

CÍNTIA LIMA DOS SANTOS

**UTILIZAÇÃO DE MÉTODOS DE ANÁLISE NO FRACIONAMENTO DE  
BIOMOLÉCULAS POTENCIALMENTE IMUNOSSUPRESSORAS DO FUNGO  
AMBIENTAL *TRICHODERMA STROMATICUM***

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA NUCLEAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TÉCNICAS NUCLEARES

**UTILIZAÇÃO DE MÉTODOS DE ANÁLISE NO FRACIONAMENTO DE  
BIOMOLÉCULAS POTENCIALMENTE IMUNOSSUPRESSORAS DO FUNGO  
AMBIENTAL *TRICHODERMA STROMATICUM***

Aluna: Cíntia Lima dos Santos

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Jane Lima dos Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Técnicas Nucleares, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências e Técnicas Nucleares.

BELO HORIZONTE

AGOSTO/ 2011

---

---

## AGRADECIMENTOS

---

---

Ao meu Deus, que está sempre em primeiro lugar na minha vida, por diariamente renovar as minhas forças, fornecendo coragem e persistência nessa caminhada.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Jane Lima dos Santos minha eterna e imensurável gratidão por todo incentivo, pela força, por seu tempo precioso investido, pela gratuidade da bondade do seu coração e pela orientação segura demonstrada ao longo deste trabalho.

Ao Prof Dr Arno Heeren de Oliveira pelas sugestões, discussões a respeito das técnicas utilizadas, pela co-orientação e amizade.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Fátima Soares Motta Noronha do Laboratório de Microbiologia (ICB/UFMG) pelo apoio e amizade, pelo espaço cedido em seu laboratório e por ter acreditado em meu trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela Bartholomeu do Departamento de parasitologia (ICB/UFMG) pelo apoio, por ter colocado tão gentilmente o seu laboratório sempre à disposição, pelas sugestões, por sua educação e amizade.

Aos meus queridos pais por toda força, apoio e presença durante todos os anos de estudo da minha vida.

Ao meu esposo, amigo e companheiro Luís Eduardo pelo incansável estímulo e por ter disponibilizado seu tempo em função do meu trabalho.

Às grandes amigas Sara Lopes do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (ICB/UFMG) e Rosiane Resende pelos ensinamentos do início dessa caminhada, pela imensa ajuda e tempo investido, pelo carinho e paciência.

Aos colaboradores Rodrigo e Jeferson do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (ICB/UFMG) e ao Colega Jamil Silvano, pela imensa colaboração.

Aos colegas do Centro de Microscopia Eletrônica da UESC pelo acolhimento, ajuda e ensinamentos.

Às minhas irmãs Carla e Cibele pelo auxílio nas traduções instantâneas e disponibilização do equipamento.

À todos da minha família (irmãos e sogra) que me auxiliaram com meu bebê e às pessoas que estiveram direta ou indiretamente ao meu lado e contribuíram para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Técnicas Nucleares pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pela disponibilização de recurso financeiro.

Aos dois grandes amores da minha vida, aos quais dedico esse trabalho,

*Luís Eduardo e Eduardo Henrique*

*“O único homem que está isento de erros, é aquele que não arrisca acertar.”*

**Albert Einstein**

---



---

## SUMÁRIO

---



---

	AGRADECIMENTOS	iii
	RESUMO	ix
	ABSTRACT	xi
	LISTA DE FIGURAS	xii
	LISTA DE TABELAS	xiv
	LISTA DE ABREVIATURAS	xv
1	INTRODUÇÃO	1
2	FUNDAMENTOS TEÓRICOS	3
	2.1 Métodos de análise utilizados no fracionamento de biomoléculas	3
	2.1.1 Fast Liquid Protein Chromatography (FLPC)	3
	2.1.2 Eletroforese Unidimensional	4
	2.1.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	6
	2.2 Fungos com potencial imunossupressor	10
	2.3 Gênero <i>Trichoderma</i>	13
	2.4 Espécie <i>Trichoderma Stromaticum</i>	13
	2.5 Consequências da Imunossupressão em Macrófagos	15
3	OBJETIVOS	17
4	METODOLOGIA	18
	4.1 Origem dos reagentes	18
	4.2 Animais	18
	4.2.1 Sacrifício	18
	4.3 Obtenção de esporos do fungo <i>Trichoderma Stromaticum</i>	18
	4.4 Avaliação ultraestrutural do esporo de <i>T. stromaticum</i> e da interação esporo/macrófago	19
	4.5 Obtenção de extrato bruto da cultura do <i>Trichoderma stromaticum</i>	20
	4.6 Fracionamento do extrato bruto de <i>T. stromaticum</i> (ExtTs)	20
	4.7 Quantificação de proteínas totais do ExtTs	21
	4.8 Eletroforese de Gel SDS PAGE	21

4.9	Ensaio Biológico para seleção da biomolécula com potencial imunossupressor	22
4.9.1	Obtenção e cultivo de macrófagos peritoneais de camundongos	22
4.9.2	Ativação de macrófagos para produção de NO	22
4.9.3	Quantificação da produção de Óxido Nítrico	23
4.9.4	Teste de viabilidade	23
4.9.5	Imunização de camundongos com esporos e extrato bruto de <i>T. stromaticum</i>	25
4.9.6	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> – ELISA	25
4.10	Análise de imagens	27
4.11	Análise Estatística	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1	Ultraestrutura dos esporos de <i>T. stromaticum</i> ativos e inativados pelo calor	28
5.2	Perfil protéico do ExtTs de esporos de <i>T. stromaticum</i> ativos e inativos	32
5.3	Fracionamento de biomoléculas do ExtTs ativo	32
5.4	Ultraestrutura da interação dos esporos de <i>T. stromaticum</i> com macrófagos	37
5.5	Efeito inibitório dos <i>pools</i> de ExtTs na produção de óxido nítrico por macrófagos	44
5.6	Viabilidade de macrófagos expostos aos <i>pools</i> 2 e 4 do Ext. de <i>T. stromaticum</i>	46
5.7	Quantificação de proteínas do <i>Pool</i> de frações do ExtTs	48
5.8	Imunogenicidade de esporos ou extTs em camundongos	50
6	CONCLUSÕES	54
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	56
	REFERÊNCIAS	57
	CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA	66

Resumo da Dissertação apresentada ao PCTN/UFMG como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências e Técnicas Nucleares.

UTILIZAÇÃO DE MÉTODOS DE ANÁLISE NO FRACIONAMENTO DE BIOMOLÉCULAS  
POTENCIALMENTE IMUNOSSUPRESSORAS DO FUNGO AMBIENTAL *TRICHODERMA*  
*STROMATICUM*

O *Trichoderma stromaticum* é utilizado como agente de biocontrole do patógeno *Moniliophora perniciosa*, causador da doença vassoura-de-bruxa do cacauero. Os dados coletados mostraram que os esporos de *T. stromaticum* inibem mecanismos de defesa da imunidade inata de camundongos. Isto sugere que os esporos possuem substâncias biologicamente ativas com efeitos imunossupressores. O objetivo desta pesquisa foi fracionar possíveis moléculas do fungo *T. stromaticum* que apresentam potencial imunossupressor na funcionalidade de fagócitos. Esporos do *T. stromaticum* cultivados em meio BDA (batata dextrose agar) foram extraídos da placa de cultura e aquecidos a 100 °C por 15 minutos (esporos inativos) ou não (esporos ativos) para posterior processamento e avaliação da ultraestrutura por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Os esporos ativos foram utilizados para a produção do extrato bruto de *Trichoderma Stromaticum* (ExtTs) e posterior fracionamento pela técnica de Cromatografia líquida de proteína rápida (CLPR). As frações resultantes da cromatografia foram utilizadas em ensaios de produção de óxido nítrico por macrófagos pela reação colorimétrica de Griess e imunogenicidade dos esporos e ExtTs (Extrato bruto de *Trichoderma stromaticum*). Os resultados mostraram que a ultraestrutura dos esporos inativos revelou desorganização intracelular e aumento da espessura da parede. O fracionamento do extrato bruto gerou uma fração de pools denominados 2 e 4 que inibiram significativamente a produção de NO por macrófagos ativados com IFN- $\gamma$  + LPS. Pequenas concentrações de esporos de *T. stromaticum* mudaram significativamente a ultraestrutura de macrófagos murinos. Tais mudanças sugerem a possibilidade de ocorrência do processo de autofagia. O método de análise Cromatografia líquida de proteína rápida permitiu selecionar uma fração do *T. stromaticum* com potencial imunossupressor que constitui alvo de grande interesse para uma futura caracterização da molécula, devido à sua possível relevância terapêutica. Até então, nosso estudo sugere que o uso de *T. stromaticum*, como biopesticida em

aparelhos de aerossol, deve ser realizado com cuidado para evitar problemas de saúde para os trabalhadores das plantações.

Abstract of the Dissertation presented to PCTN/UFMG as a partial requirement to obtain the Master of Nuclear Science and Techniques Degree

UTILIZATION OF METHODS OF ANALYSIS IN THE FRACTIONING OF  
*TRICHODERMA STROMATICUM* ENVIRONMENTAL FUNGI  
IMMUNOSSUPPRESSOR BIOMOLECULES

*Trichoderma stromaticum* is used as biocontrol agent of the cacao witches' broom pathogen *Moniliophthora perniciosa*. The collected data showed that *T. stromaticum* spores inhibit the defense mechanisms of innate and adaptative immunity of mice. This suggests that the spores have biologically active substances with immunosuppressor effects. The goal of this research was fractionated *T. stromaticum* fungi molecules that show immunosuppressor potential when functioning as phagocytes. *T. stromaticum* spores grown on potato dextrose agar at room temperature, for 7-10 days were collected and heat-treated at 100 °C for 15 min (spores inactive) or not (active spores) to later processing and evaluation of the ultrastructure through Transmission Electron Microscopy (TEM). The active spores were used to the yield of the gross extract and later fractioning through Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC). The fractions resulting from the chromatography were used in assays of nitrite oxide by macrophages through the Griess Reaction colorimetric and immunogenicity of the spores and ExtTs. The results showed that inactive spore ultrastructure revealed intracellular disorder and an increase in the thickness of the wall. The fractioned of the crude extract generated a *pools* fraction called 2 e 4, which significantly inhibited NO yield by macrophages activated with IFN- $\gamma$  + LPS. Small concentrations of spore *T. stromaticum* change significantly ultraestructure of murine macrophages. Such changes suggest the possibility of occurrence of the process of autophagy. The method of analysis allowed to select a fraction of *T. stromaticum* with immunosuppressor potential that constitutes target of great interest to future molecular characterization due to its possible therapeutical relevance. Until then, our study suggests that the use of *T. stromaticum* as a biopesticide in aerosol devices should be performed carefully to avoid health problems to plantation workers.

---



---

**LISTA DE FIGURAS**

---



---

Figura 1	Esquema representativo do funcionamento do MET.	8
Figura 2	Microscópio eletrônico de transmissão Modelo Morgagni 268 Universidade Estadual de Santa Cruz/UESC – Ilhéus – Ba	9
Figura 3	Crescimento de isolados de <i>T. stromaticum</i> em meio BDA.	19
Figura 4	Esquema do ensaio colorimétrico para quantificação de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> pela Reação de Griess e para obtenção da densidade ótica do lisado de células expostas a MTT.	24
Figura 5	Esquema representativo da Imunização de camundongos Swiss para quantificação de IgG por Elisa.	26
Figura 6	Análise morfológica dos esporos de <i>Trichoderma stromaticum</i> .	30
Figura 7	Análise ultraestrutural dos esporos de <i>Trichoderma stromaticum</i>	31
Figura 8	Perfil protéico do ExtTs de esporos ativos e inativos.	33
Figura 9	Fracionamento de biomoléculas do ExtTs em coluna de filtração molecular acoplada ao FPLC.	34
Figura 10	Determinação do peso molecular de proteínas constituintes dos <i>pools</i>	36
Figura 11	Ultraestrutura de macrófagos de camundongos Swiss.	38
Figura 12	Ultraestrutura de macrófagos expostos a esporos de <i>T. stromaticum</i> .	39
Figura 13	Ultraestrutura de macrófagos expostos a esporos de <i>T. stromaticum</i> .	41
Figura 14	Ultraestrutura de macrófagos expostos a esporos de <i>T. stromaticum</i>	42
Figura 15	Ultraestrutura de macrófagos expostos a esporos de <i>T. stromaticum</i>	43
Figura 16	Efeito dos pools de ExtTs na produção de NO por macrófagos	45
Figura 17	Efeito dos <i>pools</i> 2 e 4 de ExtTs na citotoxicidade de macrófagos de camundongos	47
Figura 18	Curva padrão da dosagem de proteínas dos <i>pools</i> do ExtTs pelo método de Bradford modificado	49

Figura 19	Esporos de <i>T. stromaticum</i> e ExtTs induzem produção de imunoglobulina G (IgG)	51
Figura 20	Anti- ciclosporina A reconhece os <i>pools</i> 2 e 4 do extrato de <i>T. stromaticum</i> .	53

---

---

## LISTA DE TABELAS

---

---

Tabela 1	Absorbância referente às concentrações conhecidas de BCA.	49
Tabela 2	Concentrações de proteína presentes nas frações do ExtTs.	49

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

---

Å - Ângstrom

AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism

ANOVA - Análise de Variância

BCA - ácido bicinchoninico (BCA 4,4'-dicarboxi-2,2'- biquinolina)

BDA - Batata Dextrose Agar

BSA - *Bovine serum albumin* (Albumina Sérica Bovina)

Ceplac-Ba - Comissão Executiva de Planejamento da Lavoura Cacaueira da Bahia

CETEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal

CsA – Ciclosporina A

CG – Complexo de golgi

CO<sub>2</sub> – Gás carbônico

CPU – Unidade central de processamento

DNA - Ácido desoxirribonucléico

ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ExtTs - Extrato bruto de *Trichoderma stromaticum*

FPLC - Fast Protein Liquid Cromatography (cromatografia líquida de proteína rápida)

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> - Ácido fosfórico

HCl – Ácido clorídrico

HPA - hipotálamo-pituitária-adrenal

HPLC – High Performance/Pressure Liquide Chromatography (Cromatografia Líquida de alta eficiência)

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IFN-γ - Interferon-gama

IgG – Imunoglobulinas G

IL-4 – Interleucina 4

IL-10 - Interleucina 10

iNOS - *Inducible nitric oxide synthase* (óxido nítrico sintase induzida)

KDa -KiloDalton

kV - Kilovolts

LPS – Lipopolissacarídeo purificado de *Escherichia coli* 0127

M – Molar

MET - Microscópio Eletrônica de Transmissão

mg – Microgramas

mmHg – milímetros de mercúrio

MTT - 3-(4,5)-dimetilazolil-2,5-difeniltetrazólio

NaNO<sub>2</sub> - Nitrito de Sódio

NEED - diamina-di-hidroclorido naftaleno

NFAT – *Nuclear factor activated T cells* (Fator Nuclear Ativador de Célula T)

Ng - nanograma

NO - Óxido Nítrico

OPD - *Optical path difference* (Orto-fenilenodiamino)

P.A. – Pureza absoluta

PAMP - *Pathogen associated molecular patterns* (Padrões Moleculares Associados a Patógenos)

PBS - *Phosphate-buffered saline* (Solução Fosfato Tamponada)

pH – Potencial hidrogeniônico

PMA - Phorbol-12 Myristate-13 acetate

PPM - Padrão de peso molecular

PRR – *Pattern recognition receptors* (Receptores de reconhecimento de patógenos)

RNA – Ácido ribonucléico

ROS - *Reactive Oxygen Species* (Espécies reativas de oxigênio)

RPM – Rotações por minuto

RPMI – Meio de Cultura da célula

SDS-PAGE - Dodecil Sulfato de Sódio - Gel de Poliacrilamida

SFB – Soro fetal bovino

TLRs – Receptor Toll Like

TM -Trade Mark

TNFR - *Tumor necrosis factor receptor* (Receptor do fator de necrose tumoral)

UV – Ultravioleta

Vis - Visível

μM – Micromolar

## 1 – INTRODUÇÃO

Os fagócitos, componentes da imunidade inata, desempenham diversas funções relacionadas à defesa dos organismos contra agentes agressores biológicos incluindo vírus, bactérias, fungos e protozoários. Dentre as estratégias de eliminação de microrganismos comuns aos fagócitos (macrófagos e neutrófilos) podemos citar a explosão respiratória caracterizada por aumento das *Reactive Oxygen Species* (ROS) e a produção de óxido nítrico (NO). Este último é um mediador inflamatório gerado após indução do gene que codifica a enzima *inducible nitric oxide synthase* (iNOS). Recentemente, foi investigada a resposta imune de macrófagos e neutrófilos murinos aos esporos do fungo *Trichoderma stromaticum*, o qual é usado como biopesticida para o controle da doença vassoura-de-bruxa do cacaueteiro no sul da Bahia (ALVES-FILHO *et al*, 2011).

O efeito do esporo na funcionalidade dos fagócitos foi avaliado por ensaios *in vitro* utilizando os seguintes parâmetros: viabilidade celular, explosão respiratória, produção NO e expressão da proteína iNOS. Os resultados mostraram que neutrófilos e macrófagos permaneceram viáveis em cultura quando expostos aos esporos. Uma vez mostrada a ausência de citotoxicidade por ensaios de quimioluminescência foi observado que os esporos de *T. stromaticum* inibiam a explosão respiratória de neutrófilos incubados com *Phorbol-12 Myristate-13 acetate* (PMA), um ativador da produção dos ROS. Os estudos mostraram que os esporos regulam a produção de NO negativamente em macrófagos e que essa inibição é reflexo da redução dos níveis de expressão da enzima iNOS, que sintetiza esse radical. Ensaios *in vivo* mostraram que o esporo inibe também a produção da citocina regulatória IL-10 e da citocina pró-inflamatória IFN- $\gamma$  por células do baço. Os resultados obtidos apontam para a possibilidade do esporo imunossuprimir mecanismos microbicidas e a resposta imune sistêmica regulatória e pró-inflamatória de camundongos (ALVES-FILHO *et al*, 2011)..

Assim, um questionamento de extrema relevância refere-se a quais são as biomoléculas imunossupressoras de *T. stromaticum*. Logo, o objetivo deste trabalho foi investigar e selecionar as possíveis moléculas fúngicas envolvidas no processo de imunossupressão. O conhecimento destas moléculas é de grande importância por um lado por proporcionar o uso do biofungicida a base de *T. stromaticum* de forma segura

para o ambiente e saúde humana e, por outro lado para detectar novas moléculas com potencial de uso em casos onde a resposta imune é exacerbada como nos processos de transplantes e nas doenças autoimunes.

Para fracionar as possíveis biomoléculas com potencial imunossupressor, neste trabalho foram utilizados métodos de análise importantes, tais como: Microscopia Eletrônica Transmissão (MET) para o conhecimento da ultraestrutura dos esporos de *T. stromaticum* bem como para entendimento da interação do esporo com o fagócito e filtração molecular acoplada ao Fast Liquid Protein Chromatography (FLPC) para fracionamento das moléculas. Para selecionar as biomoléculas com potencial imunossupressor provenientes do fracionamento do extrato bruto foram realizados os seguintes ensaios biológicos: viabilidade celular pela prova do Brometo 3-(4,5)-dimetilazolil-2,5-difeniltetrazólio (MTT), quantificação da produção de NO pela reação de Griess no sobrenadante da cultura desses macrófagos e produção de imunoglobulinas por *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) de animais expostos aos esporos e extrato bruto da cultura de *T. stromaticum*.

