em todas as lâminas.(PRANCHA II).

IV.V. ANÁLISE QUALITATIVA DE APOPTOSE ATRAVÉS DA TÉCNICA TUNEL

As lâminas que apresentaram reação de Feulgen sugestiva de apoptose foram submetidas à técnica de TUNEL, onde foi possível a confirmação da presença de células apoptóticas (PRANCHA II). Assim como na reação de Feulgen, o maior número de células apoptóticas foi encontrado nos cortes histológicos do grupo GSh, com várias células positivas por campo observado. No GAf, também observamos a presença dessas células, entretanto, com frequência menor por corte. O GC não apresentou resultados positivos para células apoptóticas, permitindo, apenas, a observação de uma leve coloração de fundo do tecido pulmonar (PRANCHA II).

A coloração de TUNEL utilizada nesse trabalho foi empregada para comprovação da ocorrência da apoptose, sem o intuito de quantificação dessas células.

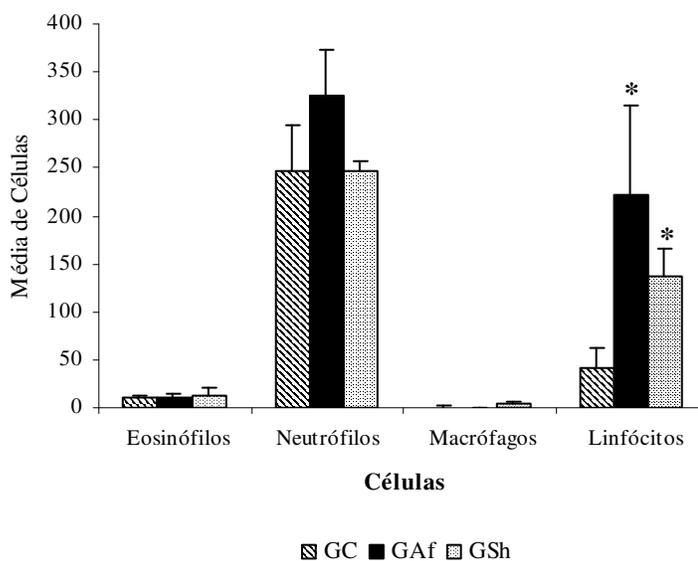
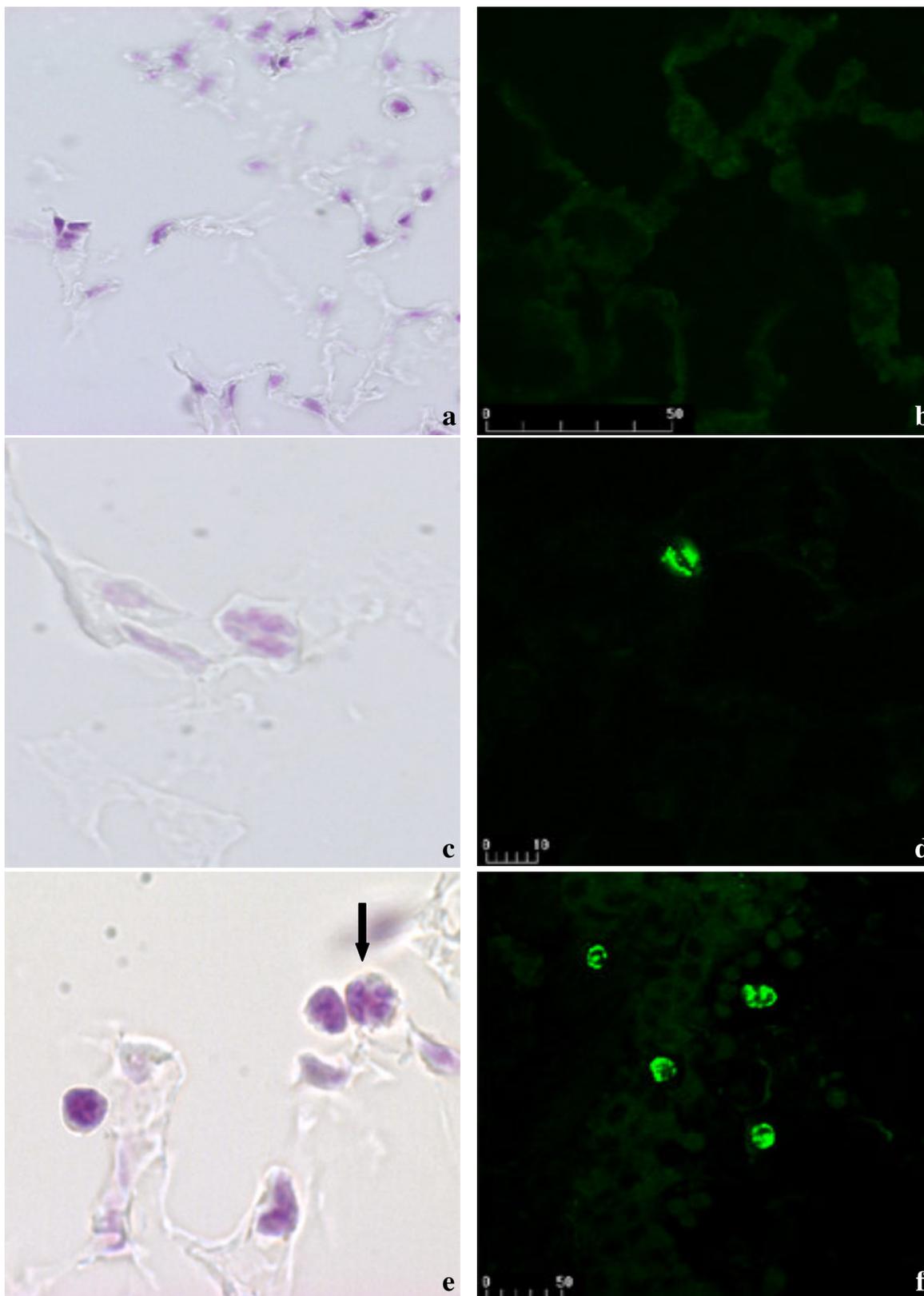


Figura 3: Gráfico representando celularidade em Pulmão dos grupos Controle (GC), *A. fumigatus* (GAf) e Shiitake (GSh). * $p < 0.05$ (teste t de Student).