## 2 – FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 2.1 - Métodos de análise utilizados no fracionamento de biomoléculas

#### 2.1.1 - *Fast Liquid Protein Chromatography (FLPC)*

O termo cromatografia líquida refere-se a todos os métodos cromatográficos com uma fase líquida móvel e uma fase estacionária que, geralmente, é constituída por uma resina composta de esferas de agarose com diferentes ligantes de superfície, dependendo do alvo de purificação. A cromatografia líquida é utilizada para separar e purificar proteínas e outros polímeros a partir de misturas complexas. (NIESSEN, 2006)

A cromatografia líquida de proteína rápida é um sistema completo para separação de biomoléculas em escala de laboratório e comumente é usado em bioquímica e enzimologia.

No FPLC a velocidade de bombeamento do solvente é controlada por microprocessador através de uma interface de software para garantir o fluxo constante de solventes. Os solventes são acessados de um reservatório externo através de tubulação composta de plástico inerte.

Em FPLC as pequenas partículas ou grânulos de gel que compõem a fase estacionária estão contidos em grandes tubos, as colunas. Dependendo do tipo de separação preferido, vários formatos e derivados do meio de separação podem ser usados. A amostra é introduzida no injetor e levada para a coluna onde o solvente flui. Como resultado de diferentes componentes, ao aderir a difusão através do gel, a mistura da amostra fica separada.

As colunas usadas em um FPLC podem separar macromoléculas com base no tamanho, distribuição de carga (troca iônica), hidrofobicidade, fase reversa ou cromatografia de afinidade. Para uma fácil utilização, está disponível uma grande

variedade de pré-embalados de colunas para técnicas como troca iônica, filtração em gel (exclusão de tamanho), interação hidrofóbica e cromatografia de afinidade. (WELLING & WELLING-WESTER, 1989).

O FPLC padrão consiste em uma ou duas bombas de alta precisão, uma unidade de controle, uma coluna, um sistema de detecção (espectrofotômetro UV ou UV / Vis) e um coletor de fração.

Um dos principais problemas relacionados aos sistemas de cromatografia líquida são as reduções de pressão, que podem promover a formação de gases dissolvidos que são difíceis de sair da solução. Os dois locais onde isso ocorre são o lado de sucção da bomba e na saída da coluna.

O propósito de um dado protocolo de purificação é obter o rendimento necessário e a pureza da molécula-alvo em um estado biologicamente ativo para se adequar a sua utilização da forma mais rápida, barata e segura. A qualidade do fracionado varia dependendo do tipo e da quantidade de material biológico, eficiência de separação e seletividade da resina de purificação. O grau de pureza exigido pode ser a necessária para análises básicas como, por exemplo, SDS-PAGE (Dodecil Sulfato de Sódio - Gel de Poliacrilamida) ou ELISA, com apenas impurezas grossas removidas. A pureza exigida deve ser aquela em que a atividade biológica do alvo possa ser mantida. Essas demandas podem ser usadas para determinar a quantidade de matéria-prima necessária para alcançar a meta experimental. As técnicas de cromatografia fornecem quantidade suficiente de rendimento de material ativo e os rendimentos globais dependem do número de etapas no protocolo de purificação.

### **2.1.2 – Eletroforese Unidimensional**

A Eletroforese é um processo analítico usado para a separação de espécies carregadas eletricamente, através da aplicação de uma corrente elétrica contínua. As espécies carregadas são dissolvidas ou suspensas em um eletrólito,

Nos últimos anos, a eletroforese em gel unidimensional estabeleceu-se como a técnica analítica central de experimentação para estudos com proteínas e ácidos nucleicos. (GRAY *et al*, 1984)

A técnica SDS-PAGE é amplamente utilizada para a separação de moléculas de proteína, mensuração de pesos moleculares e características estruturais, análises quantitativas e avaliação do grau de pureza das amostras biológicas. As moléculas são separadas de acordo com o seu tamanho, onde as de menor massa irão migrar mais rapidamente que as de maior massa. Em alguns casos, o formato da molécula também influi. (SCHRÖDER *et al*, 2008)

Durante o processamento da técnica, cada molécula de proteína se liga a um grande número de moléculas do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) carregado negativamente, que supera a carga intrínseca da proteína e faz com que ela migre em direção ao eletrodo positivo, quando uma voltagem é aplicada. As proteínas do mesmo tamanho tendem a migrar através do gel com velocidades similares, pois sua estrutura nativa será completamente desdobrada pelo SDS, de maneira que elas se liguem a uma mesma quantidade de SDS tendo, portanto, a mesma quantidade de cargas negativas. As proteínas maiores, com mais carga, são submetidas a forças elétricas maiores e também a um retardamento maior. Livres em solução, os dois efeitos seriam anulados, o que pode ser resolvido nas malhas do gel de poliacrilamida.

A poliacrilamida é uma mistura dos polímeros acrilamida e bis-acrilamida, sendo que a estrutura da acrilamida é linear, enquanto a outra tem forma de "T". A mistura dessas duas moléculas forma uma "rede" com distintos gradientes de separação dependendo das diferentes relações entre as concentrações dessas moléculas. Além disso, a polimerização das mesmas requer a atuação de catalisadores como Temed e S208. Uma vez polimerizado, o gel de poliacrilamida funciona como uma peneira molecular onde as proteínas maiores são retardadas muito mais do que as menores. Assim, uma mistura complexa de proteínas é fracionada em uma série de diferentes bandas de proteínas arranjadas de acordo com sua massa molecular. As proteínas majoritárias são facilmente detectadas, corando as proteínas do gel com um corante como o azul coomassie, e mesmo as proteínas menos abundantes são visualizadas em géis tratados com coloração de prata ou ouro (com o qual pequenas quantidades podem ser detectadas em uma banda). Entretanto, esse método não é quantitativamente preciso.

### 2.1.3 – Microscopia Eletrônica de Transmissão

A microscopia é um método de análise usado para investigar algumas propriedades da matéria impossíveis de serem observadas sem auxílio de lentes. O uso desse método se aplica a todo ramo da ciência cujo objetivo é pesquisar a microestruturas de materiais orgânicos ou inorgânicos, tendo, portanto, aplicação destacada nas ciências biológicas, químicas, de minerais e de materiais. Esta análise microestrutural permite-nos entender as correlações entre microestruturas, defeitos e propriedades dos materiais.

As análises em microscópio eletrônico de transmissão (MET) são divididas em análise quantitativa, semi-quantitativa e qualitativa e são possíveis devido ao complexo e preciso funcionamento do MET. Esse equipamento consiste de um feixe de elétrons secundários e um conjunto de lentes eletromagnéticas, que controlam o feixe, encerrados em uma coluna evacuada com uma pressão cerca de  $10^{-5}$  mmHg (ROMIG, 1986). Um microscópio moderno de transmissão possui cinco ou seis lentes magnéticas (**fig. 1**) além de várias bobinas eletromagnéticas de deflexão e aberturas localizadas ao longo do caminho do feixe eletrônico. Entre esses componentes, destacam-se os três seguintes pela sua importância com respeito aos fenômenos de difração eletrônica: lente objetiva, abertura objetiva e abertura seletiva de difração. A função das lentes projetoras é apenas a produção de um feixe paralelo e de suficiente intensidade incidente na superfície da amostra. Os elétrons são liberados da amostra pela superfície inferior com uma distribuição de intensidade e direção controladas, principalmente pelas leis de difração impostas pelo arranjo cristalino dos átomos na amostra. Em seguida, a lente objetiva forma a primeira imagem desta distribuição angular dos feixes eletrônicos difratados. Após este processo, as lentes restantes aumentam a imagem ou diagrama de difração para futura observação na tela ou na chapa fotográfica. Na **fig. 2** é mostrada uma fotografia de um MET de 80 Kv. Deve-se destacar que embora existam em operação alguns aparelhos cuja tensão de aceleração é de 1000 Kv, a maioria dos equipamentos utilizados no estudo de materiais (metálicos, cerâmicos e poliméricos) dispõe de tensão de aceleração de até 200 Kv. Os MET utilizados em biologia (materiais orgânicos naturais) em geral operam na faixa de 60 a 80 Kv (ROMIG, 1986).

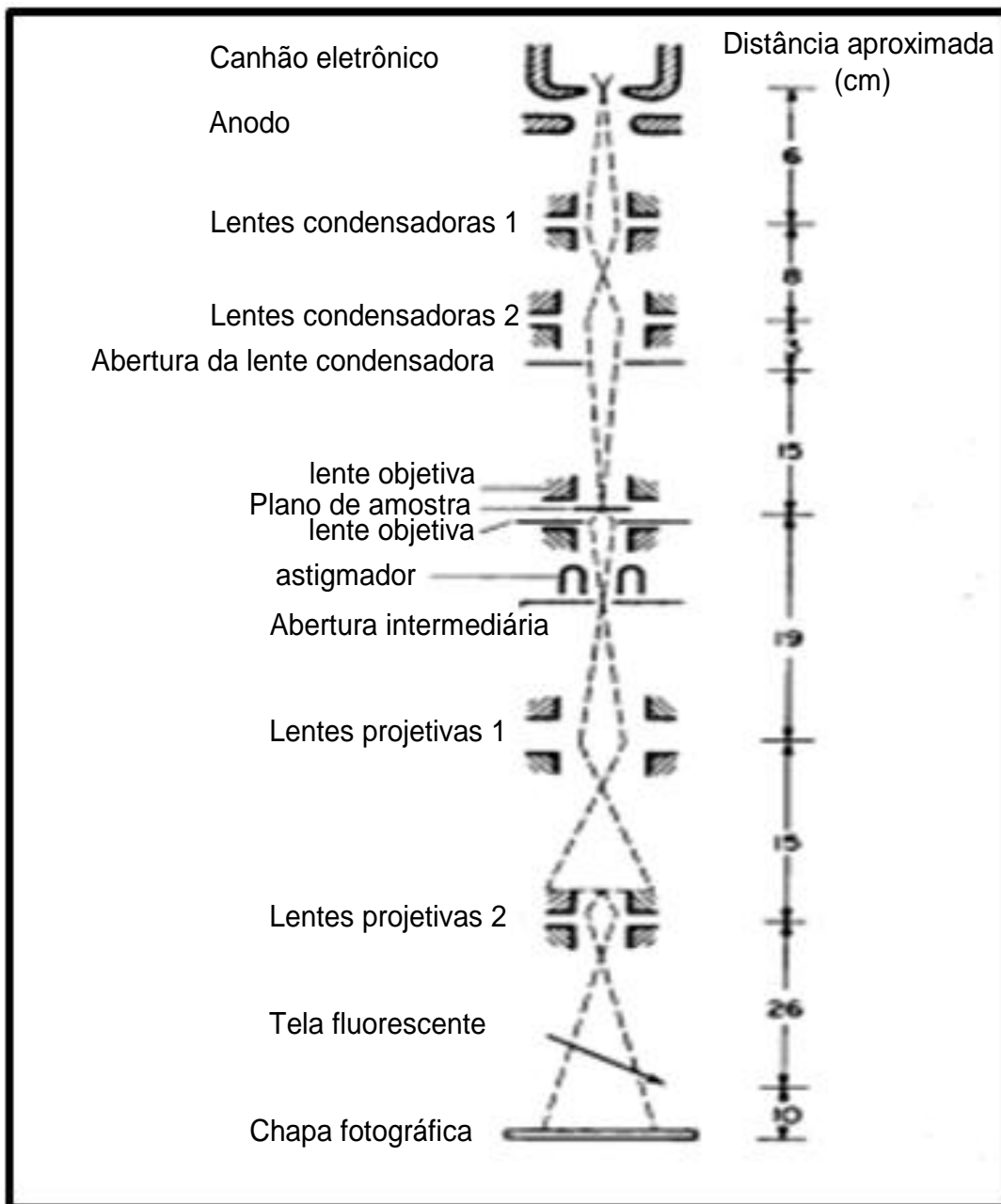
As amostras a serem utilizadas no MET devem ter as seguintes características: espessura de 500 a 5000Å e superfície polida e limpa dos dois lados. A preparação das

amostras é um processo complexo. Amostras para MET são obrigadas a ter, no máximo centenas de nanômetros de espessura, pois, caso contrário, a radiação de nêutrons ou de raios X do feixe de elétrons irá interagir rapidamente com a amostra, e este efeito aumenta, aproximadamente, com o quadrado do número atômico ( $z^2$ ).

A preparação da amostra a ser analisada no MET é específica para cada tipo de material e depende também das informações que se deseja obter da amostra. Como tal, diversas técnicas genéricas têm sido utilizadas para a preparação das seções finas necessárias. Para qualquer análise, a fim de suportar o vácuo do instrumento e facilitar o tratamento, as amostras biológicas podem ser fixadas usando um material de coloração negativa, tal como acetato de uranila, pela incorporação em plásticos. Alternativamente, as amostras podem ser fixadas em temperaturas de nitrogênio líquido, após a incorporação em gelo vítreo (ROMIG, 1986).

Os métodos de formação de imagem em um MET utilizam as informações contidas na saída do fluxo de elétrons a partir da amostra para formar uma imagem. As lentes do projetor permitem o correto posicionamento da distribuição eletrônica de onda para o sistema de visualização. Diferentes métodos de formação de imagem, portanto, tentam modificar as ondas de elétrons que originam-se da amostra de uma forma que seja útil para obter informações com relação à amostra, ou o feixe em si.

Existe uma série de inconvenientes relativos à técnica de MET. Muitos materiais requerem extensa preparação da amostra para que a mesma seja fina o suficiente para ser transparente aos elétrons, o que torna a análise por MET um processo relativamente demorado com um baixo volume de amostras. Como exemplo, sendo quase transparente aos elétrons, um substrato de grafeno tem sido capaz de mostrar isolados átomos de hidrogênio e moléculas de hidrocarbonetos. A estrutura da amostra também pode ser alterada durante o processo de preparação. Também o campo de visão é relativamente pequeno, aumentando a possibilidade de que a região analisada não possa ser característica de toda a amostra. Haverá sempre uma probabilidade na qual a amostra possa ser danificada por um feixe de elétrons, especialmente no caso de materiais biológicos.



**Figura 1:** Esquema representativo do funcionamento do MET.



**Figura 2:** Microscópio eletrônico de transmissão Modelo Morgagni 268  
Universidade Estadual de Santa Cruz/UESC – Ilhéus – Ba.

## 2.2 - Fungos com potencial imunossupressor

Os fungos são organismos que compartilham muitas características básicas com as células de mamíferos e a principal distinção entre os dois grupos é a presença de parede celular rígida. Essa contém moléculas distintas as quais podem ser definidas como *pathogen associated molecular patterns* (PAMP), particularmente polissacarídeos, que raramente estão presentes em mamíferos. Estes PAMP incluem beta-glucanos, quitina e manoproteínas que são reconhecidos por *Pattern recognition receptors* (PRR) do sistema imunológico de células de mamíferos (SORRELL & CHEN, 2009; KUMAR *et al*, 2011).

Algumas espécies fúngicas estão associadas a doenças em humanos, animais e plantas, outras apresentam potencial para controle biológico, muitas possuem metabólitos terapêuticos e enzimas de importância industrial (LEAL *et al*, 2010; SUSI *et al*, 2011; MADSON, 2011). As enzimas proteolíticas, por exemplo, são amplamente utilizadas em biotecnologia, principalmente em indústrias de alimentos, couro e detergente, em processos de biorremediação e na produção de peptídeos terapêuticos (SINGH *et al*, 2010; YIKE, 2011). Essas distintas funções características dos fungos estão sem dúvida associadas à diversidade de biomoléculas encontradas em sua constituição química.

De especial interesse é a utilização com sucesso das biomoléculas fúngicas na medicina. Os  $\beta$ -glucanos, constituintes estruturais presentes na parede celular dos fungos tem significativa função no tratamento de câncer, na imunidade a infecção, na redução de estresse e na restauração de danos na medula óssea (VETVICKA, 2011). Os efeitos do  $\beta$ -glucano referem-se a estimulação da imunidade celular. Em macrófagos, por exemplo, uma vez ligado ao seu receptor específico, ativam essas células a executarem suas diversas funções como: migração, fagocitose, produção de ROS incluindo peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), superóxido ( $O_2^-$ ) e radical hidroxila ( $\cdot OH$ ) (SCHEPETKIN & QUINN, 2006; VETVICKA, 2011). Os  $\beta$ -glucanos são também indutores da produção de óxido nítrico por mecanismos distintos (HASHIMOTO *et al*, 1997; OHNO *et al*, 1996).

Se por um lado os  $\beta$ -glucanos são compostos ativos representantes de um dos mais importantes imunomoduladores na ativação de componentes do sistema imune, por outro lado, moléculas fúngicas em geral peptídeos, são responsáveis por imunomodulação negativa, isto é, inibição da funcionalidade das células do sistema imunológico, caracterizando um estado de imunossupressão no hospedeiro. Dessa forma a imunossupressão pode ser definida como a redução da atividade ou eficiência do sistema imunológico.

Os agentes responsáveis pelos mecanismos de imunossupressão podem ser físicos ou químicos. A radiação é um agente físico responsável pela imunossupressão, devido a particularidade dos componentes celulares do sistema imune. Esse é constituído por diversas células espalhadas por todo o corpo e perfeitamente posicionadas para reconhecer antígenos estranhos, neutralizá-los e destruí-los. As células como linfócitos, por exemplo, por terem alta capacidade de proliferação para amplificação da resposta imunológica, tem a probabilidade de tornarem-se alvo de alterações pela radiação. O impacto da radiação ionizante no sistema imune tem sido esclarecido e esses efeitos dependem do tipo de radiação, da energia da dose, da taxa de dose e do tipo de tecido (UNSCEAR, 2006). Os efeitos imunossupressores causados por altas doses de radiação ionizante são devidos a apoptose das células radiosensíveis, como, por exemplo, os linfócitos. Entretanto, doses baixas, as quais são selecionadas para tratamento de algumas doenças incluindo a leucemia linfocítica crônica, podem regular positiva ou negativamente as funções das distintas células imunes por mecanismos desconhecidos (UNSCEAR, 2006). Acredita-se que para baixas doses a radiação ionizante aumenta a ativação da resposta inflamatória caracterizada pela ativação de fagócitos, neutrófilos e macrófagos no tecido alvo. Essas células ativadas aumentam a atividade lisossomal e a produção de ROS e de NO (LORIMORE *et al.*, 2001). Porém, outras inúmeras moléculas inflamatórias estão envolvidas em muitos níveis da resposta à radiação. Um bom exemplo são as proteínas da família dos *tumor necrosis factor receptor* (TNFR). Essa família tem membros que apresentam os chamados domínios de morte intracelular que podem recrutar proteínas adaptadoras responsáveis por apoptose. A radiação pode induzir a expressão TNFR *in vitro* e *in vivo* em diversas células e tecidos (HALLAHAN *et al.*, 1989; CHIANG & MCBRIDE, 1991). A ligação entre o processo de inflamação

na imunidade inata e a radiobiologia do tecido normal tem sido extensamente discutida (SCHAUE & MCBRIDE, 2010).