Podemos observar que, embora os neutrófilos sejam as células encontradas com maior frequência, não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados, entretanto, podemos notar o aumento de linfócitos presentes nos pulmões dos animais submetidos à inalação de esporos de *Aspergillus fumigatus* e Shiitake.



IV.VI. RT-PCR

A partir do banco de cDNAs provenientes de tecido pulmonar e células esplênicas, realizou-se PCRs para detecção da expressão de mRNA das citocinas **IL-2**, **IL-4**, **IL-5**, **TNF- α** , **IFN- γ** e dos componentes apoptóticos **Fas**, **Fas Ligante (Fas-L)** e **Bcl-w**, utilizando-se a ciclofilina¹⁰ como controle interno de expressão. A análise dessas PCRs foi realizada através de gel de agarose 1,5%.

IV.VI.1. EXPRESSÃO DE mRNA DE CITOCINAS T_H1 E T_H2 EM PULMÕES

A expressão de **IL-12**, **TNF- α** e **IFN- γ** nos pulmões dos grupos Shiitake e *A. fumigatus* foram significativamente maiores ($p < 0.05$) do que os níveis encontrados no grupo controle (Figura 4 A). A comparação dos níveis de expressão dessas mesmas citocinas entre os grupos GSh e GAf não mostrou diferenças estatísticas.

É importante ressaltar que não foram detectados níveis de expressão das citocinas **IL-2** e **IL-4** em nenhum dos grupos estudados, e que apenas o GSh apresentou a expressão de mRNA de **IL-5** (Tabela 2).

IV.VI.2. EXPRESSÃO DE mRNA DE CITOCINAS T_H1 E T_H2 EM CÉLULAS ESPLÊNICAS

Os níveis de expressão nas células esplênicas de mRNA de **IL-12** e **IFN- γ** nos grupos Shiitake e *A. fumigatus* foram significativamente maiores ($p < 0.05$) do que os níveis encontrados no grupo controle. Além disso, comparados com o grupo controle, encontramos maior expressão de **TNF- α** no grupo Shiitake ($p < 0.05$) (Figura 4 B) (Tabela 3).

¹⁰ gene estrutural

A comparação entre os grupos submetidos à inalação fúngica mostrou maior expressão de **TNF- α** e **IFN- γ** no grupo GSh e a expressão de **IL-12** foi maior no GAf.

Não houve diferença estatística entre os grupos Controle e Shiitake na expressão de **IL-2**, **IL-4** e **IL-5**, sendo que essas citocinas não foram detectadas no grupo GAf (Figura 4 **B**) (Tabela 3).

IV.VI.3. EXPRESSÃO DE mRNA DE COMPONENTES APOPTÓTICOS EM PULMÃO

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão de mRNA de **Fas-L** e **Bcl-w** nos pulmões dos animais dos 3 grupos experimentais, entretanto, houve aumento de expressão de **Bcl-w** no grupo Shiitake (Tabela 4).

No grupo GC não foi detectada o mRNA de **Fas**. Por outro lado, os grupos GSh e GAf apresentaram expressão gênica de Fas, contudo, sem diferenças estatísticas entre eles (Figura 5 **A**) (Tabela 4).

IV.VI.4. EXPRESSÃO DE mRNA DE COMPONENTES APOPTÓTICOS EM CÉLULAS ESPLÊNICAS

Detectamos nas células esplênicas de animais do grupo Shiitake os maiores níveis de expressão de mRNA das moléculas **Fas-L** e **Bcl-w**, porém, sem diferença significativa quando comparados aos demais grupos (Figura 5 **B**) (Tabela 5).

Por outro lado, o mRNA de **Fas** não foi detectado no grupo GC, enquanto que a sua expressão foi similar nos grupos GAf e GSh.

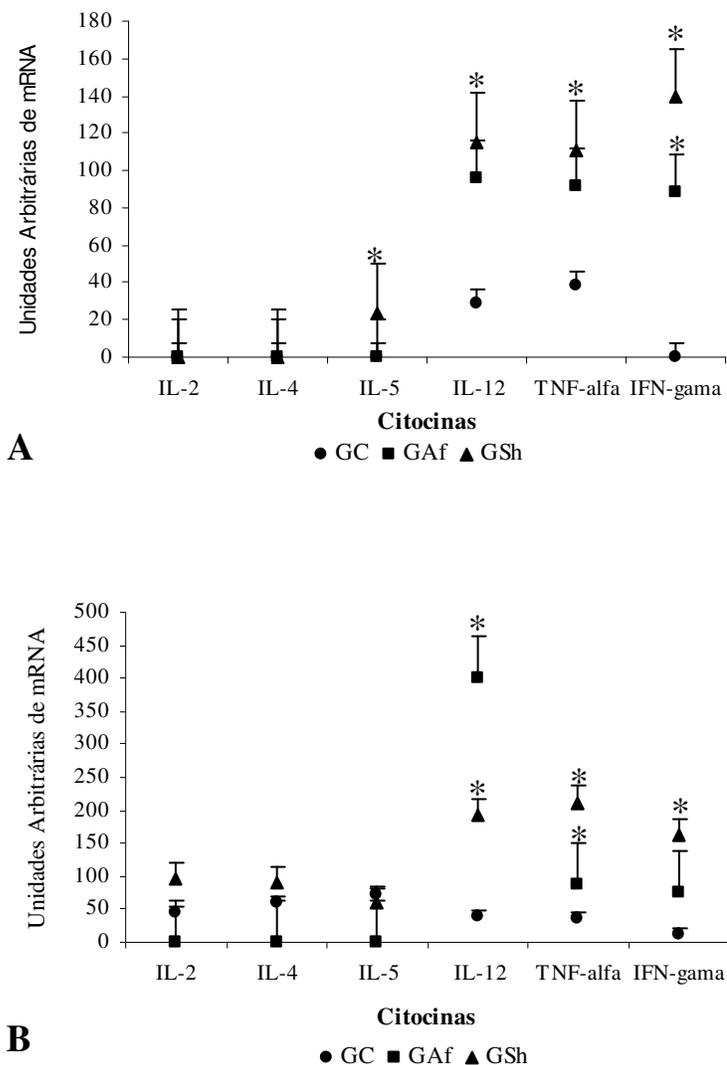


Figura 4: Gráficos representando a expressão de mRNA de citocinas avaliadas através de RT_PCR provenientes de Pulmão (A) e Células Esplênicas (B) dos grupos Controle (GC), *A. fumigatus* (GAF) e Shiitake (GSh). * $p < 0.05$ (teste t de Student).

No Gráfico A, podemos observar a expressão gênica aumentada de IL-12, TNF- α e IFN- γ nos pulmões dos animais dos grupos GAF e GSh, em relação ao controle. Além disso, podemos verificar a presença de IL-5 apenas nos animais submetidos à inalação de Shiitake.

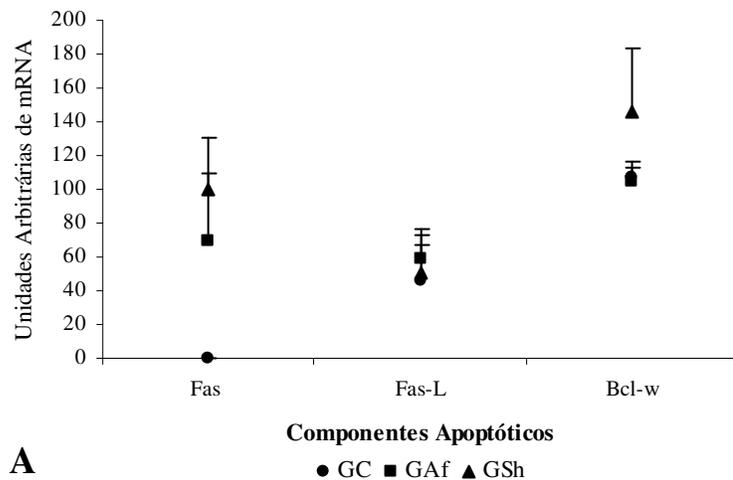
No Gráfico B, verificamos a expressão aumentada de IL-12, TNF- α e IFN- γ nas células esplênicas dos grupos GAF e GSh, com padrão semelhante ao encontrado nos pulmões dos mesmos grupos, sugerindo ação modulatória provocada dos fungos para padrão T_H1 .

| | UA IL-2 | UA IL-4 | UA IL-5 | UA IL-12 | UA TNF-α | UA IFN-γ |
|------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| GC | 0 | 0 | 0 | 29 \pm 13 | 39 \pm 13 | 0 |
| GAf | 0 | 0 | 0 | 96 \pm 9 | 92 \pm 16 | 88 \pm 8 |
| GSh | 0 | 0 | 24 \pm 11 | 116 \pm 21 | 111 \pm 19 | 139 \pm 27 |

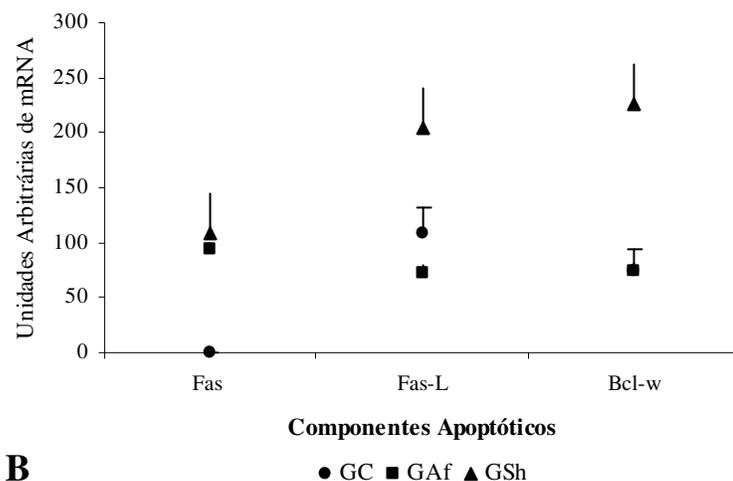
Tabela 2: Níveis de mRNA de citocinas expressos em pulmões, apresentados como a média de Unidades Arbitrárias (UA), com o respectivo erro padrão dos Grupos Controle (GC), *Aspergillus fumigatus* (GAf) e Shiitake (GSh).

| | UA IL-2 | UA IL-4 | UA IL-5 | UA IL-12 | UA TNF-α | UA IFN-γ |
|------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| GC | 47 \pm 8 | 60 \pm 18 | 73 \pm 33 | 40 \pm 8 | 36 \pm 2 | 12 \pm 3 |
| GAf | 0 | 0 | 0 | 400 \pm 21 | 87 \pm 28 | 76 \pm 19 |
| GSh | 96 \pm 23 | 89 \pm 34 | 61 \pm 27 | 192 \pm 45 | 212 \pm 45 | 163 \pm 48 |

Tabela 3: Níveis de mRNA de citocinas expressos em células esplênicas, apresentados como a média de Unidades Arbitrárias (UA) com o respectivo erro padrão, dos Grupos Controle (GC), *Aspergillus fumigatus* (GAf) e Shiitake (GSh).



A



B

Figura 5: Gráficos representando a expressão de mRNA avaliada através de RT-PCR de componentes apoptóticos em Pulmão (A) e Células Esplênicas (B) dos grupos Controle (GC), *A fumigatus* (GAf) e Shiitake (GSh).