Os agentes químicos associados aos mecanismos de imunossupressão são biomoléculas que também agem sobre os componentes celulares do sistema imune. A cortisona, do grupo dos corticosteróides, foi o primeiro imunossupressor identificado, mas sua ampla gama de efeitos colaterais limitou seu uso. Um dos mecanismos de ação dos corticosteróides é a redução da inflamação principalmente no que se refere à produção de citocinas por macrófagos (ROOK & BAKER, 2011). A azatioprina identificada em 1959 é mais específica por agir bloqueando a proliferação de células precursoras de linfócito T (TAYLOR *et al*, 2005). A rampamicina inibe a sinalização efetuada pela citocina IL-2, interferindo assim na proliferação dos linfócitos (FEUERSTEIN *et al*, 1995). Mas a descoberta da ciclosporina em 1970 foi o que permitiu significativa expansão dos procedimentos de transplante de rim entre doadores-receptores menos compatíveis. A ciclosporina A, assim como a droga Tacrolimus (FK-506), tem como alvo para imunossupressão o nuclear factor activated T cells (NFAT) e também está associado à inibição da produção de NO (DUSTIN *et al*, 1999).

Alguns desses imunossupressores químicos podem ser isolados de várias espécies fúngicas entre elas a *Acremonium sp*, de onde se extrai um tetrapeptídeo com atividade inibitória na histona deacetilase e *Coriolus versicolor* que produz um metabólito, polissacaripeptídeo (PSP) semelhante a ciclosporina (SATOSHI *et al*, 2010; LEE *et al*, 2010). É interessante ressaltar que a ciclosporina A, um undecapeptídeo cíclico, é isolada de espécies fúngicas de gêneros distintos, incluindo *Tolypocladium inflatum*, *Cylindrocapon lucidum* e *Trichoderma polysporum* (LEMLEY & KATZ, 1988 OLVAEI *et al*, 1997; BIBIKOVA *et al*, 2009 CHONG, 2009). Esse último gênero apresenta grande diversidade funcional devido ao seu potencial para produzir exoenzimas, por isso o seu uso não se limita apenas à medicina, mas se estende a aplicações industriais e agrícolas.

### 2.3 – Gênero *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma* pertence à classe dos fungos ascomicetos e tem sido comumente utilizado na produção de muitas exoenzimas em escala industrial (por exemplo, as enzimas celulolíticas), além de atuar nos processos de biodegradação de compostos clorofenólicos e na biorremediação do solo (ESPOSITO; SILVA, 1998). Nesse gênero as características morfológicas que definem as espécies são muito variáveis e, por isso, tem sido utilizado pelos taxonomistas o termo ‘agregado de espécies’, referindo-se a um grupo de espécies morfológicamente muito semelhantes (SAMUELS, 1996). As espécies desse gênero são caracterizadas por apresentarem crescimento rápido; as colônias atingem um tamanho de 2 a 9 cm de diâmetro após quatro dias em meio de cultura (ESPOSITO; SILVA, 1998). As colônias podem apresentar-se dispersas e flocosas ou compactadas em tufos. O tamanho e formato dos conídios são bastante variados.

O gênero *Trichoderma* está amplamente distribuído por todo o mundo e ocorre em quase todos os tipos de solo e ambientes naturais, especialmente naqueles contendo matéria orgânica. Muitas espécies do gênero são também encontradas na rizosfera de plantas. O fato das espécies deste gênero desenvolverem-se em vários substratos torna esse grupo de grande interesse biotecnológico (ESPOSITO; SILVA, 1998). Elas são utilizadas como agentes de controle biológico de variadas enfermidades de plantas, ocasionadas pela ação de fungos patogênicos, por serem antagonistas tanto para patógenos radiculares (ex. *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp, *Armillaria* spp, etc.) como da parte aérea (ex. *Venturia* sp., *Botrytis* spp, etc.) (MELO, 1991). Espécies de *Trichoderma* tem sido utilizadas em formulações comerciais empregadas para o controle biológico de fungos causadores de doenças em plantas. Assim a necessidade da aplicação de fungicidas químicos, poluentes do meio ambiente, pode ser reduzida.

### 2.4 – Espécie *Trichoderma stromaticum*

No Brasil, a espécie *T. stromaticum* vem sendo experimentalmente usada como agente de controle biológico com bons resultados desde 1995 e já foi incorporada como base para a produção do biofungicida ‘Tricovab’(BASTOS, 1996). O *T. stromaticum*

recentemente identificado e caracterizado (SAMUELS *et al.*, 2000) tem sido usado no controle biológico do fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa* causador da doença vassoura-de-bruxa do cacau (BASTOS, 1992). Até o momento, tem-se revelado como um bom agente biocontrolador em condições controladas e naturais. Resultados promissores em experimentos preliminares demonstram que essa espécie, através do microparasitismo, pode reduzir em 99% a formação de basidiocarpos em vassouras em contato com o solo e em 56% em vassouras presas à planta (BASTOS, 1996).

Uma estratégia para melhorar a eficiência do biocontrole é explorar a diversidade de microorganismos que pertencem a uma mesma espécie. Souza *et al.* (2006) utilizou métodos moleculares e clássicos para estudar a diversidade genética dos isolados de *T. stromaticum* coletados na região cacauera baiana. Segundo esse trabalho, 91 isolados foram caracterizados em nível genético e classificados em dois grupos genéticos distintos - I e II. Essa classificação também foi relacionada à vários experimentos complementares *in vitro*, incluindo crescimento e esporulação, com a finalidade de verificar até que ponto essa distinção de grupos genéticos poderia ser indicativo de distinto comportamento biológico nessa espécie. Os resultados indicaram haver um maior número e uma maior diversidade entre isolados pertencentes ao grupo I. Além disso, diferenças significativas de comportamento *in vitro* detectadas entre os representantes dos grupos I e II não se traduziram em comportamento semelhante a campo, pois não houve diferença significativa entre as médias de ação de biocontrole entre os grupos.

Uma das estratégias utilizadas por produtores de cacau, da região sul da Bahia, para minimizar a ocorrência do *M. perniciosa* nas lavouras tem sido a pulverização do ‘Tricovab’. A avaliação de risco ecotoxicológico de *T. stromaticum* após administração oral mostrou ausência de toxicidade e infectividade para ratos (CASTRO *et al.*, 2001).

Em geral, os biopesticidas são considerados potencialmente seguros para a saúde humana. Entretanto, os microrganismos do ambiente sozinhos ou associados a moléculas constituintes de bioaerosóis podem desencadear doenças inflamatórias, a exemplo de esporos fúngicos de diversas espécies quando inalados (BANERJEE *et al.*, 2000; HAUSWIRTH; SUNDY, 2004; SAIKAI *et al.*, 2004, HAVAUX *et al.*, 2005). A exposição humana aos fungos utilizados como agentes de biocontrole é extensamente

estudada e em muitos casos já se sabe que alguns desses agentes podem causar efeitos adversos em mamíferos, comprometendo, principalmente, as vias respiratórias. (MADSEN *et al*, 2007).

Recentemente, foi pesquisada a interação de esporos de *T. stromaticum* com componentes celulares do sistema imunológico de camundongos. Em ensaios *in vivo* foi mostrado que o esporo tem efeito sistêmico na modulação da resposta adaptativa dos animais, reduzindo citocinas regulatórias e inflamatórias. Os dados *in vitro* mostraram que os esporos inibem a produção das ROS produzidos por neutrófilo e regulam negativamente a produção de NO por macrófagos. Em conjunto os achados desses autores sugerem a possibilidade do fungo *T. stromaticum* também possuir potencial imunossupressor (ALVES-FILHO *et al*, 2011).

## **2.5 – Consequências da imunossupressão em macrófagos**

Os macrófagos são fagócitos derivados de células mononucleares do sangue periférico, os monócitos, que migram para os tecidos normalmente ou durante processos inflamatórios (GEISSMANN *et al*, 2010). Os macrófagos estão presentes em todos os tecidos e apresentam notável plasticidade, podendo mudar sua fisiologia de acordo com o estímulo ambiental, o tipo de resposta imune (inata ou adaptativa) e fatores produzidos por eles mesmos, originando populações de macrófagos com distintas funções (GORDON, 2007; MOSSER; EDWARDS, 2010). A classificação das populações de macrófagos é baseada em suas funções, incluindo, principalmente, três: defesa do hospedeiro contra patógenos, ferida e cura e regulação da resposta imune. Dessa forma os macrófagos podem ser: 1) Macrófagos ativados classicamente: esse termo tem sido usado para designar os macrófagos que são efetores produzidos em resposta a sinais de citocinas pró-inflamatórias como IFN-gama e TNF. Essa população de macrófagos apresenta alta capacidade de eliminação de microrganismos por produzirem grandes quantidades de ROS e NO, potentes moléculas microbicidas (DALE *et al*, 2008). A atuação dessa população de macrófagos confere resistência ao indivíduo contra diversas infecções incluindo *Leishmania* spp (NANDAN *et al*, 1995); 2) Macrófagos ativados alternativamente: são aqueles presentes em processos de

cicatrização de feridas. Um dos primeiros sinais em ferimentos do tecido é a presença de IL-4 (LOKE *et al*, 2007). As fontes iniciais dessa citocina são os basófilos e os mastócitos embora outras células também podem produzi-la. Além da lesão, essas células também produzem IL-4 em resposta a quitina, biopolímero presente em alguns fungos e parasitas (REESE *et al*, 2007). A IL-4 produzida converte macrófagos teciduais em uma população de células que estão programadas para promover a cicatrização de feridas por estimular a atividade da proteína arginase em macrófagos. Essa enzima converte arginase em ornitina, um precursor de poliaminas de colágeno que contribuem para a produção da matriz extracelular. Esses macrófagos parecem ser mais suscetíveis a algumas infecções, o que os distingue da capacidade efetora dos macrófagos ativados classicamente (KREIDER *et al*, 2007; RAES *et al*, 2007); 3) Macrófagos regulatórios: similar às duas populações de macrófagos descritas acima, esses também respondem a estímulos da imunidade inata e específica. Apesar da resposta de estresse não ser tipicamente considerada parte da imunidade inata, o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) pode exercer efeitos marcantes nos macrófagos. Um exemplo é a liberação de glucocorticóides pelas células das adrenais em resposta às situações de estresse, que pode inibir as funções inflamatórias e a defesa do hospedeiro mediada por macrófagos, devido à inibição da transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias. Esse fenótipo celular caracteriza a população de macrófagos regulatórios (MOSSER; EDWARDS, 2010).

Diante da complexa diferenciação funcional de macrófagos quando expostos a sinais endógenos e exógenos, a caracterização e manipulação de populações específicas dessas células submetidas a estímulos distintos torna-se alvo de estudo de grande relevância para fins terapêuticos. Nesse contexto, os achados de Alves-Filho (2011) referentes à supressão da função de produção de NO por macrófagos após interação dessas células com os esporos de *T. stromaticum* permitem inferir que, apesar da ausência de infectividade e toxicidade, o *T. stromaticum* pode desencadear processos de susceptibilidade em indivíduos a outros microrganismos, exacerbando a progressão da infecção, principalmente as causadas por microrganismos intracelulares. Por outro lado, os mecanismos de imunossupressão desencadeados por *T. stromaticum* podem reduzir os processos inflamatórios característicos das hipersensibilidades, incluindo alergias e autoimunidades.

### 3 - OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi:

- Fracionar e selecionar as possíveis moléculas do fungo *Trichoderma stromaticum* que apresentam potencial imunossupressor na funcionalidade de fagócitos utilizando dois importantes métodos de análise: a Microscopia Eletrônica de Transmissão e a filtração molecular acoplada a FPLC.
- Caracterizar a ultraestrutura do esporo de *T. stromaticum* e dos fagócitos que interagem com o esporo por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET);
- Fracionar as biomoléculas constituintes do esporo;
- Selecionar as frações do esporo com potencial inibitório da produção de NO por macrófagos;
- Testar o efeito das frações do esporo na viabilidade de macrófagos.

## 4 - METODOLOGIA

### 4.1 - Origem dos reagentes

Todos os reagentes utilizados nesse trabalho foram de alto teor de pureza (P.A) provenientes de um dos seguintes laboratórios: Sigma Chem. Co, Amresco, Merck, Bioehringer Mannheim, Difco, GE Healthcare, BDH Laboratory Supplies e Santa Cruz.

### 4.2 - Animais

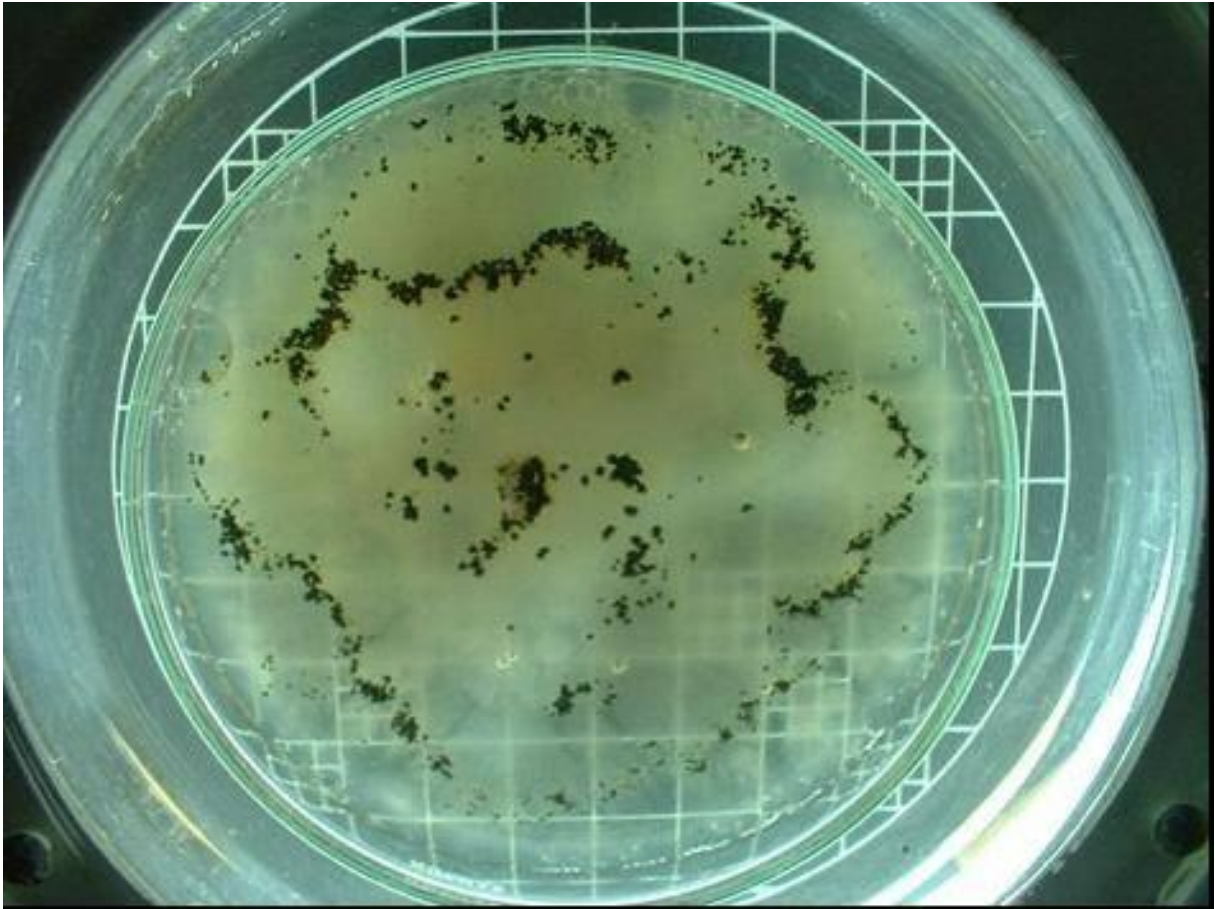
Para os experimentos *in vivo* e *in vitro* foram utilizados camundongos machos entre 8 e 12 semanas de idade das linhagens C57BL/6 e SWISS. Os animais foram produzidos no Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG) e foram mantidos no biotério do Departamento de Parasitologia desse mesmo Instituto.

#### 4.2.1 - Sacrifício

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

### 4.3 - Obtenção de esporos do fungo *Trichoderma stromaticum*.

O isolado do fungo *Trichoderma stromaticum* ALF 64, usado na preparação do Tricovab® (Cepec-Ceplac), foi gentilmente cedido pelo Dr. Alan Pomella (Almirante Cacau, Itajuípe, BA). O fungo foi cultivado em placas de Petri em meio Batata Dextrose Agar (BDA) em temperatura ambiente durante 7 a 15 dias (**Fig. 3**)



**Figura 3** - Crescimento de isolados de *T. stromaticum* em meio BDA.

#### **4.4 - Avaliação ultraestrutural do esporo de *T. stromaticum* e da interação esporo/macrófago.**

Para avaliar e comparar a ultraestrutura de esporos ativos (vivos) e inativos (mortos) de *Trichoderma stromaticum* realizou-se a análise em MET dos esporos ativos e inativos a 100 °C por 15 minutos, previamente centrifugados e emblocados em gel de agarose a 12%. O processamento das amostras para MET incluiu as etapas de fixação, pós-fixação, desidratação, infiltração, inclusão, corte, avaliação dos cortes em microscopia de luz e contrastação. Para isso, as amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão Cacodilato de sódio (0,1M; pH 7,12) e pós- fixadas em tetróxido de ósmio 1%. A etapa de desidratação foi realizada em concentrações crescentes de acetona: 70%, 90%, 95% e 100%. A infiltração foi feita em resina Epon, enquanto a inclusão consistiu em polimerização da amostra em estufa a 60 °C por 24h, dando origem a blocos contendo os esporos a serem analisados imersos em resina Epon.

Após o emblocamento das amostras realizou-se a retirada do excesso de resina e procedeu-se a confecção de cortes semi-finos, com espessura de 1,5  $\mu\text{m}$  ao micrótomo (ULTRACULT) que foram corados com azul de toluidina. As lâminas contendo os cortes foram analisadas em microscopia de luz para avaliação da viabilidade da amostra. Uma vez viável a mesma passou por corte ultra-fino e análise no MET.

A Microscopia Eletrônica de Transmissão foi o método de análise escolhido também para a caracterização da interação esporos/macrófagos. Dessa forma, após o espalhamento de  $5 \times 10^6$  macrófagos em placas de petri foram adicionados  $5 \times 10^5$  esporos e incubados em estufa a 37 °C e 5% de  $\text{CO}_2$  por 18 horas. Em seguida, as células foram fixadas em glutaraldeído e processadas para análise no MET, como descrito anteriormente.

#### **4.5 - Obtenção de extrato bruto da cultura do *Trichoderma stromaticum*.**

Entre 7 e 14 dias de cultivo, os esporos de *Trichoderma stromaticum* ALF 64 foram coletados por lavagem da superfície micelial com etanol 95% (5mL/placa). Os esporos foram contados em câmara hemocitométrica de Newbauer e a solução contendo  $2 \times 10^7$  esporos foi homogeneizada em agitador por 24 horas. Após homogeneização, a solução foi centrifugada a 10.200 rpm por 20 minutos a 18 °C (FUKUZUWA *et al.*, 2008). A solução etanólica obtida foi denominada extrato bruto de *T. stromaticum* (ExtTs).

#### **4.6 - Fracionamento do extrato bruto de *T. stromaticum* (ExtTs).**

A solução etanólica ExtTs foi concentrada em liofilizador K105 (LIOTOP) . Esse processo consiste em secar a solução ExtTs eliminando todo o líquido por sublimação. Após secagem do ExtTs, o mesmo foi solubilizado em tampão Tris-HCl, 20  $\mu\text{mol}$  em pH 8,0. Parte do ExtTs foi reservado para os ensaios biológicos e a outra parte para cromatografia utilizando uma coluna de filtração molecular superose<sup>TM</sup> 12 10/300 GL acoplada ao equipamento FPLC, usando como referência as proteínas albumina e aprotinina. Para a passagem de 500  $\mu\text{L}$  da solução do extrato bruto na coluna, a sensibilidade do FPLC usada foi igual a 1,0, e o eluato (solução liberada da coluna) foi

monitorado na região do ultravioleta correspondente a 280 nm. Após corrida do ExtTs na coluna de separação, foram recolhidas 25 frações correspondentes ao fracionamento do mesmo. As frações foram liofilizadas e mantidas a 4 °C até o momento do uso.

#### **4.7 - Quantificação de proteínas totais do ExtTs.**

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976) modificado. Para essa dosagem, foi feita diluição seriada do padrão de proteína *bovine serum albumin* (BSA) em água tipo I partindo de  $5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  –  $0,625 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ; utilizou-se uma amostra de branco (água tipo I). Aos tubos de ensaio numerados previamente adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  das amostras (teste, padrões e branco), 10  $\mu\text{L}$  de HCl 0,1 M, 80  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O tipo I e 3,4 mL de reagente de Bradford diluído em água tipo I. A mistura foi distribuída em placa de ELISA (200  $\mu\text{L}$ / poço) em duplicata e lida em leitor de ELISA a 595 nm.

#### **4.8 - Eletroforese de Gel SDS-PAGE**

O ExtTs foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE). Para a separação das proteínas, a 5  $\mu\text{g}$  do ExtTs ativo e inativo ou dos *pools* do ExtTs foi acrescentado tampão de amostra contendo  $\beta$ -mercaptoetanol a 10%, azul de bromofenol a 0,05%, glicerol a 20% e SDS a 4%. Em seguida, as amostras foram fervidas por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida a 12,5% a 200V (BIO-RAD system) por aproximadamente 60 minutos. Após a SDS-PAGE, o gel contendo as amostras foi corado em solução de azul de Coomassie (R250) a 0,1% em metanol (40%) e ácido acético (17%) por pelo menos 12 horas. Em seguida, o gel foi descorado por solução de metanol (30%) e ácido acético (17%). Foi utilizado um marcador de peso molecular: BenchMark Pre-stained protein ladder (Invitrogen).

## **4.9 - Ensaios biológicos para seleção da biomolécula com potencial imunossupressor**

### **4.9.1 - Obtenção e cultivo de macrófagos peritoneais de camundongos**

Para obtenção de macrófagos peritoneais, camundongos C57BL/6 foram inoculados por via intraperitoneal com 2 mL de meio tioglicolato 3%. Após 4 a 5 dias os animais foram sacrificados e, em seguida, 5 mL de tampão fosfato (PBS) 1X, 4 °C, foram injetados na cavidade peritoneal e após massagem o lavado foi recolhido com seringa. O lavado, rico em células peritoneais, foi centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Após descarte do sobrenadante, as células foram diluídas em 5 mL de meio RPMI 1640 com 10% de Soro Fetal Bovino (RPMI/SFB) e gentamicina (40 mg/mL e contadas em câmara hemocitométrica de Neubauer.

### **4.9.2 - Ativação de macrófagos para produção de NO**

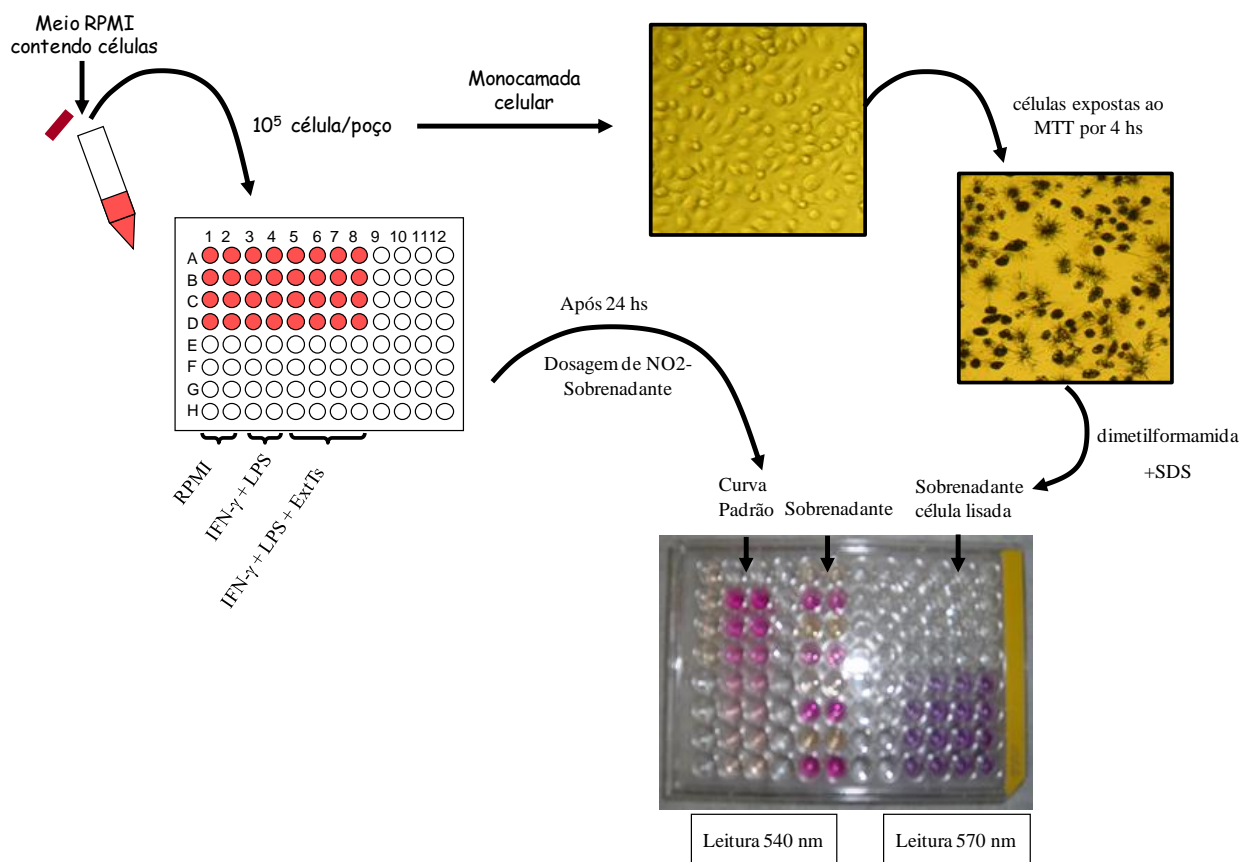
Para os ensaios biológicos os macrófagos ( $1 \times 10^5$  células/poço) foram espalhados em placas de cultura de 96 poços e incubadas a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas, o sobrenadante da placa foi substituído por meio RPMI/SFB contendo ativadores da produção de NO por macrófagos, 40 U/mL de Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) + 10 ng.mL<sup>-1</sup> de LPS (lipopolissacarídeo purificado de *Escherichia coli* 0127), e *pools* contendo frações provenientes do ExtTs nas seguintes condições: i) macrófagos em meio RPMI/SFB ativados (controle positivo); ii) macrófagos em meio RPMI/SFB ativados + 10  $\mu$ L dos *pools* 1, 2, 3 e 4; iii) macrófagos em meio RPMI/SFB ativados + 5  $\mu$ L dos *pools* 1, 2, 3 e 4 ; iv) macrófagos em meio RPMI/SFB ativados + 2,5  $\mu$ L dos *pools* 1, 2, 3 e 4; v) macrófagos em meio RPMI/SFB ativados + 1,25  $\mu$ L dos *pools* 1, 2, 3 e 4. Como controle negativo as células foram cultivadas na ausência de ativadores e *pools* de ExtTs. As células cultivadas na ausência de ativadores, mas na presença das diferentes concentrações dos *pools*, foram avaliadas para investigar se os mesmos sozinhos modulam a produção de NO.

#### 4.9.3 - Quantificação da produção de Óxido Nítrico

Após 24 h de interação entre os macrófagos e as diferentes concentrações dos *pools*, o óxido nítrico foi determinado indiretamente pela quantificação do nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) resultante de sua oxidação no sobrenadante de cultura de macrófagos. A quantificação foi feita pela reação colorimétrica de Griess, a qual combinou-se em placas de 96 poços 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante com 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess; Essa mistura foi preparada na hora do uso, na proporção de 1:1 de 1% de sulfanilamida em 2,5% de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  e 0,1% de diamina-di-hidroclorido naftaleno (NEED) em 2,5% de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (HIBBS *et al.*, 1989). Após 10 minutos, foram feitas medidas de absorvância a 540 nm das diferentes amostras preparadas e estas foram comparadas aos valores da curva padrão, a qual foi obtida pela dosagem de nitrito de sódio diluído em meio RPMI em concentrações que variaram de 2 a 200  $\mu\text{M}$  (**Fig. 4**).

#### 4.9.4 - Teste de viabilidade

O teste de viabilidade celular foi realizado pelo ensaio de MTT (3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium brometo) conforme descrito por Mosmann (1983). Este método colorimétrico consiste na capacidade da enzima desidrogenase mitocondrial nas células vivas reduzir o sal MTT no produto colorido denominado formazana. Após 24 horas da ativação dos macrófagos, 20  $\mu\text{L}$  de solução de MTT 5mg.mL<sup>-1</sup> foi adicionada nos poços e as células foram incubadas por 4 horas a 5%  $\text{CO}_2$ , 37 °C. Após este período, o sobrenadante foi descartado e as células foram lisadas com 150  $\mu\text{L}$  de dimetilformamida em água com SDS 10% (1:1 v/v). A absorvância da solução foi lida a 570 nm e o resultado foi expresso como um percentual do controle definido como 100% (**Fig. 4**).



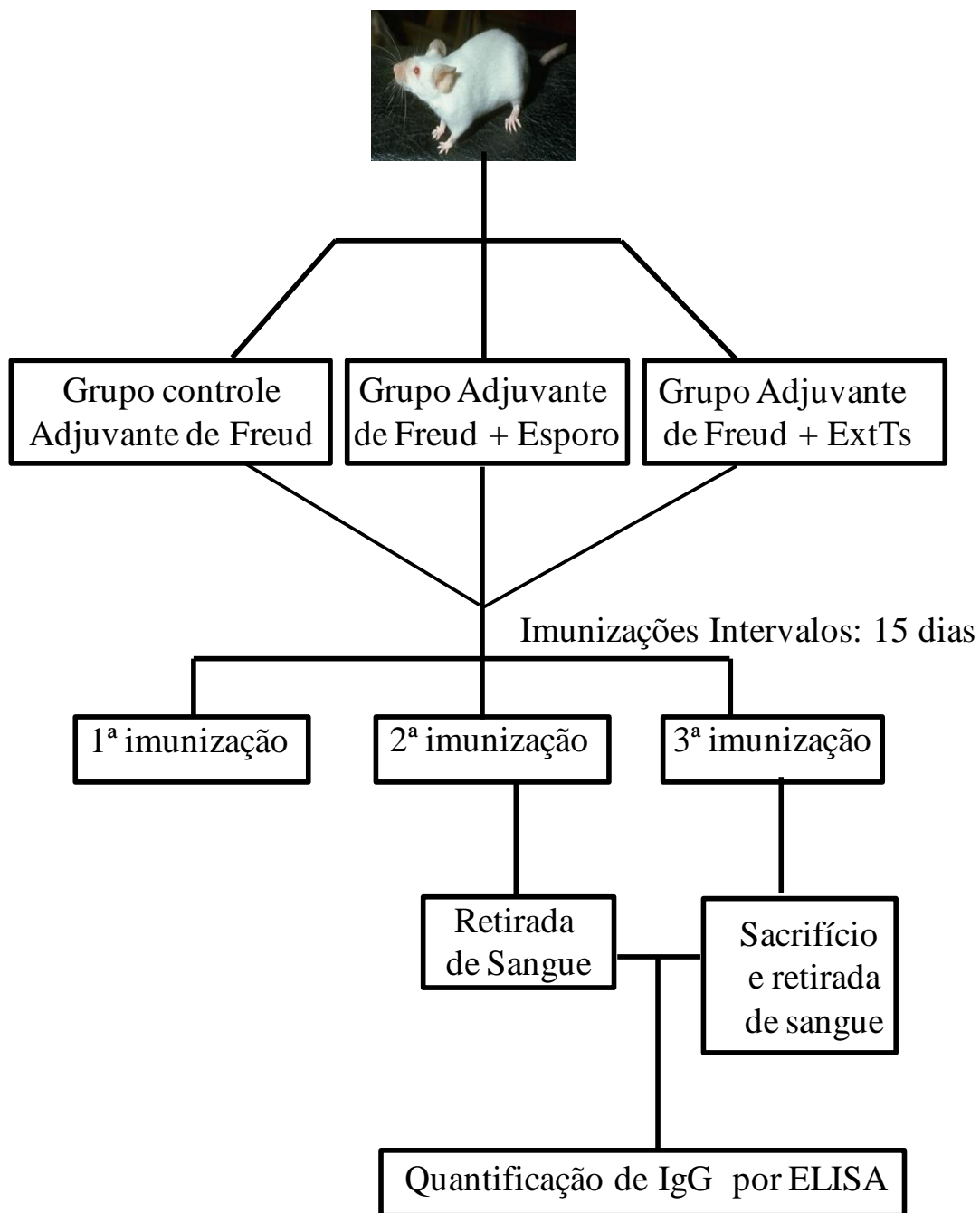
**Figura 4** - Esquema do ensaio colorimétrico para quantificação de  $\text{NO}_2^-$  pela Reação de Griess e para obtenção da densidade ótica do lisado de células expostas a MTT.

#### 4.9.5 - Imunização de camundongos com esporos e extrato bruto de *T. stromaticum*

Fêmeas de camundongos Swiss (n=18) foram sensibilizadas por via peritoneal com ( $1 \times 10^5$ ) esporos e 10 µg ExtTs. Os animais foram divididos em 3 grupos (n=6) que foram tratados da seguinte forma: grupo controle negativo exposto a 100 µL de adjuvant Freud, grupo esporo exposto a 100 µL de adjuvant + esporo ( $1 \times 10^5$ ) e o grupo ExtTs imunizado com 100 µL de adjuvant + extrato (10 µg). Para cada grupo foram feitas três imunizações com intervalo de 15 dias entre cada uma. Para verificar a produção de anticorpos 24hs antes do último desafio, aproximadamente 500 µL do sangue de cada animal foi retirado via ocular sem causar dano ao animal. Logo após o sangue foi centrifugado a 3000 rpm por 10 min para obtenção do soro, o qual foi congelado para posterior quantificação de imunoglobulinas G (IgG). Quinze dias após o último desafio, os animais foram sacrificados, o sangue foi retirado e as amostras de soro foram novamente recolhidas, para verificar um possível aumento da produção de anticorpos e proceder a quantificação de imunoglobulinas IgG (Fig. 5).

#### 4.9.6 - Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ELISA

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com diferentes antígenos incluindo soro de camundongos expostos ao adjuvante de Freud, aos esporos ( $1 \times 10^5$ ), ao extrato bruto de *T. stromaticum* (ExtTs), aos *pools* 2 e 4 e a ciclosporina A, um peptídeo conhecidamente imunossupressor. As placas foram incubadas *overnight* a 37 °C em estufa seca. Após incubação, procedeu-se ao bloqueio das mesmas, o qual se deu pela adição da solução de PBS + 2,5% BSA em cada poço. Após 2 horas a 37 °C na estufa, descartou-se a solução de bloqueio e novamente as placas foram incubadas com o soro primário (soro obtido dos animais) diluído 1:100 em PBS + 1,25% BSA por 1 hora. As placas foram retiradas da estufa e lavadas com PBS-Twen por 4x e incubadas com solução contendo anticorpos de cabra anti-IgG (diluídos 1:2000 em solução PBS + 1,25% BSA) por 1 hora a 37 °C. Para revelação da reação colorimétrica o reagente utilizado foi o *Optical path difference* (OPD) diluído em tampão citrato e água oxigenada (revelador). O OPD foi colocado nas placas após as mesmas serem lavadas 4 vezes com PBS-Twen.



**Figura 5** – Esquema representativo da Imunização de camundongos Swiss para quantificação de IgG por Elisa.

Posterior a adição do revelador, as placas foram incubadas por 7 minutos a 37 °C no escuro. A reação foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e lida em leitor de ELISA( marca: Versa max – microplate reader, modelo: Molecular devices) utilizando-se o filtro de 492 nm. Uma curva padrão obtida pela incubação com anticorpos IgG de camundongos foi utilizada para cálculo da concentração de IgG sérica. Nas placas, uma coluna continha o branco (PBS + 1,25% BSA) e as outras colunas os soros primários, tudo em triplicata.

#### **4.10 - Análise de Imagens**

Para a documentação dos dados ultraestruturais dos esporos e da interação desses com macrófagos de camundongo, utilizou-se Microscópio Eletrônico de Transmissão (Modelo Morgagni 268) da Universidade Estadual de Santa Cruz, na Bahia, acoplado a um sistema de captura de imagem. O sistema ImageQuant 100 (GE) sobre um transluminador de luz branca foi utilizado para capturar imagens dos géis de poliacrilamida. Este equipamento está locado no departamento de parasitologia do Instituto de ciências biológicas da UFMG.

#### **4.11 - Análise Estatística**

O Teste *t* não paramétrico foi utilizado para determinar a diferença significativa entre os grupos, empregando-se o programa GraphPad Prism 5.0. A significância foi avaliada utilizando valor  $p < 0,05$  ou  $< 0,01$ . Os resultados referentes aos ensaios biológicos são representativos de 3 experimentos independentes.

## 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o interesse de investigar as biomoléculas do fungo *T. stromaticum* que possuem potencial imunossupressor alguns métodos de análise incluindo Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) foram utilizados. A ultraestrutura dos esporos de *T. stromaticum* ativos e inativos, bem como alterações nos macrófagos após interação com os esporos fúngicos, foram revelados no MET. Enquanto, a técnica FPLC nos permitiu fracionar moléculas do extrato bruto (ExtTs) obtidas dos esporos ativos.

Ensaio biológico, incluindo: internalização de esporos por macrófagos, efeitos do ExtTs na modulação da produção de óxido nítrico por macrófagos ativado, viabilidade celular e produção de anticorpos por camundongos expostos aos esporos e ao ExtTs foram utilizados para selecionar as possíveis biomoléculas do ExtTs com potencial imunossupressor.

### 5.1 - Ultraestrutura dos esporos de *T. stromaticum* ativos e inativados pelo calor

Para a análise da ultraestrutura dos esporos de *T. stromaticum*, lâminas contendo secções dos esporos ativos e inativos foram coradas com azul de toluidina. A coloração nos permitiu comparar a estrutura dos esporos ativos e inativos no microscópio de luz e selecionar as amostras para o procedimento de corte ultrafino para análise no MET. A figura 6 mostra imagens obtidas nos microscópios.