Não foram observadas diferenças significativas nas expressões entre os três grupos para Fas-L e Bcl-w em nenhum dos dois compartimentos estudados, entretanto, apenas os grupos GAf e GSh expressaram Fas tanto nos Pulmões (A) quanto nas Células Esplênicas (B) dos animais submetidos à inalação, porém, sem diferenças significativas entre os grupos.

| | UA Fas | UA Fas-L | UA Bcl-w |
|------------|---------------|-----------------|-----------------|
| GC | 0 | 46 ±31 | 108 ±5 |
| GAf | 70 ±40 | 59 ±14 | 104 ±12 |
| GSh | 100 ±31 | 51 ±17 | 146 ±38 |

Tabela 4: Níveis de mRNA de componentes apoptóticos expressos em pulmões, apresentados como a média de Unidades Arbitrárias (UA) com o respectivo erro padrão, dos Grupos Controle (GC), *Aspergillus fumigatus* (GAf) e Shiitake (GSh).

| | UA Fas | UA Fas-L | UA Bcl-w |
|------------|---------------|-----------------|-----------------|
| GC | 0 | 109 ±23 | 73 ±21 |
| GAf | 93 ±71 | 72 ±38 | 75 ±27 |
| GSh | 109 ±88 | 204 ±44 | 226 ±52 |

Tabela 5: Níveis de mRNA de componentes apoptóticos expressos em células esplênicas, apresentados como a média de Unidades Arbitrárias (UA), com o respectivo erro padrão, dos Grupos Controle (GC), *Aspergillus fumigatus* (GAf) e Shiitake (GSh).



V. DISCUSSÃO

A produção e comercialização do cogumelo Shiitake têm aumentado em diversos países, principalmente no ocidente, uma vez que descrições sobre os benefícios à saúde atribuídos a ele são extensamente divulgados. Como conseqüência, relatos de exposição ocupacional com manifestações clínicas pulmonares e dermatite alérgica em produtores e consumidores são cada vez mais freqüentes na literatura. Assim, o interesse pelas alterações imunológicas potencialmente provocadas pelo Shiitake também tem crescido.

Nesse trabalho, investigamos a modulação imunológica em modelo experimental de exposição pulmonar aos esporos do cogumelo de forma semelhante à exposição ocupacional, uma vez que os camundongos eram expostos aos esporos de shiitake puros. Para isso, estudamos a expressão de citocinas dos subtipos celulares T_{H1} e T_{H2} e de componentes apoptóticos no pulmão e células esplênicas, representando as respostas locais e sistêmicas. Como os mecanismos envolvidos nesses processos ainda não estão claros, utilizamos como controle positivo de modulação as respostas provocadas pelo fungo *Aspergillus fumigatus*, amplamente estudadas na literatura.

O sucesso das respostas imunológicas para eliminação de esporos fúngicos presentes no ambiente depende da relação entre resposta imune inata, incluindo células apresentadoras de antígeno, neutrófilos e macrófagos (BOZZA, *et al.*, 2002), e resposta imune adaptativa, onde o subtipo celular recrutado e o padrão de citocinas liberado influenciam a resistência ou susceptibilidade do hospedeiro (CENCI *et al.*, 1997, KURUP *et al.*, 1998, CENCI *et al.*, 1998, ROILIDES *et al.*, 1998, CENCI *et al.*, 2000, BOZZA, *et al.*, 2002).

As respostas onde o subtipo T_{H2} predomina favorecem o aparecimento de condições patológicas, principalmente em indivíduos asmáticos, estando relacionada com a susceptibilidade do hospedeiro à infecção. Por outro lado, respostas do tipo T_{H1} estão relacionadas com a

resistência à infecção, tanto em humanos quanto em modelos experimentais de exposição fúngica (CENCI *et al.*, 1998, ROILIDES *et al.*, 1998, CENCI *et al.*, 2000).

A imunidade inata é a principal via de eliminação de fungos que invadem os pulmões e consiste nos macrófagos alveolares, que através de citocinas recrutam neutrófilos, para eliminação de hifas (MEHRAD, *et al.*, 1999). Além disso, células dendríticas (CD) pulmonares também são responsáveis pela fagocitose e apresentação desses agentes para células da imunidade específica, como demonstrado em estudos com camundongos da linhagem BALB/c.

Após administração intratraqueal de esporos e hifas de *Aspergillus fumigatus*, BOZZA *et al.* (2002) demonstram que a fagocitose de esporos pelas células dendríticas induz a secreção de IL-12, com ativação de células do tipo T_H1, que secretam IFN- γ para eliminação dos conídeos. Por outro lado, a fagocitose de hifas pelas CD pulmonares resulta em respostas do tipo T_H2, com secreção de IL-4 e IL-10, favorecendo a patogenicidade do fungo, entretanto, os mecanismos exatos envolvidos nessa ativação ainda não são totalmente conhecidos (BOZZA *et al.*, 2002).

Quando macrófagos são expostos aos conídeos de *Aspergillus fumigatus*, *in vitro* e em modelos de aspergilose pulmonar experimental secretam mediadores inflamatórios, como TNF- α e IL-1, promovendo respostas do tipo T_H1, além de recrutamento de mais células para o pulmão, como neutrófilos e células da imunidade específica, através da indução de expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, facilitando o influxo dessas células para o local de injúria (MEHRAD *et al.*, 1999).

O desenvolvimento de imunidade adquirida protetora contra os esporos de *A. fumigatus* é comprovado, ainda, por experimentos com imunização de camundongos BALB/c através de administração intravenosa (iv) de dosagens subletais de conídeos, resultando em produção de linfócitos TCD4⁺ específicos, que pode ser observado após subsequente administração de

conídeos, com secreção de IFN- γ pelos T_H1 e IL-12 pelos macrófagos, impedindo a morte dos animais. Nesse mesmo estudo, comprovou-se que dosagens elevadas (10^7 conídeos iv) administradas aos animais levam a respostas do tipo T_H2, com secreção de IL-4, seguida da morte do animal 3 a 4 dias após a infecção. Ainda foi detectado o mRNA de IFN- γ e IL-10 nos esplenócitos dos animais infectados, sendo que nos animais que adquiriram resistência à infecção observou-se também a expressão de mRNA de IL-12 (CENCI *et al.*, 1997).