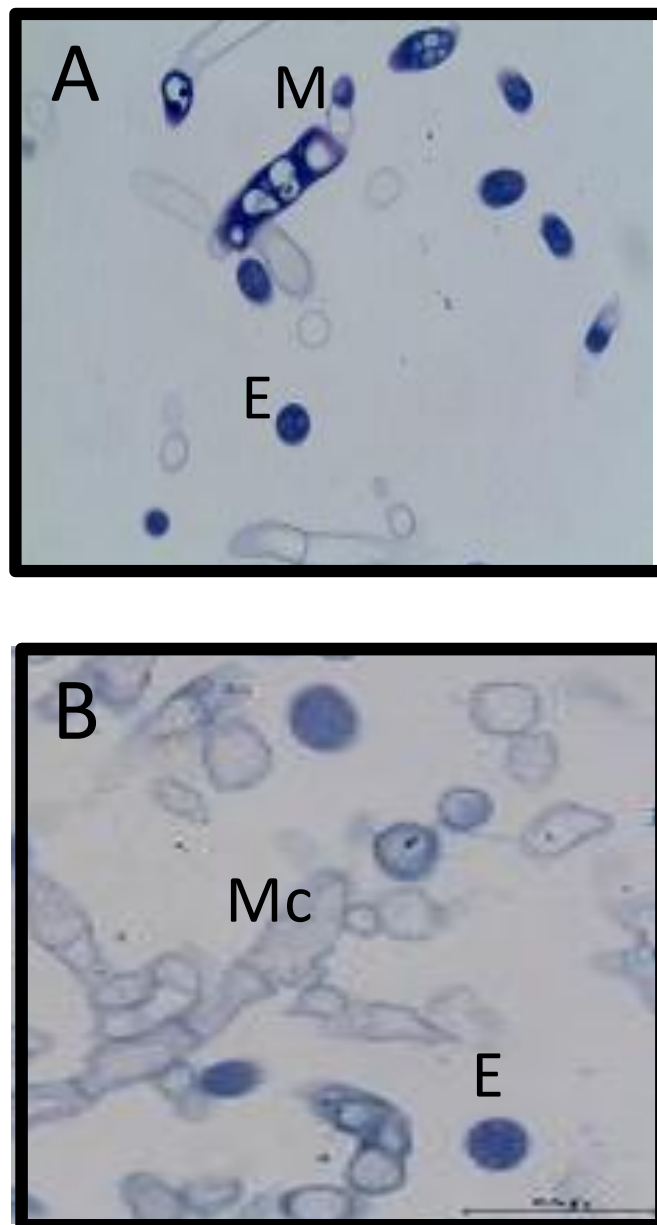
De acordo com a figura 6 podemos observar que as lâminas expostas ao microscópio de luz mostraram esporos inativos (**Fig. 6B**) com tamanho aumentado quando comparados aos esporos ativos (**Fig. 6A**).

Uma vez verificada a qualidade dos cortes semi-finos realizou-se a confecção de cortes ultra-finos e contrastação do material para posterior análise em MET. As figuras 7A e 7B mostram imagens obtidas no MET para esporos ativos e inativos. A fig. 7A mostra que os esporos ativos apresentaram citoplasma organizado, com organelas bem

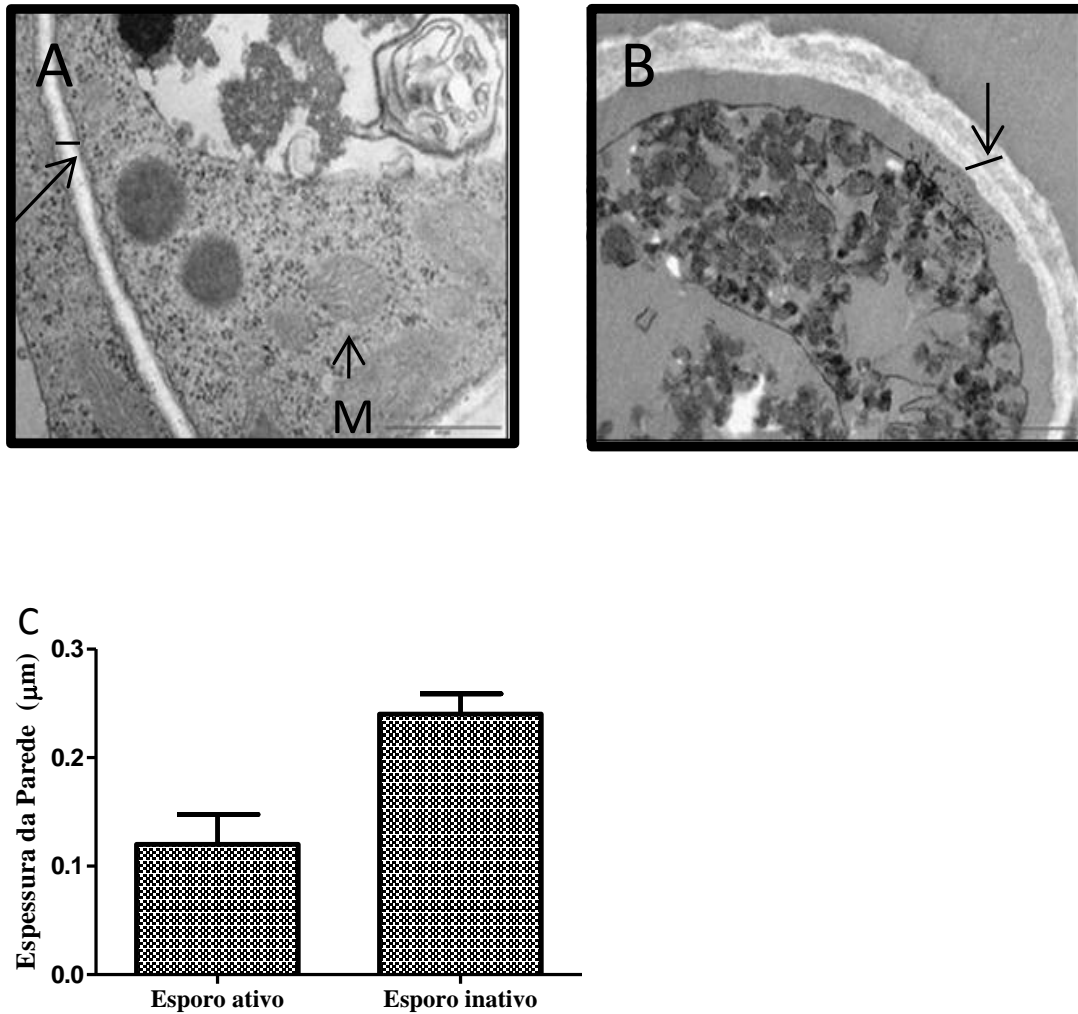
definidas em contraste à ausência de organização interna dos esporos submetidos ao aquecimento (**Fig. 7B**).

Além disso, apesar de não ocorrer em todos os esporos observados, notou-se que a parede celular dos esporos aquecidos é significativamente mais espessa quando comparada a parede dos esporos não-aquecidos (média de 7 esporos medidos em 3 pontos distintos da parede) (**Fig. 7C**). Esses resultados confirmam a alteração morfológica encontrada nos esporos corados com azul de toluidina e observados no microscópio de luz (**Fig. 6B**).

A parede celular ou cápsula de *T. stromaticum* é constituída de material mucilaginoso (MELO; FAULL, 2004). Dados da interação desses esporos com neutrófilos e macrófagos murinos mostraram que a função de produção de ROS e NO, respectivamente, é totalmente inibida após 24 hs da interação. Quando a interação fagócito/esporos foi realizada com esporos aquecidos a produção de ROS foi inibida aproximadamente 50%, mas a produção de NO por macrófagos não foi alterada. (ALVES-FILHO *et al*, 2011). Dessa forma é possível inferir que a alteração na espessura da parede dos esporos de *T. stromaticum* decorrente do estresse provocado pelo aquecimento pode contribuir para inativação de mecanismos dos esporos importantes para estimular as funções de fagócitos.



**Figura 6 - Análise morfológica dos esporos de *Trichoderma stromaticum*.** Os esporos extraídos da placa de cultura foram fixados em glutaraldeído e processados com resina epon. Cortes semi-finos foram realizados e corados com Azul de Toluidina. Esporos ativos (A) e inativos (B)



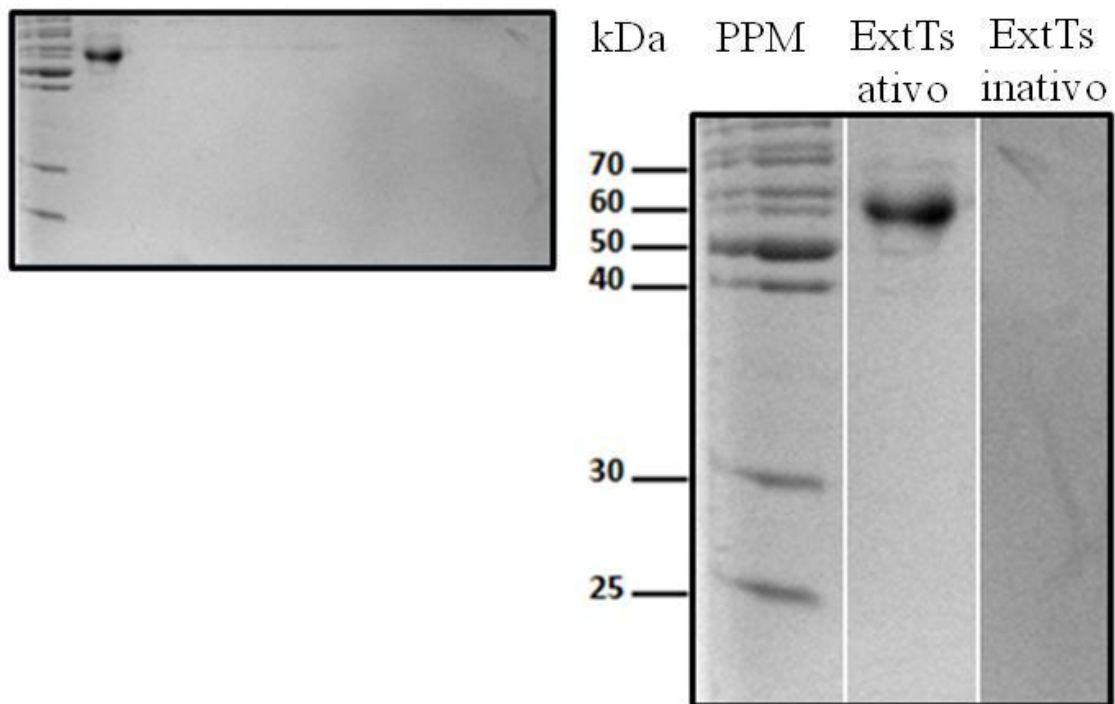
**Figura 7 - Análise ultraestrutural dos esporos de *Trichoderma stromaticum*.** Ultraestrutura de esporos ativos (A) e inativos (B) fixados em glutaraldeído e processados para análise em Microscópio Eletrônico de Transmissão. Espessura da parede do espora ativo e inativo (C). Seta indica parede do espora, M- Micélio, E- esporos.

## 5.2 - Perfil protéico do ExtTs a partir de esporos ativos e inativos.

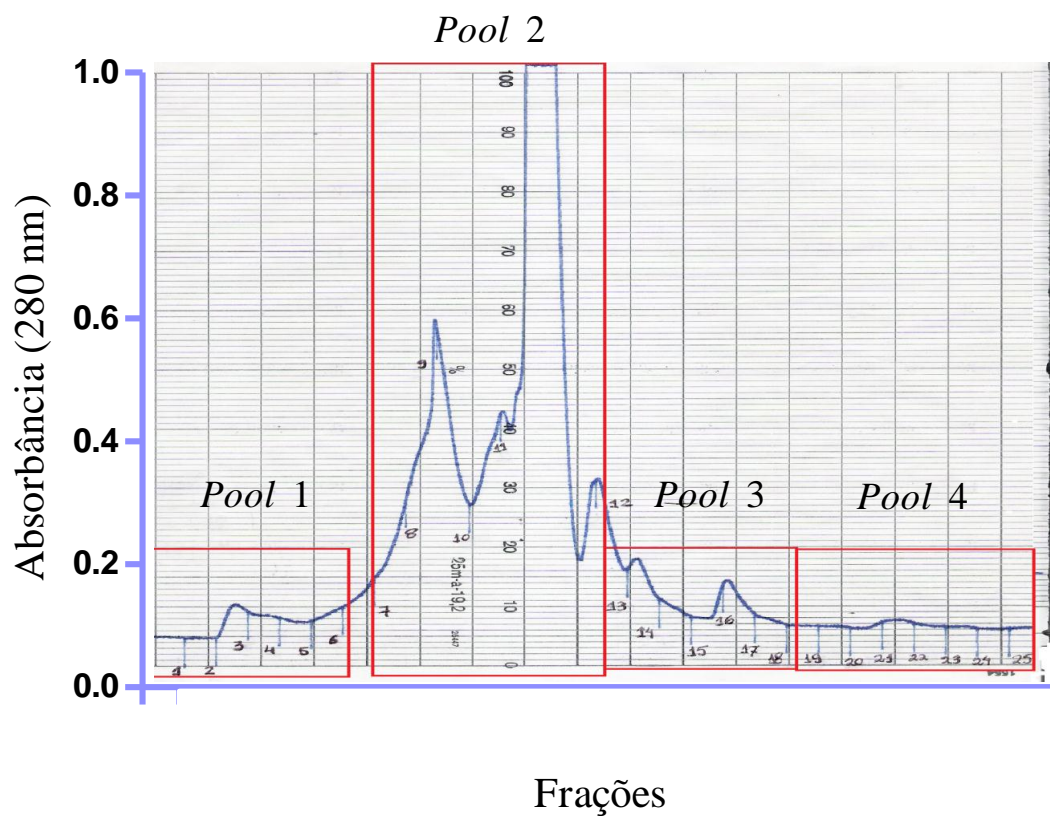
Para estimar a massa molecular das proteínas presentes no ExtTs provenientes de esporos ativos e inativos utilizou-se a eletroforese em gel de poliacrilamida. Após a quantificação de proteínas pelo método de Bradford, os ExtTs foram aquecidos e posteriormente 5 µg de proteína de cada extrato foi aplicada em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) gradiente 12,5%. Os perfis eletroforéticos das proteínas dos ExtTs ativos e inativos do padrão de peso molecular (25 kDa a 70 kDa) podem ser visualizados na **Fig. 8**. A análise do gel permitiu observar uma banda muito nítida em amostras do ExtTs de esporos ativos a qual coincide com proteínas do padrão de peso molecular em torno de 60,0 kDa. A lâmina contendo os ExtTs de esporos ativos apresentou marcação extremamente leve correspondente a bandas referentes a proteínas de peso molecular de 50 kDa e de aproximadamente 70 kDa. Nenhuma banda foi observada na região do gel correspondente a amostra de ExtTs de esporo inativo.

## 5.3 - Fracionamento de biomoléculas do ExtTs ativo.

Para investigar as proteínas presentes na mistura complexa do ExtTs ativo foi utilizada uma coluna de filtração molecular acoplada ao FPLC. Após aplicação do material na coluna de filtração molecular de superose, foram recolhidas 25 amostras que correspondem às frações do ExtTs. A figura 9 mostra o perfil de eluição e protéico obtido para o ExtTs ativo. A análise do perfil do cromatograma mostra um espectro com presença de 7 picos bem definidos, sendo a fração 11 relevante no que diz respeito à grande quantidade de material protéico.



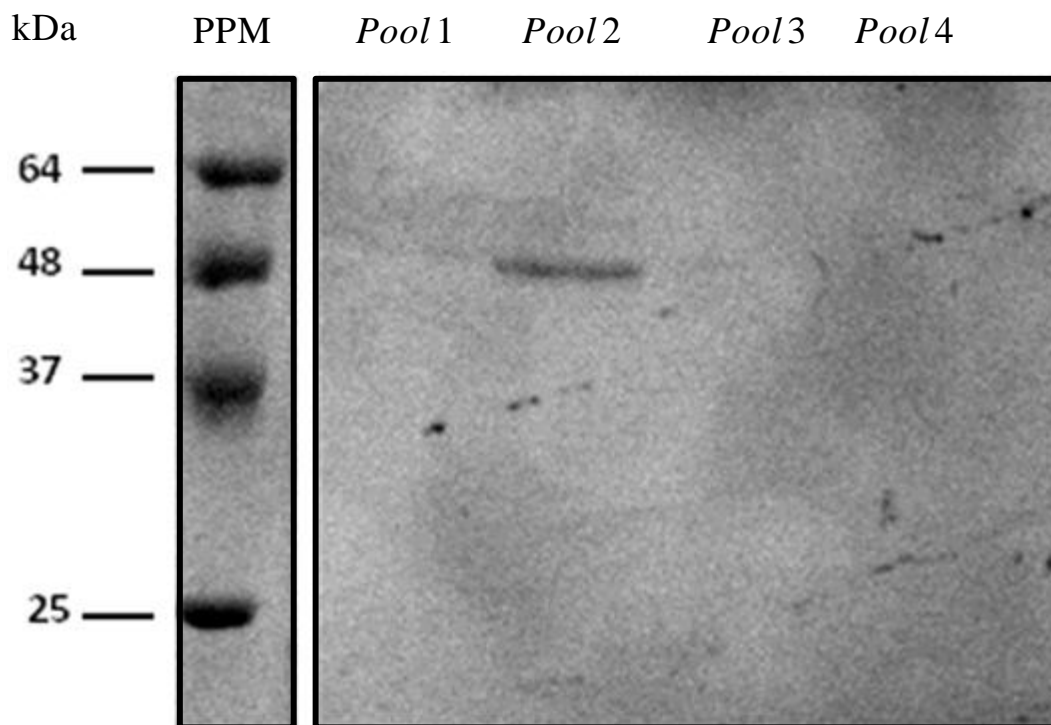
**Figura 8- Perfil protéico do ExtTs de esporos ativos e inativos.** Esporos de *T. stromaticum* submetidos ou não à temperatura de 100°C por 15 minutos foram homogeneizados por 24 horas em etanol 95%. A solução etanólica foi liofilizada e solubilizada em tampão Tris-HCl pH8. As proteínas totais do ExtTs foram quantificadas pelo método de Bradford e 5µg de proteína de cada extrato foi separado por gel de poliacrilamida 12,5%. Canaleta 1 PPM: padrão de peso molecular; Canaleta 2 ExtTs ativos (extrato bruto de esporos não aquecido); Canaleta 8 ExtTs inativo (extrato bruto aquecido).



**Figura 9- Fracionamento de biomoléculas do ExtTs em coluna de filtração molecular acoplada ao FPLC.** O perfil de eluição de ExtTs ativo foi realizado em coluna superose<sup>TM</sup> 12 10/300 GL previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 20  $\mu$ M pH 8.0. As frações foram eluídas em fluxo constante de 2mL/min a densidade ótica de 280 nm.

Pela dificuldade de testar o potencial imunossupressor de cada uma das 25 frações nos diferentes ensaios biológicos, optamos por selecionar inicialmente um *pool* de frações com atividade inibitória das funções biológicas. Dessa forma as frações foram agrupadas e denominadas como: *pool* 1 (frações 1 a 6), *pool* 2 (frações 7 a 12), *pool* 3 (frações 13 a 18) e *pool* 4 (frações 19 a 25). Os *pools* 1 a 4 foram submetidos a gel de poliacrilaminada 12,5% para determinação da massa molecular de proteínas constituintes dos mesmos. A cada canaleta foram aplicados 20 µl de solução de cada *pool*. A figura 10 mostra os resultados obtidos na análise do perfil protéico dos *pools* selecionados na figura 9.

A análise do gel mostrou na canaleta 3, uma banda forte na altura de 48 kDa correspondente a amostra do *pool* 2 (**Fig. 10**). Não foram visualizadas bandas nas amostras correspondentes aos *pools* 1, 3 e 4. A ausência de bandas nesses *pools* pode estar associada à fatores característicos da amostra ou do procedimento realizado para evidenciar o peso molecular das proteínas nas referidas amostras. Assim, propriedades como o tamanho das moléculas constituintes dos *pools* 1, 3 e 4 podem ter favorecido a saída das mesmas da malha do gel de poliacrilamida e nesse caso uma alternativa é aumentar a concentração do gel para impedir a perda de proteínas de baixo peso molecular ou peptídios. Devido à limitação da quantidade de material nos *pools* 1, 3 e 4 a aplicação das amostras em gel de poliacrilamida foi baseada em volume de amostra e não em concentrações homogêneas de proteínas em cada amostra. A análise do cromatograma na figura 9 mostra altas concentrações da amostra no *pool* 2 e baixas nos *pools* 1, 3 e 4. Esse fato pode justificar a presença ou ausência de bandas, respectivamente, na figura 10.



**Figura 10- Determinação do peso molecular de proteínas constituintes dos *pools*.** Perfil protéico dos *pools* 1, 2, 3 e 4 do ExtTs ativo em Gel de poliacrilamida 12,5%. Canaleta 1 PPM: Padrão de Peso Molecular; Canaleta 2 *pool* 1; Canaleta 3: *pool* 2; Canaleta 4: *pool* 3; Canaleta 5: *pool* 4 . Para todos os *pools* foram utilizados 20  $\mu$ L da solução. O gel foi corado com Azul de Comassie 0,1%.

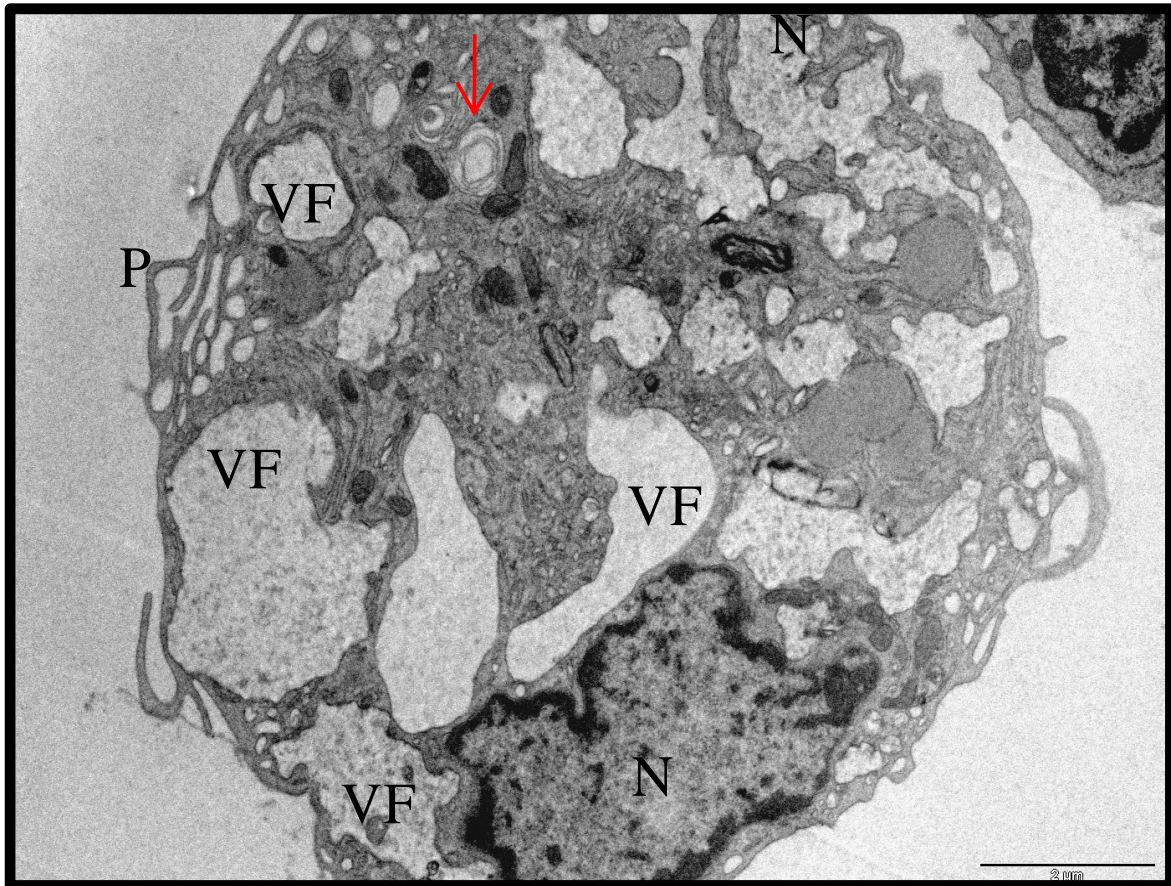
#### 5.4 - Ultraestrutura da interação dos esporos de *T. stromaticum* com macrófagos

Com intuito de verificar as alterações ultraestruturais dos fagócitos causadas devido a internalização de esporos *T. stromaticum*, macrófagos peritoneais de camundongos foram incubados com esporos na proporção 10:1. Após 24 horas de interação, os macrófagos fixados em glutaraldeído foram submetidos a processamento e a ultraestrutura foi analisada no MET. A figura 11 mostra que os macrófagos que não foram incubados com esporos (controle) apresentaram vários aspectos característicos da morfologia normal incluindo núcleo grande, periférico, em forma de rim com organelas distribuídas no citoplasma. Enquanto os macrófagos incubados com os esporos chamaram a atenção por apresentarem muitos pseudópodos, citoplasma muito vacuolizado, rico em organelas, com várias mitocôndrias distribuídas no citoplasma e complexo de golgi com inúmeras vesículas (**Fig. 12**).

É sabido que os macrófagos quando ativados sofrem diversas modificações morfológicas, metabólicas e funcionais, incluindo: aumento de tamanho, alteração da membrana plasmática, maior formação de pseudópodos, aumento no número de vesículas, maior metabolismo de glicose e consequente aumento na capacidade de matar microorganismos intracelulares. Durante a fagocitose de microorganismos a transição da etapa de aderência para a etapa de internalização do material pelos macrófagos pode ser complexa e a formação de pseudópodos pode ser de grande utilidade na regulação do processo de fagocitose. Modelos experimentais caracterizando esse processo têm sido estabelecidos para várias partículas, incluindo: legionellas, espiroquetas, tripanosomatídeos, zymosan e células fúngicas (RITTIG *et al*, 1999). A ausência de informação sobre o processo de fagocitose de esporos do gênero *Trichoderma* e a influência desses no direcionamento da resposta imune constitui importante alvo para estudo, dada a característica dos fungos desse gênero como biofungicida. O entendimento das interações patógeno-hospedeiro na interface do sistema imune inato pode ser de grande utilidade na busca de imunomodulares de relevância terapêutica.



**Figura 11 - Ultraestrutura de macrófagos de camundongos Swiss.** Macrófagos peritoneais ( $5 \times 10^6$ ) cultivados por 24 horas na ausência de esporos de *T. stromaticum* em placa de cultura. As células foram fixadas com glutaraldeído e processadas para análise no MET. N- núcleo. Escala da barra 1  $\mu$ M.



**Figura 12 - Ultraestrutura de macrófagos expostos a esporos de *T. stromaticum*.** Macrófagos peritoneais ( $5 \times 10^6$ ) cultivados com esporos de *T. stromaticum* na proporção 10:1. As células foram fixadas com glutaraldeído e processados para análise no MET após 24 horas da interação fagócitos/esporo. Fotomicrografia evidenciando N- núcleo, P- Pseudópodos e VF- Vacúolo fagocítico. Escala da barra 2  $\mu$ M.

É sabido que a quantidade de mitocôndrias no citoplasma está relacionada à necessidade de energia da célula; assim, quanto maior a necessidade de energia, maior será o número de mitocôndrias. Macrófagos em função fagocítica requerem aumento da produção de energia e esse fato evidenciado pelos resultados mostrados nas figuras 13 e 14, são reforçados pelos achados de aumento no número de mitocôndrias para produção de ATP a ser utilizado na fagocitose de outros microrganismos intracelulares. (SHIN *et al*, 2010).

Duas alterações interessantes observadas nas análises realizadas no MET foram a presença de estruturas similares a corpúsculos autofágicos ou autofagossomas e vacúolo fagocítico com material internalizado apresentando dupla membrana (**Fig. 15**). As alterações podem estar associadas à ocorrência de autofagia. Esse processo constitui um mecanismo celular de degradação de proteínas e organelas citoplasmáticas e ocorre em diversos processos biológicos importantes como resposta celular à inanição, sobrevivência ou morte, câncer, *clearance* de corpos de inclusão em doenças degenerativas.

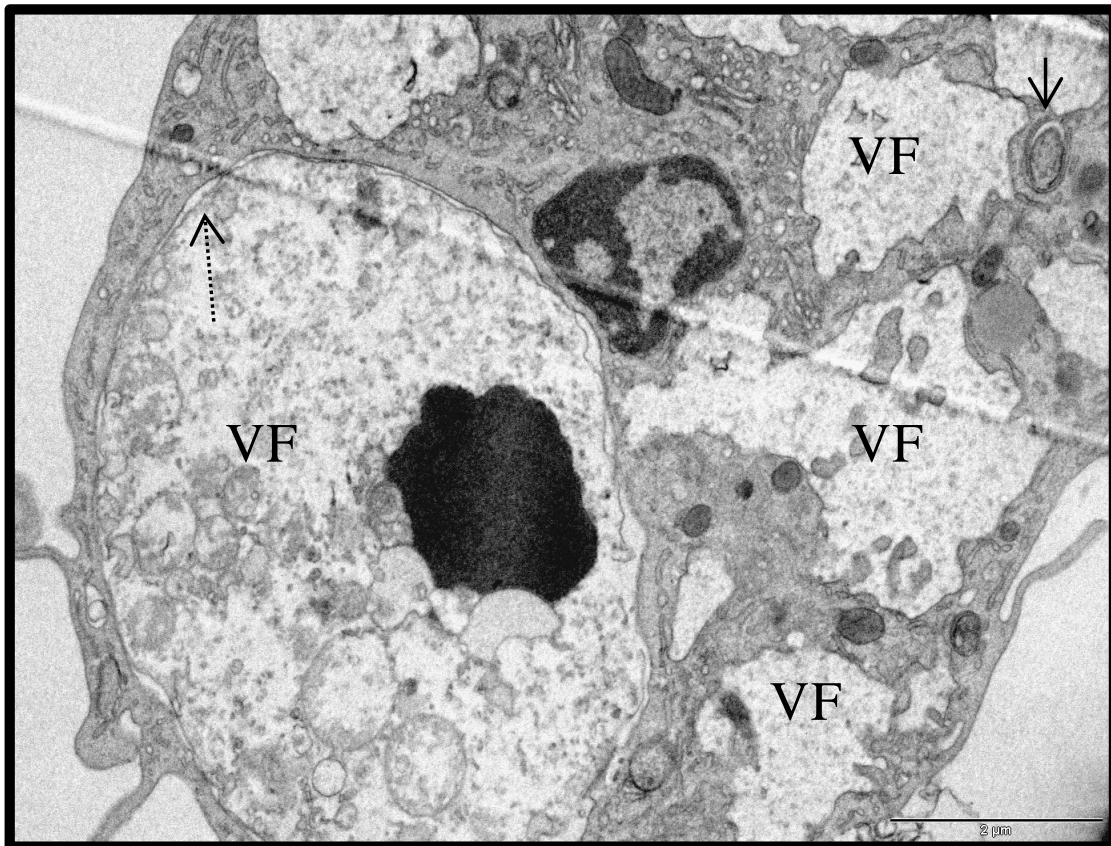
Recentemente evidências mostraram que a autofagia constitui um mecanismo da resposta imune inata envolvido na eliminação de microrganismos intracelulares (LEVINE; KLIONSKY, 2004; LEVINE 2005). Somente pela análise ultraestrutural dos fagócitos expostos aos esporos não é possível sugerir o papel que *T. stromaticum* exerce no processo de autofagia e se a interferência dos esporos nesse processo resultaria em prejuízos para as funções de degradação do material internalizado pelo fagócito.



**Figura 13 - Ultraestrutura de macrófagos expostos a esporos de *T. stromaticum*.** Macrófagos peritoneais ( $5 \times 10^6$ ) cultivados com esporos de *T. stromaticum* na proporção 10:1. As células foram fixadas com glutaraldeído e processados para análise no MET após 24 horas da interação fagócitos/esporo. Fotomicrografia evidenciando M-mitocôndria. Escala da barra 0,5  $\mu$ M.



**Figura 14 - Ultraestrutura de macrófagos expostos a esporos de *T. stromaticum*.** Macrófagos peritoneais ( $5 \times 10^6$ ) cultivados com esporos de *T. stromaticum* na proporção 10:1. As células foram fixadas com glutaraldeído e processados para análise no MET após 24 horas da interação fagócitos/esporo. Fotomicrografia evidenciando CG-Complexo de Golgi, M- mitocôndria. Escala da barra 0,5 μM.



**Figura 15 - Ultraestrutura de macrófagos expostos a esporos de *T. stromaticum*.** Macrófagos peritoneais ( $5 \times 10^6$ ) cultivados com esporos de *T. stromaticum* na proporção 10:1. As células foram fixadas com glutaraldeído e processados para análise no MET após 24 horas da interação fagócitos/esporo. Fotomicrografia evidenciando VF- Vacúolo fagocítico, seta pontilhada – VF com dupla membrana, seta cheia – possível corpúsculo autofágico. Escala da barra 2  $\mu$ M

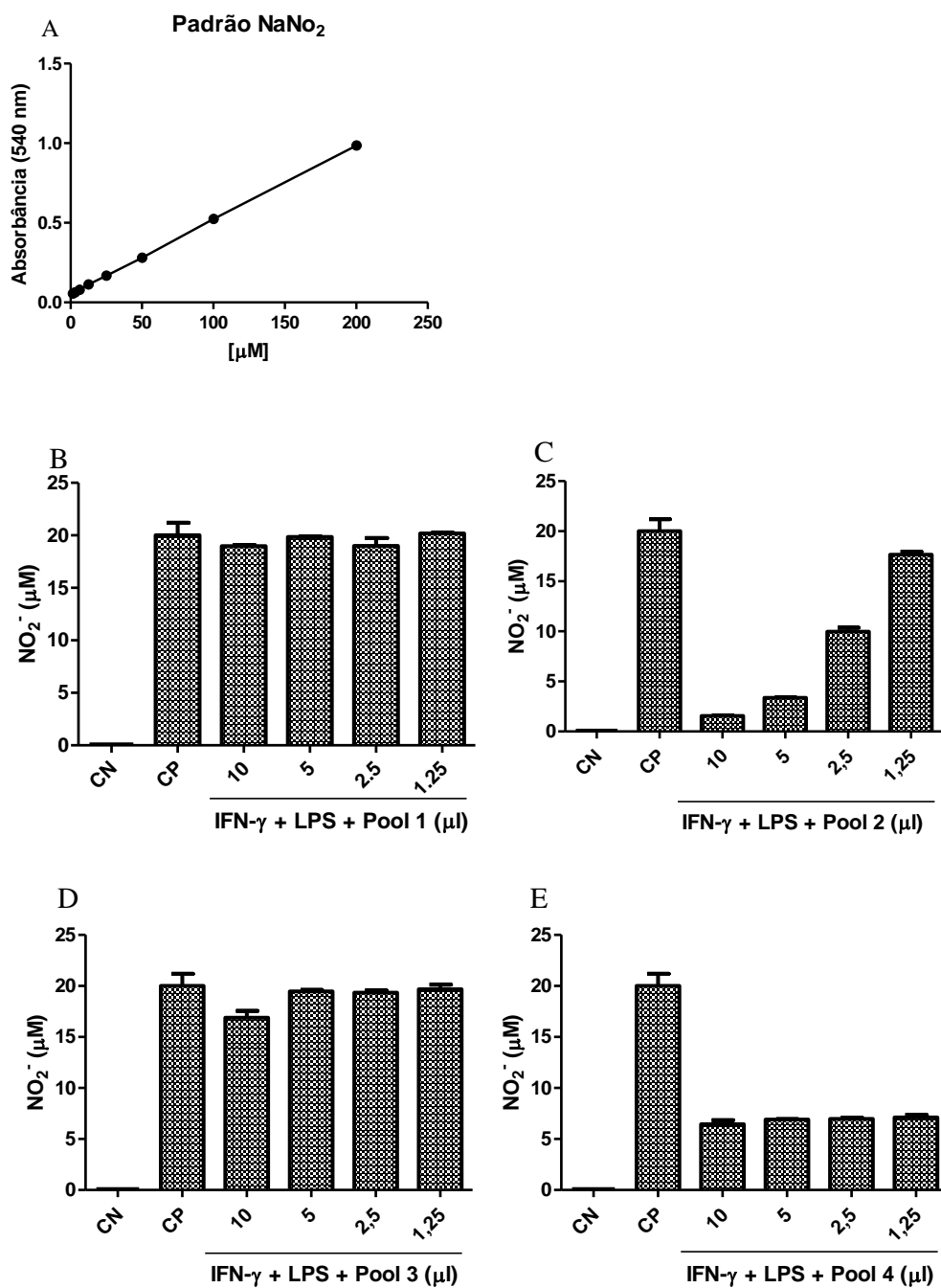
### 5.5 - Efeito inibitório dos *pools* de ExtTs na produção de óxido nítrico por macrófagos.

Com o objetivo de selecionar frações de ExtTs com possível potencial imunossupressor, os *pools* 1, 2, 3 e 4 de ExtTs foram utilizados em ensaios biológicos de quantificação de NO produzido por macrófago e os resultados obtidos estão apresentados na figura 16. Para este estudo, as células incubadas na ausência e na presença de interferon-gama associado a LPS, ativadores da produção de NO, foram expostas a diluições seriadas dos *pools* partindo do volume de 10  $\mu$ L - 1,25  $\mu$ L (diluição 1:2).

Os resultados mostrados nas figuras 16B e 16D revelaram que os *pools* 1 e 3, respectivamente, em seus diferentes volumes não inibiram a produção de NO por macrófagos ativados com IFN- $\gamma$  associado ao LPS. De acordo com a fig. 16C, o *pool* 2 inibe a produção de NO dos macrófagos de forma dose dependente, isto é, quanto maior o volume maior a % de inibição do NO. Nos volumes de 10  $\mu$ L e 5  $\mu$ L a porcentagem de inibição foi 92% e 83%, respectivamente. Enquanto, o tratamento com 2,5  $\mu$ L do *pool* 2 inibe 48% a produção de NO por macrófagos, 1,25  $\mu$ L não inibe significativamente a produção desse gás.

Analisando os resultados obtidos para o *pool* 4 (**Fig. 16E**), verificou-se uma inibição significativa da produção de NO quando comparada ao controle positivo, mas é interessante notar que independente do volume utilizado, a inibição foi equivalente à aproximadamente 66% em todas as diluições do *pool* 4.