Muitos polissacarídeos e complexos polissacarídeos de cogumelos têm sido considerados como agentes antitumorais e imuno-modulatórios e tem sido proposto um mecanismo de imuno-modulação celular.

O Lentinan¹¹ tem sido empregado clinicamente no Japão como imuno-potencializador na terapia contra o câncer (LIU F *et al.*, 1999) onde potencialmente age como adjuvante de orientação para células T contra vários tipos de tumores (KERÉKGYÁRTÓ *et al.*, 1996).

Após injeção intraperitoneal (ip) de Lentinan em camundongos ICR, os esplenócitos e células de exsudato peritoneal apresentaram aumento de expressão de TNF- α e IL-1. A IL-1 geralmente não é expressa sem estímulo, e a detecção de mRNA de IL-1 nos esplenócitos e células de exsudato peritoneal dos animais que receberam Lentinan demonstra sua propriedade imuno-estimulante. O aumento de IL-1 promove a maturação de células T e monócitos e induz a produção de outras citocinas, como TNF- α e IFN- γ , que podem estar associados com a atividade antitumoral do Lentinan (LIU F *et al.*, 1999).

KERÉKGYÁRTÓ *et al.* (1996) estudaram a ativação de macrófagos e produção de TNF- α após tratamento *in vitro* e *in vivo* com Lentinan e observaram a citotoxicidade antitumoral

¹¹ extrato aquoso do corpo de frutificação do Shiitake

de macrófagos peritoniais contra adenocarcinoma TA3/Ha tanto *in vivo* quanto *in vitro*, além do aumento de secreção de TNF- α , sendo que essas respostas foram dose-dependentes, provando o efeito direto do Lentinan sobre os macrófagos.

Outros dois complexos polissacarídeos do Shiitake, LE e KS-2¹², também têm sido estudados, e foi demonstrado o aumento de expressão de mRNA de IL-2 e TNF- α em células mononucleares de baços de camundongos BALB/c e células mononucleares periféricas humanas que foram submetidas à cultura com diferentes concentrações de LE, sugerindo a capacidade desse complexo polissacarídeo de induzir respostas imunes. O polissacarídeo KS-2 mostrou-se efetivo em suprimir o crescimento de tumores Sarcoma 180 em camundongos que receberam KS-2 oral ou intraperitonealmente, com aumento de produção de IFN- γ (LIU M, *et al.*, 1998).

Nossos resultados mostraram aumento na expressão de mRNA das citocinas IL-12, TNF- α e IFN- γ nos pulmões e células esplênicas dos animais expostos aos esporos de Shiitake e *Aspergillus fumigatus*, caracterizando resposta do tipo T_H1, sugestivo de resistência à infecção, observada pela ausência de colonização pulmonar e sobrevivência dos animais até o momento de sacrifício (7 dias após última inalação).

Em um estudo realizado com exposição intratraqueal de esporos de *Aspergillus fumigatus*, de forma semelhante aos nossos experimentos (2x/semana/5semanas), CENTERO-LIMA *et al.* (2002) também detectaram IFN- γ , TNF- α e IL-12 nos pulmões e IFN- γ , TNF- α e IL-4 nos baços dos camundongos CD1 expostos.

Estudos com extratos de Shiitake (Lentinan, LE e KS-2) demonstraram a capacidade desses polissacarídeos em estimular a produção de TNF- α , IFN- γ , IL-1 e IL-2

¹² extraídos do micélio do cogumelo Shiitake

(KERÉKGYÁRTÓ *et al.*, 1996, LIU M, *et al.*, 1998, LIU F *et al.*, 1999). A detecção desse padrão de expressão de citocinas após exposição ao cogumelo Shiitake e seus produtos em diferentes modelos experimentais corroboram seu efeito imuno-modulatório.

O recrutamento de células inflamatórias nas repostas pulmonares contra fungos é dependente das citocinas pró-inflamatórias liberadas (CENCI *et al.*, 1998; WILEY *et al.*, 2001, TANG *et al.*, 2001), e o TNF- α tem papel crítico na indução e manutenção dessa resposta em modelos animais e em humanos (MEHRAD, *et al.*, 1999).

MEHRAD *et al.* (1999) demonstraram que 2 dias após administração it de conídeos de *Aspergillus fumigatus* inicialmente ocorre a infiltração intra-alveolar e peri-brônquica de células inflamatórias predominante em neutrófilos e em menor quantidade, de células mononucleares. Entretanto, no 4º. dia após a administração, o infiltrado é caracteristicamente mononuclear. Os conídeos só são observados entre os dias 2 e 5, quando somem completamente. O TNF- α aumenta rapidamente, atingindo um platô permanente em torno de 24hs, indicando sua relação com as células recrutadas.

No presente trabalho, encontramos infiltrado inflamatório com predomínio de células mononucleares (linfócitos) nos pulmões dos animais expostos tanto aos esporos de *A. fumigatus* quanto aos esporos de Shiitake. Contudo, não detectamos diferenças estatísticas quanto a presença de neutrófilos e macrófagos. KURUP *et al.* (2001) também encontraram infiltrado inflamatório de linfócitos em animais sensibilizados por via intratraqueal com antígenos de *Aspergillus fumigatus* 2x/semana/4semanas. Esses achados foram associados a ação do TNF- α no recrutamento dessas células, através dos experimentos de MEHRAD, *et al.* (1999) com o fungo *A. fumigatus*. Não observamos aumento de eosinófilos nos pulmões dos animais expostos aos

esporos de Shiitake, mesmo tendo sido detectado IL-5. Entretanto, SCHUYLER *et al.* (1998) sugerem que a liberação de TNF- α e IFN- α provoca a diminuição de células T_H2-dependentes.

Comparando-se as expressões das citocinas T_H1 e dos componentes apoptóticos em nossos experimentos, verificamos que existe relação entre o aumento da expressão dessas citocinas e a ocorrência da apoptose, uma vez que no grupo controle, onde os níveis das citocinas são baixos, não ocorreu a expressão de Fas e não foi observado o processo apoptótico nesses animais. Por outro lado, nos pulmões dos grupos Shiitake e *A. fumigatus*, cujas expressões dessas citocinas apresentaram-se aumentadas, detectamos a expressão gênica de Fas, com observação do processo apoptótico através das colorações de Feulgen e TUNEL.