A comparação dos dados de inibição da produção de NO entre os *pools* 2 e 4, figuras 16C e 16E, respectivamente, permite-nos inferir que as biomoléculas do *pool* 4 tem maior potencial supressor do que as do *pool* 2, pois o volume de 1,25  $\mu$ L de ambos os *pools* inibe diferencialmente a produção de NO, *pool* 2 (11%) e *pool* 4 (66%). Os resultados sugerem alguns questionamentos em relação ao efeito supressor observado, como: os *pools* 2 e 4 são citotóxicos para os macrófagos? O efeito inibitório apresentado pelo *pool* 2 está relacionado às diferenças na concentração das biomoléculas nas diluições utilizadas quando comparadas aos *pools* 1 e 3? As biomoléculas supressoras presentes nos *pool* 2 e 4 são distintas?



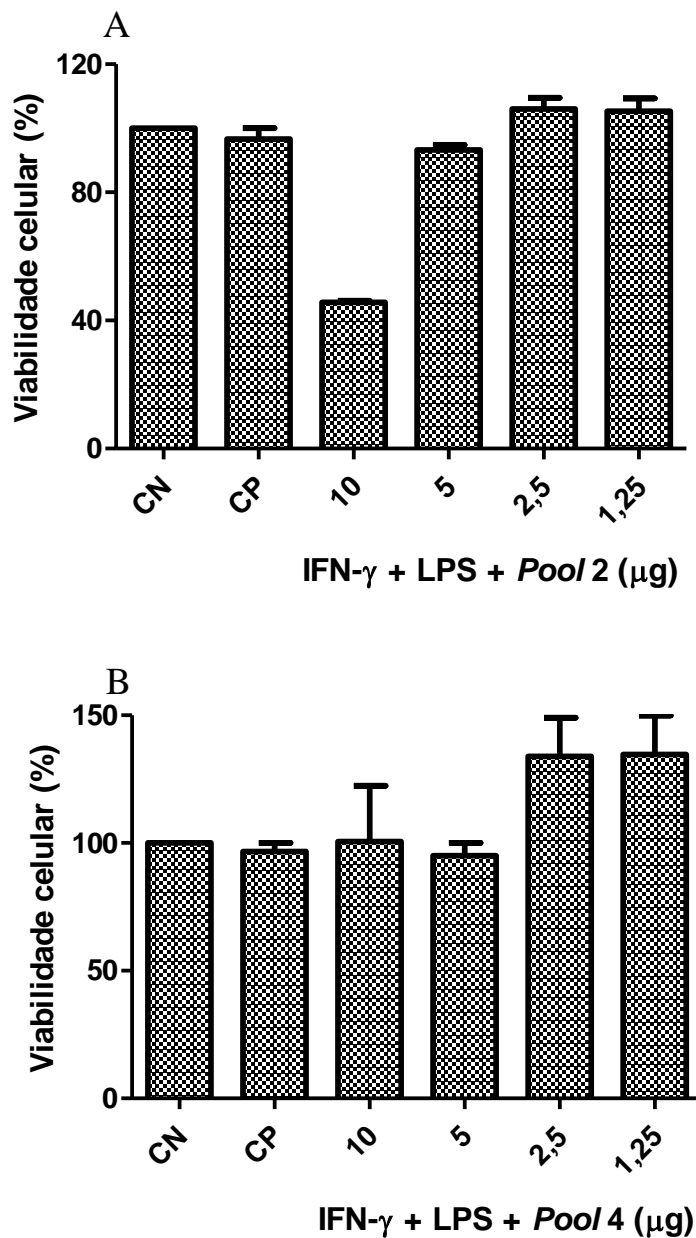
**Figura 16- Efeito dos pools de ExtTs na produção de NO por macrófagos.** Macrófagos peritoneais ( $1 \times 10^5$ ) cultivados na presença ou ausência de IFN- $\gamma$  (40 U/mL) associado a LPS ( $10 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) foram tratados com *pools* de ExtTs nos volumes de 10, 5, 2,5 e 1,25  $\mu\text{l}$ /densidade de células. Após 24 hs o NO<sub>2</sub><sup>-</sup> foi quantificado no sobrenadante da cultura conforme descrito em Material e Métodos. Curva de absorbância do padrão NaNO<sub>2</sub> (A). Dosagem de NO *pool* 1 (B), *pool* 2 (C), *pool* 3 (D) e *pool* 4 (E).

Para responder a algumas dessas questões, foram realizados ensaios de viabilidade celular e quantificação de proteínas dos *pools* 1, 2, 3 e 4.

#### **5.6 - Viabilidade de macrófagos expostos aos pools 2 e 4 do Ext de *T. stromaticum*.**

Para verificar a citotoxicidade dos *pools* 2 e 4 para macrófagos de camundongos foi realizado o ensaio do MTT e os resultados obtidos são mostrados na fig. 17.

Ao analisar a viabilidade celular, após contato dos macrófagos com esses *pools* em seus diferentes volumes, foi verificada a ocorrência de morte celular apenas em macrófagos incubados com o *pool* 2 em seu maior volume e, portanto, maior concentração de biomoléculas (**Fig. 17A**). O *pool* 4, a exemplo do *pool* 2, apresentou inibição da produção de óxido nítrico, mas não apresentou efeito citotóxico em nenhum dos volumes utilizados. Em volumes menores, 2,5 e 1,25  $\mu$ l/densidade de células, o *pool* 4 parece induzir a proliferação celular (**Fig. 17B**), uma vez que apresenta aproximadamente 33% a mais de células quando comparados aos controles negativos e positivos.



**Figura 17- Efeito dos *pools* 2 e 4 de ExtTs na citotoxicidade de macrófagos de camundongos.** Macrófagos peritoneais ( $1 \times 10^5$ ) cultivados na presença ou ausência de IFN- $\gamma$  (40 U/ml) associado a LPS ( $10 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) foram tratados com os *pools* 2 e 4 de ExtTs nos volumes de 10, 5, 2,5 e 1,25  $\mu$ l/densidade de células. Após 24 hs, as células foram incubadas com MTT por 4 hs, posteriormente o sobrenadante da cultura foi removido e adicionado Dimetilformamida/SDS e a leitura realizada a 570 nm conforme descrito em Material e Métodos. Macrófagos incubados com (A) *pool* 2 e (B) *pool* 4.

### 5.7 - Quantificação de proteínas do *pool* de frações do ExtTs

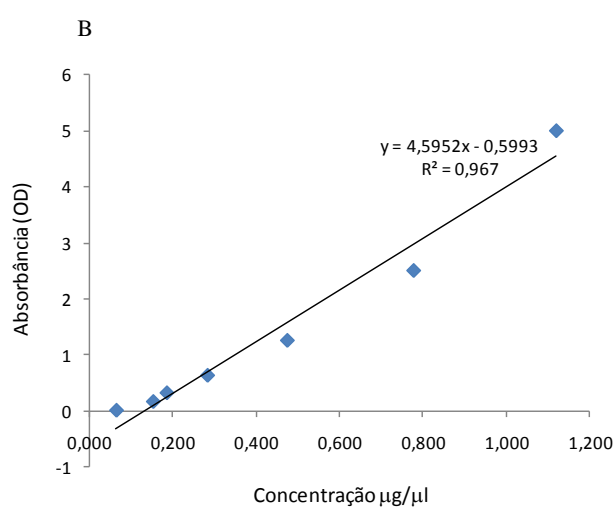
Uma vez que a utilização de volumes similares dos pools de ExtTs apresentaram efeitos diferenciais na modulação dos macrófagos para a produção de NO e poderiam conter concentrações distintas de proteínas, o questionamento de grande interesse foi se os *pools* 1, 3 e 4 em concentrações similares às do *pool* 2 também são citotóxicas para os macrófagos. Assim, foi avaliada a concentração de proteínas dos *pools* 1, 2, 3 e 4 do ExtTs. A quantificação das mesmas foi feita pelo método de Bradford e a absorbância lida a 280 nm foi comparada com as concentrações conhecidas de BCA (**Fig. 18A - C**).

A figura 18C mostra que a concentração de proteínas nos *pools* 1, 2, 3 e 4 foram 0,364, 2,994, 0,584, 0,245  $\mu\text{g}\mu\text{l}^{-1}$ , respectivamente. Com esses resultados verificou-se uma concentração 8 vezes maior do *pool* 2 em relação ao *pool* 1, 5 vezes maior que o *pool* 3 e 12 vezes maior que o *pool* 4. É interessante observar que o *pool* 4, apesar de ser o menos concentrado em termos de proteína, revelou um potencial imunossupressor significativo em relação ao controle positivo (NO produzido por macrófagos ativados na ausência dos *pools*). Os dados obtidos permitem inferir que o efeito inibitório apresentado pelos *pools* 2 e 4, (**Figs. 16C e 16E**), respectivamente, não está relacionado ao fator quantidade de proteína, pois se por um lado o *pool* 4 inibe 66 %, da produção de NO em todos os volumes utilizados, o *pool* 2 nos menores volumes, 2,5 e 1,25, inibiram 50% e 12%, respectivamente.

A quantificação de proteínas dos *pools* 1, 2, 3 e 4 foi importante para verificar a viabilidade dos macrófagos quando expostos a quantidades similares de proteína para todos os *pools*. Dados preliminares mostraram que 15 $\mu\text{g}$  de proteína dos pools 1, 3 e 4 matam aproximadamente 50% dos macrófagos (densidade inicial de células  $1 \times 10^5$ ). Nessa mesma concentração de proteína o *pool* 2 inibe a produção de NO, mas não tem efeito citotóxico para os macrófagos como mostrado na **Fig. 17A**.

A – Absorbância referente às concentrações conhecidas de BCA.

Absorbância		Concentração ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
1.0	1.0	5.0
0.777	0.7781	2.5
0.4384	0.5098	1.25
0.2972	0.2679	0.625
0.1862	0.1835	0.3125
0.1663	0.1379	0.15625



C – Concentrações de proteína presentes nas frações do ExtTs.

Amostras			
Absorbância		Concentração ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	
<i>Pool 1</i>	0.213	0.206	0.364
<i>Pool 2</i>	0.7706	0.7933	2.994
<i>Pool 3</i>	0.2606	0.2544	0.584
<i>Pool 4</i>	0.1833	0.1841	0.245

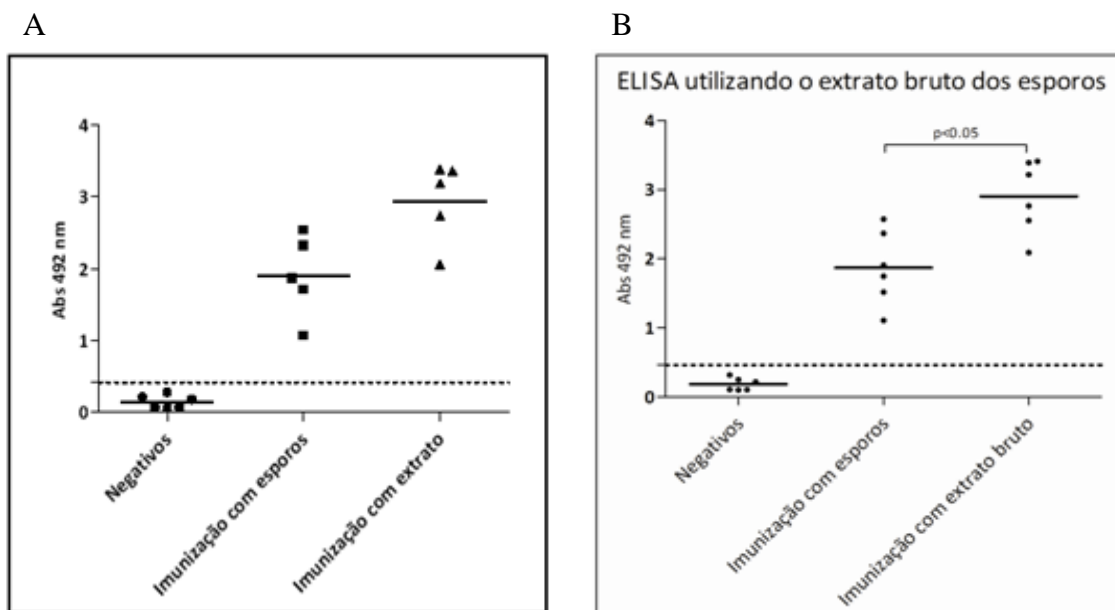
**Figura 18- Curva padrão da dosagem de proteínas dos *pools* do ExtTs pelo método de Bradford modificado.** Absorbância em duplicata referente às concentrações conhecidas de BCA (A). Curva de absorbância X concentração dos padrões de BCA (B). Concentração de proteína presente nos *pools* 1, 2, 3 e 4 do ExtTs (C)

## 5. 8 Imunogenicidade de esporos e extTs em camundongos.

Para verificar a imunogenicidade de *T. stromaticum*, grupos de camundongos Swiss foram imunizados com esporos e ExtTs por via peritoneal. Não foi observada a morte e nem efeitos tóxicos nos animais imunizados.

De acordo com a figura 19, todos os camundongos responderam à imunização produzindo IgG no soro. A densidade ótica (OD) de IgG referente aos títulos de imunoglobulinas de camundongos imunizados com esporos e ExtTs foram significativamente mais alta quando comparada aos valores de OD do grupo imunizado somente com adjuvante (negativo). O ExtTs induz níveis mais altos de IgG do que animais imunizados com os esporos (**Fig. 19 A**).

Uma vez que o ExtTs etanólico pode conter biomoléculas provenientes dos esporos e, também, do micélio de *T. stromaticum*, foi de interesse pesquisar o reconhecimento do ExtTs por soro de animais imunizados tanto com os esporos quanto com o ExtTs. Os resultados do ensaio de ELISA mostraram que o soro dos animais imunizados com esporos ou ExtTs reconhecem e apresentam ligação quando o substrato é o ExtTs (**Fig.19 B**). Porém, a ligação do soro de animais imunizados com ExtTs difere significativamente da ligação do soro de animais imunizados com os esporos. Esse resultado já era esperado, uma vez que o ExtTs utilizado para substrato no teste de ELISA foi obtido pelo mesmo procedimento experimental para obtenção de ExtTs usado na imunização dos camundongos. Apesar dos esporos e ExtTs utilizados nas imunizações terem sido preparados por protocolos distintos, lavagem da cultura de *T. stromaticum* com Solução Fosfato Tamponada (PBS) e com etanol, respectivamente, ambos os soros apresentam anticorpos contra moléculas do esporo. Um questionamento relevante é se as possíveis moléculas imunossupressoras de *T. stromaticum* localizam-se tanto nos esporos quanto no micélio (ligadas ou secretadas). Em caso positivo é necessário investigar se essas moléculas possuem a mesma composição química ou se são moléculas distintas.

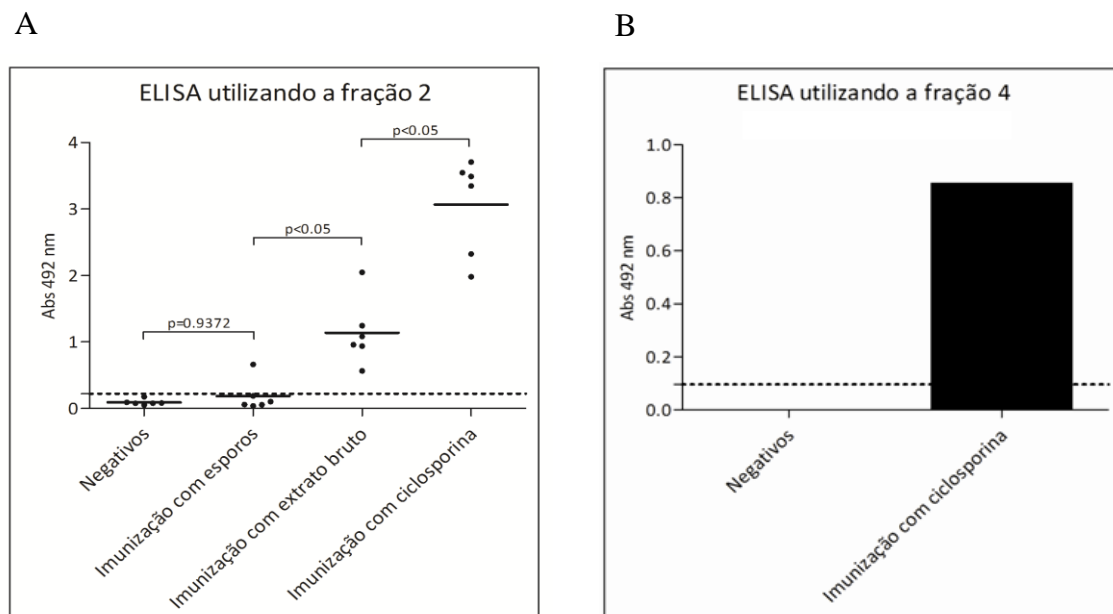


**Figura 19- Esporos de *T. stromaticum* e ExtTs induzem produção de imunoglobulina G (IgG) - Respostas de IgG no soro de animais imunizados com adjuvante de Freud, adjuvante + esporos de *T.stromaticum* e adjuvante + ExtTs. Camundongos Swiss foram imunizados (3 vezes) por via peritoneal em intervalos semanais de 15 dias. O sangue foi coletado após a 3ª imunização. Os níveis de anticorpos IgG específicos para esporos e ExtTs foram quantificados por ELISA (A). Ensaio de ligação do soro dos animais quando o substrato usado na técnica de ELISA foi o ExtTs (B). Os valores obtidos são representativos do soro de cada animal de acordo com a OD lida a 492 nm.**

Para investigar se *pools* contendo moléculas potencialmente imunossupressoras estão associados aos esporos de *T. stromaticum*, utilizou-se ensaio de ELISA. O substrato *pool* 2 foi incubado com soro de animais imunizados com adjuvante de Freud, adjuvante + esporos e adjuvante + ExtTs. Os resultados mostrados na figura 20A revelam que não há ligação dos soros dos animais negativos e imunizados com adjuvante + esporos em moléculas do *pool* 2. Entretanto foi observada uma diferença significativa de ligação do soro de animais imunizados com adjuvante + extrato em comparação aos dois primeiros. Os dados sugerem ausência de molécula imunossupressora na superfície dos esporos. Porém, essas podem ser internas aos esporos ou estarem associadas ao micélio ou secreções desses.

Diversos fungos podem conter moléculas potencialmente imunossupressoras e, geralmente, o mecanismo de ação desses está associado à inibição da transcrição de genes de linfócitos T ativados (SIEBER AND BAUMGRASS, 2009). A Ciclosporina A (CsA), droga imunossupressora extensamente utilizado na prevenção de rejeição de transplantes, é extraída de distintos fungos incluindo *Trichoderma polysporum* (CHONG, 2009) e tem como mecanismo de ação a inibição do NFTA (ROVIRA *et al*, 2000),

Devido às semelhanças encontradas entre as espécies *T. polysporum* e *T. stromaticum* essa foi, por algum tempo, identificada e relatada na literatura erroneamente como *T. polysporum* (SAMUELS, 2000). A similaridade entre as duas espécies e o fato de CsA ter sido extraída de *T. polysporum* (LAWEN AND ZOCHER, 1990) nos permite hipotizar que a molécula imunossupressora de *T. stromaticum* é uma CsA. Para testar essa hipótese, ensaios de ELISA foram feitos utilizando como substrato da reação os *pools* 2 e 4, o soro (**Fig. 20 A**) e o *pool* de soros (**Fig. 20 B**) dos animais imunizados com CsA respectivamente. O resultado mostrou o reconhecimento de moléculas dos *pools* 2 e 4 por anticorpos do soro de animais imunizados com CsA. Isto sugere, fortemente, a possibilidade da molécula imunossupressora, presente em ambas os *pools* do ExtTs de *T. stromaticum*, ser uma CsA. Porém, essa afirmação depende de outras investigações referentes à caracterização das moléculas imunossupressoras presentes em *T. stromaticum*. Outra questão de relevância é se a ciclosporina presente em *T. Polysporum* e *T. stromaticum* é característica apenas dessa espécie ou associado ao gênero *Trichoderma*.