Os resultados do presente trabalho apontam de forma pioneira a capacidade de esporos do Shiitake em modular as respostas imunes *in vivo* de forma similar ao encontrado em experimentos utilizando esporos do fungo *A. fumigatus* e complexos peptídicos do próprio Shiitake, além de apresentar o possível envolvimento desses agentes na ocorrência de apoptose. Esses dados poderão servir como base de estudo para posteriores investigações sobre a ação dos esporos de Shiitake em exposições ocupacionais, onde ocorre o desenvolvimento de respostas T_H2 nos produtores, com manifestações de alveolite alérgica extrínseca, dermatite atópica e sintomas asmáticos (VAN LOON *et al.*, 1992, NAKAMURA, 1992, SENTI *et al.*, 2000). Sugerimos que esse conjunto de manifestações esteja associado, além das características do antígeno, à sua concentração. No caso de exposições a concentrações elevadas de esporos, a resposta é direcionada para o subtipo celular T_H2, por outro lado, exposições a baixas concentrações levam a respostas do tipo T_H1, com desenvolvimento de resistência à instalação do fungo.

Se os dados experimentais apresentados no presente trabalho forem correspondentes com a clínica, e considerando o fenótipo T_H2 dos indivíduos susceptíveis aos esporos de Shiitake, é possível presumir que medidas preventivas e imuno-profiláticas, através de imunoterapia específica com antígenos do cogumelo, equilibrem a resposta T_H1 desses indivíduos, impedindo as reações alérgicas ao Shiitake, além de proporcionar resistência à instalação dos esporos no hospedeiro.



VI. CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos, podemos concluir que:

- No modelo de exposição fúngica empregado no presente trabalho, a exposição aos esporos do cogumelo Shiitake modula positivamente a expressão de citocinas TH1 (IL-12, TNF- α e IFN- γ) no pulmão e baço.
- A exposição aos esporos de Shiitake induz o aparecimento de infiltrado inflamatório predominante em linfócitos, com presença de neutrófilos e macrófagos, responsáveis pela proteção do hospedeiro, impedindo a colonização do pulmão pelo fungo.
- Os esporos de Shiitake promovem a expressão da molécula Fas nos dois compartimentos estudados, que associado a detecção morfológica através das técnicas de Feulgen e TUNEL, sugerem a capacidade desses esporos em induzir apoptose.
- Os resultados apresentados sugerem o mesmo padrão na expressão das citocinas e componentes apoptóticos semelhantes aos encontrados para o fungo *Aspergillus fumigatus*.
- A utilização de imuno-terapia profilática, com antígenos específicos, em produtores de Shiitake deve ser estudada.



VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K., MURPHY, K. M., SHER, A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, **383**, 787-793.
- ANNAIX, V., BOUCHARA, J.P., LARCHER, G., CHABASSE, D., TRONCHIN, G. (1992) Specific binding of human fibrinogen fragment D to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect. Immun.*, **60**, 1747-1755.
- BERNHISEL-BROADBENT, J., CAMARGO, E. E., JAFFE, H. S., LEDERMAN, H. M. (1991) Recombinant human interferon- γ as adjuvant therapy for *Aspergillus* infection in a patient with chronic granulomatous disease. *J. Infect. Dis.*, **163**, 908-911.
- BIRCH, M., ROBSON, G. D., LAW, D., DENNING, D. W. (1996) Evidence of multiple extracellular phospholipase activities of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.*, **64**, 751-755.
- BORISH, L. & ROSENWASSE, L. J. (1996) Update on cytokines. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **97**, 719-733.
- BOZZA, S., GAZIANO, R., SPRECA, A., BACCI, A., MONTAGNOLI, C., FRANCESCO, P., ROMANI, L. (2002) Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airway to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. *The J. of Immunol.*, **168** (1), 1362-1371.
- BRACKE, M, DUBOIS, G. R., BOLT, K., BRUIJNZEEL P. L., VAERMAN, J. P., LAMMERS, J. W., KOENDERMAN, L., (1997) Differential effects of the T helper cell type 2-derived cytokines IL-4 and IL-5 on ligand binding to IgG and IgA receptors expressed by human eosinophils. *J Immunol.*, **159** (3), 1459-65.
- BROMLEY, I. M.J. & DONALDSON, K. (1996) Binding of *Aspergillus fumigatus* spores to lung epithelial cells and basement membrane proteins: relevance to the asthmatic lung. *Thorax*, **51**, 1203-1209.

- BROWN, J. E., GREENBERGER, P. A., YARNOLD, P. R. (1995) Soluble serum interleukin 2 receptors in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, **74**, 484-488.
- CENCI, E., MENCACCI, A., BISTONI, F., KURUP, V. P., ROMANI, L. (2000) T cell vaccination in mice with invasive pulmonary aspergillosis. *J. Immunol.*, **165**, 381-388.
- CENCI, E., MENCACCI, A., FÈ D'OSTIANI, C., MONTAGNOLI, C., BACCI, A., PERITO, S., BISTONI, F., ROMANI, L. (1998) Cytokine-and T-helper-dependent immunity in murine aspergillosis. *Res. Immunol.*, **149**, 445-453.
- CENCI, E., PERITO, S., ENSSLE, K.-H., MOSCI, P., LATGÉ, J.-P., ROMANI, L., BISTONI, F. (1997) TH1 and TH2 cytokines in mice with invasive aspergillosis *Infect. and Immun.*, **65** (Feb), 564-570.
- CENTERO-LIMA, S., SILVEIRA, H., CASIMIRO, C., AGUIAR, P., ROSÁRIO, V. E. (2002) Kinetics of cytokines expression in mice with invasive aspergillosis: letal infection and protection. *FEMS Immunol and Medical Microbiol.*, **32**, 167-173
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.*, **162** (1), 156-159.
- COLLINS. M. K., MARVEL, J., MALDE, P., LOPEZ-RIVAS, A., (1992) Interleukin 3 protects murine bone marrow cells from apoptosis induced by DNA damaging agents. *J Exp Med.*, **176** (4), 1043-1051.
- COULOT, P., BOUCHARA, J. P., RENIER, G., ANNAIX, V., PLANCHENAULT C., TRONCHIN, G., CHABASSE, D. (1994) Specific interaction of *Aspergillus fumigatus* with fibrinogen and its role in cell adhesion. *Infect. Immun.*, **62**, 2169-2177.
- DIAMOND, R. D., HUBER, E., HAUDENSCHILD, C. C. (1983) Mechanisms of destruction of *Aspergillus fumigatus* hyphae mediated by human monocytes. *J. Infect. Dis.*, **147**, 474-483.

- GIENI, R. S., FANG, Y., TRINCHIERI, G., UMETSU, D. T., DEKRUYFF, R. H. (1996) Differential production of IL-12 in BALB/c and DBA/2 mice controls IL-4 versus IFN-gamma synthesis in primed CD4 lymphocytes. *Int Immunol.*, **8**(10), 1511-1520.
- GRANVILLE, D. J., CARTHY, C. M., HUNT, D. W. C., MCMANUS, B. M. (1998) Apoptosis: molecular aspects of cells death and disease. *Labor. Invest.*, **78** (8), 893-913.
- GAVRIELI, Y., SHERMAN, Y., BEN-SASSON, S. A. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.*, **119** (3), 493-501.
- GREENBERGER, P. A. (1994) Diagnostics and management of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy Proc.*, **15**, 335-339.
- GRUNIG, G., CORRY, D. B., LEACH, M. W., SEYMOR, B. W., KURUP, V. P., RENNICK, D. M. (1997) Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J. Exp. Med.*, **185**, 1089-1099.
- HEARN, V.M. & SIETSMA, J. H. (1994) Chemical and immunological analysis of the *Aspergillus fumigatus* cell wall. *Microbiology*, **140**, 789-795.
- HORNER, W. E., LEVETIN, E., LEHRER, S. B. (1993) Basidiospores allergen release: elution from intact spores. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **92**, 306-312.
- JONG, S. C & BIRMINGHAM, J. M. (1993) Medical and therapeutic value of the shiitake mushroom. *Adv. Applied Microbiol.*, **39**, 152-184.
- KAWAKAMI, K., QIFENG, X., TOHYAMA, M., QURESHI, M. H., SAITO, A. (1996) Contribution of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in host defence mechanism against *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Exp. Immunol.*, **106**, 468-474.
- KERÉKGYÁRTÓ, C., VIRÁG, L., TANKÓ, L., CHIHARA, G., FACHET, J. (1996) Strain Differences in the Cytotoxic Activity and TNF Production of Murine Macrophages Stimulated by Lentinan. *Int. J. Immunopharmac.*, **18** (6,7), 347-353.

- KLEINSCHMIDT, W.J (1972) Biochemistry of interferon and its inducers. *Annu. Rev. Biochem.*, **41**, 514-542.
- KOLATTUKUDY, P. E., LEE, J. D., ROGERS, L. M., ZIMMERMAN, P., CESELSKI, S., FOX, B., STEIN, B., COPELAN, E. A. (1993) Evidence for possible involvement of an elastolytic serine protease in aspergillosis. *Infect. Immun.*, **61**, 2357-2368.
- KURUP, V. P., XIA, J.-Q., CRAMERI, D., RICKABY, D.A., CHOI, H.I., FLUCKIGER, S., BLAZER, K., DAWSON, C. A., KELLY, K.J. (2001) Purified Recombinant *A fumigatus* Different Responses in Mice. *Clin. Immunol.*, **98**, 327-336.
- KURUP, V. P., GRUNIG, G., KNUTSEN, A. P., MURALI, P. S. (1998) Cytokines in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Res. Immunol.*, **149**, 466-477.
- KURUP, V. P., MURALI, P. S., GUO, J., BANERJEE, B., FINK, J. N., COFFMAN, R. L. (1997) Anti-interleukin (IL)-4 and -IL-5 antibodies downregulate IgE and eosinophilia in mice exposed to *Aspergillus* antigens. *Allergy*, **52**, 1215-1221.
- LACAZ, C. S., PORTO, E., MARTINS, J. E. C. (1991) Aspergilose, In: *Micologia Médica*, 8a. edição, São Paulo: Sarvier, Cap. 26, 435-441.
- LIU, F., FUNG, M. C., OOI, V. E. C., CHANG, S. T. (1996) Induction in the mouse of gene expression of immunomodulating cytokines by mushroom polysaccharide-protein complexes. *Life Sciences*, **58** (21), 1795-1803.
- LIU, F., OOI, V. E. C., FUNG, M. C. (1999) Analysis of immunomodulating cytokines mRNAs in the mouse induced by mushroom polysaccharides. *Life Sciences*, **64** (12), 1005-1011.
- LIU, M., LI, J., KONG, F., LIN, J., GAO, Y. (1998) Induction of immunomodulating cytokines by a new polysaccharide-peptide complex from culture mycelia of *Lentinus edodes*. *Immunopharm.*, **40**, 187-198.