**Figura 20- Anti- ciclosporina A reconhece os pools 2 e 4 do extrato de *T. stromaticum*.** Os soros de camundongos Swiss imunizados por via peritoneal com adjuvante, com esporos de *T. stromaticum* ou com ExtTs foram incubados com o (A) pool 2 e com o (B) pool 4. A interação entre anti-ciclosporina e as biomoléculas dos pools 2 e 4 foi detectado por ELISA. Os valores obtidos são representativos do soro de cada animal (A) e pool dos soros de 6 animais (B), lidos na absorvância de 492 nm.

## 6 - CONCLUSÕES

A busca pelas biomoléculas dos esporos de *T. stromaticum* com potencial supressor das atividades de fagócitos murinos ainda não foi conclusiva. Porém, o estudo da interação dos esporos e dos *pools* de ExtTs desse fungo ambiental com macrófagos de camundongo gerou as seguintes conclusões:

- Há alteração da parede dos esporos quando esses foram submetidos a estresse causado pelo calor.

- Tudo indica que não é o espessamento da parede o responsável pela perda do potencial imunossupressor.

- O protocolo utilizado para obtenção do extrato bruto do fungo *T. stromaticum* (ExtTs) foi eficiente quando se usou culturas com grandes quantidades de esporos.

- O procedimento de cromatografia por filtração molecular acoplada ao FPLC foi adequado, uma vez que permitiu fazer uma seleção inicial dos *pools* de frações de ExtTs que pudessem conter moléculas imunossupressoras.

- Os *pools* 2 e 4 de ExtTs possuem moléculas imunossupressoras. Entretanto, as moléculas do pool 4 parecem mais eficientes na indução desse mecanismo.

- Em pequenas concentrações, esporos de *T. stromaticum* alteram significativamente a ultraestrutura de macrófagos murinos (proporção esporo/macrófago equivalente a 1:10).

- Tais alterações sugerem a possibilidade da ocorrência do processo de autofagia, porém, devido ao potencial imunossupressor dos esporos desse fungo a interferência do mesmo no processo precisa ser esclarecida.

- Os esporos componentes do biopesticida TRICOVAB usado nas lavouras de cacau apesar de não serem infectivos, interferem na resposta imunológica.

- É necessário critério rígido para utilização desse biopesticida, de modo que seu uso seja de forma segura para o homem e o meio ambiente.

- Um questionamento importante que merece investigação é se a modulação dos macrófagos decorrentes dos sinais estabelecidos na interação *T. stromaticum*/macrófagos confere a essas células o fenótipo regulatório. Dessa forma a caracterização das possíveis biomoléculas imunossupressoras do fungo *T. stromaticum* torna-se de grande interesse, tanto para estabelecer critérios em seu uso de forma a proteger o meio ambiente e os trabalhadores que utilizam o biofungicida, como também para seu estudo em uso terapêutico nas doenças causadas por resposta imune exacerbada.

## 7 – PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante das conclusões acima as perspectivas imediatas para continuidade desse estudo são:

- Caracterizar a molécula imunossupressora utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/MS/MS);
- Investigar se esse caráter imunossupressor é uma característica do gênero *Trichoderma*.
- Selecionar nos pools 2 e 4, após testes de produção de NO por macrófagos, a fração imunossupressora do ExtTs;

## REFERÊNCIAS

- AKIRA, S. Toll receptor families: structure and function (Editorial). **Seminars in Immunology ELSEVIER**. v.16, p. 1-2. 2004.
- ALVES-FILHO, E. R.; MAIOLI, T. U.; FARIA, A. M. C.; NORONHA, F. S. M.; SILVA, N. M.; COSTA, M. G. C.; SANTOS, J. L. The biocontrol fungus *Trichoderma stromaticum* downregulates respiratory burst and nitric oxide in phagocytes and IFN-gamma and IL-10. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**. v.74, p. 1–16. 2011.
- BANERJEE, B.; GREENBERGER, P. A.; FINK, J. N.; KURUP, V. P. Molecular characterization of aspergillus fumigatus allergens. **Indian J Chest Dis Allied Sci**.v. 42, p. 239-48. 2000.
- BASTOS, C.N. Mycoparasitic nature of the antagonism between *Trichoderma viride* and *Crinipellis pernicioso*. **Brazilian phytopathology**. v. 21, p. 50-54. 1996.
- BASTOS, C.N.; DIAS, J.C. Reduction in the Production of basidiocarps of *Crinipellis pernicioso* by *Trichoderma viride*. **Summa Phytopathologica**. v.18, p. 235-238. 1992.
- BENHAMOU, N.; CHET, I. Hyphal interactions between *trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*- ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. **Phytopathology**. v.83, p. 1062 –1071. 1993.
- BEZERRA , J. L.; COSTA , J. C. B.; BASTOS ,C. N.; FALEIRO, F. G. *Hypocrea stromatica* sp. nov. teleomorfo de *Trichoderma stromaticum*. **Fitopatol. bras.** v. 28, p. 408-412. 2003.
- BIBIKOVA, M. V.; DARKHANOVA, T. A.; SPIRIDONOVA, I. A.; DANILENKO, A. N.; KATLINSKIĬ, A. V. [Complex of cyclosporins produced by *Tolypocladium inflatum* isolated from soil sample from Buriatia]. **Antibiotiki i Khimioterapiia**. v. 54, p. 6-9.2009.

BRADFORD, M . M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254. 1976.

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

CHIANG, C. S.; MCBRIDE, W. H. Radiation enhances tumor necrosis factor alpha production by murine brain cells. **Brain Res**. v. 566, p. 265–269. 1991.

CHONG, F. W.; CHAKRAVARTHI, S.; NAGARAJA, H. S.; THANIKACHALAM, P. M.; LEE, N. Expression of transforming growth factor-beta and determination of apoptotic index in histopathological sections for assessment of the effects of Apigenin (4', 5', 7'- Trihydroxyflavone) on Cyclosporine A induced renal damage. **Malays J Pathol**. v.31, p. 35-43. 2009.

DALE, D. C.; BOXER, L.; LILES, W. C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood** v. 112, p. 935–945. 2008.

DAWES, L. J.; ELLIOTT, R. M.; REDDAN, J. R.; WORMSTONE, Y. M.; WORMSTONE, I. M. Oligonucleotide microarray analysis of human lens epithelial cells: *TGFβ* regulated gene expression. **Molecular Vision**. V.13, p. 1181-97. 2007.

DE MELO, I. S.; FAULL, J. L. Scanning Electron Microscopy of conidia of *T. stromaticum* a biocontrol agent of witches broom disease of cocoa. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.5, p. 330-337. 2004.

DUSTING, G. J.; AKITA, K.; HICKEY, H.; SMITH, M.; GUREVICH, V. Cyclosporin A and tacrolimus (FK506) suppress expression of inducible nitric oxide synthase in vitro by different mechanisms. **British Journal of Pharmacology**. v. 128, p. 337 ± 344. 1999.

ESPOSITO, E.; SILVA, M. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. **Critic Rev Microbiol.** v. 24, p. 89-98, 1998.

FEUERSTEIN, N.; HUANG, D.; PRYSTOWSKY, M. B. Rapamycin selectively blocks interleukin-2-induced proliferating cell nuclear antigen gene expression in T lymphocyte. Evidence for inhibition of CREB/ATF binding activities. **Journal Biology Chemistry.** v. 270, p. 9454-9458. 1995.

FUKUZAWA, M.; YAMAGUCHI, R.; HIDE, I.; CHEN, Z.; HIRAI, Y.; SUGIMOTO, A.; YASUHARA, T.; NAKATA, Y. Possible Involvement of Long Chain Fatty Acids in the Spores of *Ganoderma lucidum* (Reishi Houshi) to Its Anti-tumor Activity. **Biological & Pharmaceutical Bulletin.** v.31, p. 1933-1937. 2008.

GEISSMANN, F.; MANZ, M. G.; JUNG, S.; SIEWEKE, M.H.; MERAD, M.; LEY, K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science.** v. 327, p. 656-61.2010.

GORDON, S. The macrophage: past, present and future. **Eur. J. Immunol.** v. 37, p. 9-17. 2007

GRAY, A. J.; BEECHER, D. E.; OLSON, M. V. Computerbased image analysis of one-dimensional electrophoretic gels used for the separation of DNA restriction fragments. **Nucleic Acids Research.** v. 12, p. 473- 491.1984

GREGORY, J.; DUSTING; AKITA, K.; HICKEY, H.; SMITH, M.; GUREVICH, V. Cyclosporin A and tacrolimus (FK506) suppress expression of inducible nitric oxide synthase in vitro by different mechanisms. **British Journal of Pharmacology.** v. 128, p. 337 ± 344. 1999.

HALLAHAN, D. E.; SPRIGGS, D. R.; BECKETT, M. A.; KUFEL, D. W.; WEICHSELBAUM, R. R. Increased tumor necrosis factor  $\alpha$  mRNA after cellular exposure to ionizing radiation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** V. 86, p. 10104–10107. 1989

HASHIMOTO, T.; OHNO, N.; ADACHI, Y.; YADOMAE, T. Nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages by fungal beta-glucans. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 20, p. 1006-9.1997.

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

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

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

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

HOLH, T. M.; EPPS, H. L. V.; RIVERA, A.; MORGAN, L. A.; CHEN, P. L.; FELDMESSER, M.; PAMER, E. R. *Aspergillus fumigatus* triggers inflammatory responses by stage-specific  $\beta$ -glucan display. **Pathogens.Plosjournals**. v.1, p. 30. 2005.

KREIDER, T.; ANTHONY, R. M.; URBAN, J. F. J. R.; GAUSE, W. C. Alternatively activated macrophages in helminth infections. **Curr. Opin. Immunol**. v. 19, p. 448-453.2007.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. **International reviews of immunology**. v. 30(1), p. 16-34.2011.

LAWEN, A., ZOCHER, R. Cyclosporin synthetase: The most complex peptide synthesizing multienzyme polypeptide so far described. **J. Biol. Chem.** v. 265, p. 11355-11360. 1990

LEAL, G. A.; GOMES, L. H.; ALBUQUERQUE, P. S.; TAVARES, F. C.; FIGUEIRA, A. Searching for *Moniliophthora perniciosa* pathogenicity genes. **Fungal Biology**. 2010 v. 114, p. 842-54.2010.

LEE, C. L.; JIANG, P.; SIT, W. H.; YANG, X.; WAN, J. M. Regulatory properties of polysaccharopeptide derived from *Coriolus versicolor* and its combined effect with ciclosporin on the homeostasis of human lymphocytes. **The Journal of pharmacy and pharmacology**. v. 62, p. 1028-36. 2010.

LEMLEY, D. E.; KATZ, P. Therapeutic strategies in autoimmune disease: cyclosporin A as a model agent. **In Vivo**. v. 2, p. 115-8.1988.

LEVINE B. Eating oneself and uninvited guest: autophagy-related pathways in cellular defense. **Cell**. v. 120, p. 159–162. 2005.

LEVINE, B.; KLIONSKY, D. J. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. **Dev Cell**. v. 6, p. 463–477. 2004.

LOKE, P.; ET AL. Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4+ T cells to be sustained during chronic infection. **J. Immunol**. v. 179, p. 3926-3936. 2007.

LORIMORE, S. A.; COATES, P. J.; SCOBIE, G. E.; MILNE, G.; WRIGHT, E.G. Inflammatory-type responses after exposure to ionizing radiation in vivo: a mechanism for radiation-induced bystander effects? **Oncogene**. v. 20, p. 7085-7095.2001

MADSEN, A. M. Occupational exposure to microorganisms used as biocontrol agents in plant production. **Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)**. v.3, p. 606-20.2011.

MADSEM, A. M.; HANSEN, V. M.; MEYLING, N. V.; EILENBERG, J. HUMAN. exposure to airborne fungi from genera used as biocontrol agents in plant production. **Ann Agric Environ**. v. 14, p. 5-24. 2007.

MELO, I.S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In **Controle biológico de doenças de plantas** (BETTIOL, W., org.), Jaguariúna, EMBRAPA-CNPDA, ap. 9, p. 388, 1991.

MELO, I. S.; FAULL, J. L. Scanning electron microscopy of conidia of *trichoderma stromaticum*. a biocontrol agent of witches' broom disease of cocoa. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 35, p. 330-332. 2004.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol**. v. 8, p. 958–969. 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunology**. v. 65, p. 63.1983.

NANDAN, D.; REINER, N. E. Attenuation of  $\gamma$  interferon-induced tyrosine phosphorylation in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania donovani*: selective inhibition of signaling through Janus kinases and Stat1. **Infect. Immun.** v. 63, 4495–4500. 1995.

NIESSEN, W.M.A. Liquid chromatography – mass spectrometry. **Boca Raton –Flórida – USA**. 2006.

OHNO, N.; EGAWA, Y.; HASHIMOTO, T.; ADACHI, Y.; YADOMAE, T. Effect of beta-glucans on the nitric oxide synthesis by peritoneal macrophage in mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 19, p. 608-12.1996.

OLYAEI, A.J.; DEMATTOS A.M.; BENNETT, W. M.; Switching between cyclosporin formulations. What are the risks? **Drug Saf**. v.16, p. 366-73. 1997.

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

RAES, G.; BESCHIN, A.; GHASSABEH, G. H.; DE, B. P. Alternatively activated macrophages in protozoan infections. **Curr. Opin. Immunol**. v. 19, p. 454-459. 2007.

REMENTERIA, A.; LÓPEZ-N MOLINA; LUDWIG, A. A. B. V.; BIKANDI; PONTÓN GARAIZAR, J. J. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. **Revista iberoamericana de micología**. v. 22, p. 1-22. 2005.

REESE, T. A, ET AL. Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. **Nature**. v. 447, p. 92–96. 2007.

RITTIG, M.G.; WILSKE, B.; KRAUSE, A. Phagocytosis of microorganisms by means of overshooting pseudopods: where do we stand? **Microbes and Infection**. v.1, p. 727 - 735. 1999.

ROMIG, A.D. Jr. Analytical transmission electron microscopy. **Metals Handbook**. Vol.10, p. 429-489. 1986.

ROOK , G. A. W.; BAKER, R. Cortisol is a potent modulator of lipopolysaccharide-induced interferon signaling in macrophages. **Innate Immunity**. v. 17, p. 302-320. 2011.

ROVIRA, P.; MASCARELL, L., TRUFFA-BACHI, P. The impact of immunosuppressive drugs on the analysis of T cell activation. **Curr. Med. Chem**. v. 7, p. 673-692. 2000.

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

SAMUELS, G.J. *Trichoderma*, a review of biology and sistematics of the genus. **Mycological Research**. v. 100, p. 923-35. 1996.

SAMUELS, G.J.; PARDO-SCHULTHEISS, R.; HEBBAR, K.P.; LUMSDEN, R.D.; BASTOS, C.N.; COSTA, J.C.; BEZERRA, J.L. *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. **Mycological Research**. v.104, p. 760-764. 2000.

SATOSHI, S.; KAZUTOSHI, S.; SHOJI, T.; TOSHIKO, Y.; SHIGEHIRO, T.; HIROAKI, M.; TAKASHI, F.; MOTOHIRO, H.; MICHIZANE, H. AS1387392, a novel immunosuppressive cyclic tetrapeptide compound with inhibitory activity against mammalian histone deacetylase. **The Journal of Antibiotics**. v. 63, p. 633–636.2010.

SCHAUE, D.; WILLIAM, H.; MCBRIDE. Innate Immunity and Normal Tissue Radiobiology. **Radiat Res**. v. 173, p. 406–417. 2010.

SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M.T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunopharmacology**. v.6, p. 317-333.2006.

SCHRÖDER, S.; ZHANG, H.; YEUNG, E. S.; JÄNSCH, L.; ZABEL, C.; WÄTZIG, H. Quantitative Gel Electrophoresis: Sources of Variation. **Journal of Proteome Research**. v. 7, p. 1226–1234. 2008.

SERARSLAN, G.; ATIK, E. Expression of inducible nitric oxide synthase in human cutaneous leishmaniasis. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v.280, p.147-149.2005.

SIEBER, M.; BAUMGRASS, R. Novel inhibitors of the calcineurin/NFATc hub-alternatives to CsA and FK506. **Cell Comm. Signal**. v. 7, p. 25-42. 2009.

SINGH; ARORA, D.; KUMAR; SHARMA, R. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. **Applied Biochemistry Biotechnology**. v. 160, p. 1760-88. 2009.

SORRELL, T. C.; CHEN, S. C. Fungal-derived immune modulating molecules. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 666, p. 108-20.2009.

SOUZA, J.T.; POMELLA, A.W.V.; BOWERS, J.; PIROVANI, C.P.; LOGUERCIO, L.L.; HEBBAR, P. Genetic and Biological Diversity of *Trichoderma stromaticum*, a Mycoparasite of the Cacao Witches' Broom Pathogen. **Phytopathology**. v. 96, p. 61-67. 2006.

SUSI, P.; AKTUGANOV, G.; HIMANEN, J.; KORPELA, T. Biological control of wood decay against fungal infection. **Journal of Environmental Management**. v. 92, p. 1681-9.2011.

TAYLOR, A. L.; WATISON, C. J.; BRADLEY, J.A. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. **Crit Rev Oncol Hematol**. v. 56, p. 23-46. 2005.

UNSCEAR. Effects of Ionizing Radiation. **United Nation Scientific Committe on the effects of Atomic Radiation**. v. 1, 2006.

VETVICKA, V. Glucan-immunostimulant, adjuvant, potential drug. **World J Clin Oncol**. v. 10, p. 115-119. 2011.

WELLING, G.W.; WELLING-WESTER, S.  
Size-exclusion HPLC of proteins. In:  
OLIVER, R.W.A. **HPLC of  
macromolecules: a practical approach**.  
led. Oxfrod, Inlaterra, 1989. p.77-89.

YIKE, I. Fungal proteases and their pathophysiological effects. **Mycopathologia** . v. 171, p. 299-323. 2011.

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -

**CERTIFICADO**

Certificamos que o **Protocolo nº 23/2006**, relativo ao projeto intitulado "**Avaliação da resposta de macrófagos murino ao fungo trichoderma stromaticum usado como biopesticida para o controle da crinipellis pernicioso (vassoura-de-bruxa) do theobroma (cacau)**", que tem como responsável **Arno Heeren de Oliveira**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **28/ 06/2006**.

Este certificado expira-se em **28/ 06 / 2011**.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the **Protocol nº 23/2006**, related to the project entitled "**Valuation of the response in the Macrophages Murino to the fungus Trichoderma Stromaticum owing to biopesticide in the control of the vermin the cocoa, the Crinipellis pernicioso**", under the supervision of **Arno Heeren de Oliveira**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **June 28, 2006**.

This certificate expires in **June 28, 2011**.

Belo Horizonte, 28 de Junho de 2006.

**Prof. Humberto Pereira Oliveira**  
**Presidente do CETEA/UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Prédio da Reitoria – Campus Pampulha  
Avenida Antônio Carlos, 6627 - 7 Andar, Sala 7018  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4592 – Fax: (31) 3499-4027  
[www.ufmg.br/prp/cetes](http://www.ufmg.br/prp/cetes) - [ceata@erpq.ufmg.br](mailto:ceata@erpq.ufmg.br)