- MATTILA, P., SUONPÄÄ, K., PIIRONEN, V. (2000) Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition*, **16** (7,8), 694-696.
- MEHRAD, B., STRIETER, R. M., STANDIFORD, T. H. (1999) Role of TNF- α in pulmonary host defense in murine invasive aspergillosis. *The J. of Immunol.*, **162**, 1663-1640.
- MIYAKOSHI, H., AOKI, T. (1984) Acting mechanisms of Lentinan in human--I. Augmentation of DNA synthesis and immunoglobulin production of peripheral mononuclear cells. *Int J Immunopharmacol.* **6** (4), 365-371.
- MONOD, M., PARIS, S., SARFATI, J., JATON-OGAY, K., AVE, P., LATGÉ, J. P. (1993) Virulence of alkaline protease-deficient mutants of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **80**, 39-46.
- MURAKAMI, M., KAWABE, K., HOSOI, Y., HOJO, S., DOBASHI, K., IRIUCHIJIMA, T., NAKAZAWA, T., MORI, M. (1997) Decreased pulmonary perfusion in hypersensitivity pneumonitis caused by Shiitake mushroom spores. *J. Int. Med.*, **241**, 85-88.
- NAGATA, S. (1997) Apoptosis by ceath factor. *Cell*, **88**, 355-365.
- NAKAMURA, T. (1992) Shiitake (*Lentinus edodes*) dermatitis. *Contact Dermatitis*, **27**, 65-70.
- NOMOTO, Y., KUWANO, K., HAGIMOTO, N., KUNITAKE, R., KAWASAKI, M., HARA, N. (1997) Apoptosis and Fas/Fas ligand mRNA expression in acute immune complex alveolitis in mice. *Eur. Respir. J.*, **10**, 2351-2359.
- RINALDI, M. G. (1983) Invasive aspergillosis. *Rev Infect Dis.*, **5** (6), 1061-1077.
- RODRIGUEZ ,E., BOUDARD, F., MALLIE, M., BASTIDE, J. M., BASHIDE, M. (1997) Murine macrophage elastolytic activity induced by *A fumigatus* strains in vitro: evidence of the expression of two macrophage-induced proteases. *Genes. Can. J. Microbiol.*, **43** (7), 649-657.
- ROILIDES E., UHLIG, K., VENZON, D., PIZZO, P. A., STRIETER, R. M., WALSH, T. J., (1993) Enhancement of oxidative response and damage caused by human neutrophils to *Aspergillus*

- fumigatus* hyphae by granulocyte colony-stimulating factor and gamma interferon. *Infect. Immun.*, **61**, 1185-1193.
- ROILIDES E., HOLMES, A., BLAKE C., VENZON, D., PIZZO, P. A., WALSH, T. J. (1994) Antifungal activity of elutriated human monocytes against *Aspergillus fumigatus* hyphae: enhancement by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interferon- γ . *J. Infect. Dis.*, **170**, 894-899.
- ROILIDES E., SEIN, T., HOLMES, A., BLAKE C., PIZZO, P. A., WALSH, T. J. (1995) Effects of macrophage colony-stimulating factor of mononuclear phagocytes against *Aspergillus fumigatus*. *J. Infect. Dis.*, **172**, 1028-1034.
- ROILIDES E., UHLIG, K., VENZON, D., PIZZO, P. A., WALSH, T. J. (1996) Prevention of corticosteroid-induced suppression of human polymorphonuclear leucocyte-induced damage of *Aspergillus fumigatus* hyphae by granulocyte colony-stimulating factor and gamma interferon. *Infect. Immun.*, **61**, 4870-4877.
- ROILIDES, E., KATSIFA, H., WALSH, T.J. (1998) Pulmonary host defenses against *Aspergillus fumigatus*. *Res. Immunol.*, **149**, 454-465.
- SAKULA, A. (1967) Mushroom-worker's lung. *Br. Med. J.*, **3**, 708-710.
- SCHAFFNER, A., DOUGLAS, H., BRAUDE, A.I., DAVIS, C. E. (1983) Killing of *Aspergillus* spores depends on the anatomical source of the macrophage. *Infect Immun.*, **42** (3), 1109-1115.
- SCHUYLER, M. (1998) The Th1/Th2 paradigm in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Lab Clin Med.*, **131** (3), 194-196.
- SENTI, G., LESER, C., LUNDBERG, M., WÜTHRICH B. (2000) Allergic asthma to shiitake and oyster mushroom. *Allergy*, **55**, 975-976.

- SHAFFNER, A., DOUGLAS, H., BRAUDE, A., (1982) Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphnuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*. *The J. of Clin. Invest.*, **69**, 617-631.
- SPINOZZI, F., FIZZOTTI, M., AGEA, E., PAITTONI, S., DROETTO, S., RUSSANO, A., FORENZA, N., BASSOTI, G., GRIGNANI, F., BERTOTTO, A. (1998) Defective expression of Fas messenger RNA and Fas receptor on pulmonary T cells from patients with asthma. *Ann. Intern. Med.*, **128**, 363-369.
- SUDA, T., HASHIMOTO H., TANAKA, M., OCHI, T., NAGATA, S. (1993) Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J. Exp. Med.*, **186** (12), 2045-2050.
- TANG, C., INMAN, M. K., VAN ROOIJEN, N., YANG, P., SHEN, H., MATSUMOTO, K., O'BYRNE, P. M. (2001) Th type 1-stimulating activity of lung macrophages inhibits Th2-mediated allergic airway inflammation by an IFN- γ -dependent mechanism. *J. Immunol.*, **163**(3), 1471-1481.
- TRONCHIN, G., ESNault, K., RENIER, G., FILMON, R., CHABASSE, D., BOUCHARA, J. P. (1997) Expression and identification of a laminin-binding protein in *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun.*, **65** (1), 9-15.
- VAN LOON, P. C., COX, A. L., WUISMAN, O. P., BURGERS, S. L., VAN GRIENSVEN, L. J. (1992) Mushroom worker's lung. Detection of antibodies against Shii-take (*Lentinus edodes*) spore antigens in Shii-take workers. *J Occup Med.*, **34** (11), 1097-1101.
- WALDORF, A. R., LEVITZ, S., DIAMOND, R. D. (1984) *In vivo* bronchoalveolar macrophage defense against *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus fumigatus*. *J. Infect. Dis.*, **150**, 752-760.
- WILEY, R., PALMER, K., GAJEWSKA, B., STAMPFLI, M., ALVAREZ, D., COYLE, A., GUTIERREZ-RAMOS, J., JORDANA, M. (2001) Expression of the Th1 chemokine IFN-

gamma-inducible protein 10 in the airway alters mucosal allergic sensitization in mice. *J Immunol.*, **166** (4), 2750-2759.