



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS

Felipe Fortino Verdán da Silva

Avaliação do Potencial Profilático de Células Dendríticas
Transfectadas com RNA Fúngico em Modelo Experimental de
Esporotricose Sistêmica

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOCÊNCIAS E
BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA

Orientadora: Profa Dra. Iracilda Zeppone Carlos

ARARAQUARA

Julho de 2011

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

S586a Silva, Felipe Fortino Verdan da
Avaliação do potencial profilático de células dendríticas transfectadas com RNA fúngico em modelo experimental de Esporotricose Sistêmica / Felipe Fortino Verdan da Silva. – Araraquara, 2011
138 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia
Orientador: Iracilda Zeppone Carlos

1. Célula dendrítica. 2. Esporotricose sistêmica. 3. Imunomodulação. 4. Imunologia. 5. Exoantígeno. I.Carlos, Iracilda Zeppone, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP Araraquara. Recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Processo Nº 2009/02925-6.

“Ninguém é tão sábio que nada tenha para aprender, nem tão tolo que nada tenha pra ensinar”.

Blaise Pascal

“Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo de você, menos o seu conhecimento. É o seu bem mais precioso. Explore; viaje; descubra. Conheça”.

Albert Einstein

Dedico

A Deus

Pai, obrigado pela benção de conquistar mais um ciclo de minha vida.
Agradeço pela força diária necessária para enfrentar as provas do dia a dia.
Que todos os obstáculos e dores de meu caminho sejam revertidos em força e
sabedoria.
Guie-me com sua luz.

À minha família
(Pai - Valter, Mãe - Rosa, Irmão - Raphael)

“Uma vida sem amor não vale nada. E amar se aprende em casa,
com os pais e os irmãos.

A família é a primeira escola do amor. O lar é o lugar mais
abençoado do mundo. Digo-lhe de coração: ame sua família!
O lar é o primeiro espaço para a vida, a primeira escola do amor, o
lugar providencial onde se aprende o exercício da fraternidade.

Faça de seu lar um lugar de paz e alegria!”

Jesus Cristo

À minha noiva Yara

Pela pessoa essencial que você se tornou em minha vida.
A melhor companheira, minha motivação para buscar sempre o melhor em mim.

Ao eterno professor Dr. Rubens Rodrigues dos Santos-Junior

Tenha a certeza que os ensinamentos que ficaram não foram em vão. O senhor me ensinou tanto no âmbito profissional quanto no pessoal. Obrigado pela confiança que o senhor sempre depositou em mim e pela nossa amizade. Digo que foi um imenso privilégio poder usufruir de sua companhia durante esse curto período de convivência.

O senhor sempre foi e será um exemplo para mim.

Agradecimentos

Aos meus queridos amigos do laboratório de Imunologia, Aline Tansini, Danielle Maia, Lucas Ferreira, Lívia Ribeiro, Djamile Cordeiro, Marcela Bassi, Marisa Placeres, Thaís Negrini, Pâmela Alegranci, Camila Bernardes, Carol Quinello, Josana Faleiros, meu muito obrigado pelos momentos de auxílios, amizade, conversas e risadas.

Aos amigos dos laboratórios de Micologia e Bioquímica, meu muito obrigado pelas valiosas ajudas e amizade a qualquer momento.

Ao amigo Gustavo Monnazzi, pelos grandes ensinamentos sobre citometria de fluxo, grande inspirador para meu aperfeiçoamento neste equipamento

Ao auxílio prestado pela técnica Graciola Goncalves Araujo, do Laboratório IPC, a qual foi essencial para os procedimentos histológicos.

Ao auxílio prestado pelos amigos José Antonio Sampaio Zuanon e professor Dr. Cleverton Roberto de Andrade, da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAR), Departamento de Fisiologia e Patologia, UNESP.

À professora Dra Iracilda Zeppone Carlos, meu muito obrigado pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e por assumir o meu projeto e me apoiar nesse momento tão delicado.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente nesse trabalho,
meu muito obrigado!

Lista de Figuras

Figura 1 - Diferenciação de CDs a partir de precursores da medula óssea de camundongos C57BL/6.

Figura 2 - Avaliação da porcentagem de células CD11c⁺ em diferentes períodos de cultura na presença de GM-CSF e IL-4.

Figura 3 - Avaliação da integridade do RNA total das formas leveduriformes e micelial do fungo *S. schenckii*.

Figura 4 - Avaliação da emissão do fluorocromo Alexa Fluor 488 pelas CDs transfectadas com RNA marcado.

Figura 5 - Representação referente à avaliação no citômetro de fluxo da expressão de marcadores de maturação de CDs após 24hs da adição dos estímulos.

Figura 6 - Expressão dos marcadores de CDs, CD11c, e marcadores de maturação MHCII, CD80 e CD86 nas CDs após estimulação com as formas leveduriformes ou o ExoAg do fungo *S. schenckii*.

Figura 7 - Expressão dos marcadores de maturação MHCII, CD80 e CD86 nas CDs após estimulação com RNA total de hifa ou levedura do fungo *S. schenckii*.

Figura 8 - Produção de IL-12, IL-6 e IL-10 pelas CDs estimuladas com as formas leveduriformes ou com o ExoAg do fungo *S. schenckii*.

Figura 9 - Produção de IL-12, IL-6 e IL-10 pelas CDs após estimulação com RNA total de hifa ou levedura do fungo *S. schenckii*.

Figura 10 - Produção de IFN- γ e IL-17 pelos linfócitos totais no ensaio de co-cultura com CDs estimuladas com as formas leveduriformes ou com o ExoAg do fungo *S. schenckii*.

Figura 11 - Produção de IFN- γ e IL-17 pelas células T no ensaio de co-cultura com CDs estimuladas com RNA total de hifa ou levedura do fungo *S. schenckii*.

Figura 12 - Produção de TGF- β e IL-23 pelas CDs estimuladas com as formas leveduriformes, ou com o ExoAg, ou com RNA total de hifa ou levedura do fungo *S. schenckii*.

Figura 13 - Avaliação dos marcadores de ativação CD44 e CD62L em células CD4+ e CD8+.

Figura 14 - Classificação dos baços quanto à presença do fungo *S. schenckii*.

Figura 15 - Fotos ilustrativas do fungo *S. schenckii* em sua forma leveduriforme no baço dos camundongos.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Classificação dos cortes histológicos quanto à carga fúngica de acordo com cada grupo experimental do ensaio de proteção.

Lista de Abreviaturas

APC – Antigen presenting cell – **Célula apresentadora de antígeno**

BHI - Brain heart infusion – **Infusão de cérebro e coração**

BSA - Bovine serum albumin – **Albumina de soro bovino**

°C - Celsius degrees - **Graus Celsius**

CD – **Célula Dendrítica**

CD4 – Cluster of differentiation 4 – **Grupo de diferenciação 4**

CD8 – Cluster of differentiation 8 – **Grupo de diferenciação 8**

CD11c - Cluster of differentiation 11c - **Grupo de diferenciação 11c**

CD44 - Cluster of differentiation 44 - **Grupo de diferenciação 44**

CD62L - Cluster of differentiation 62 ligand - **Grupo de diferenciação 62 ligante**

CD-80 – Cluster of differentiation 80 – **Grupo de diferenciação 80**

CD-86 – Cluster of differentiation 86 – **Grupo de diferenciação 86**

CO₂ - Carbon dioxide - **Dióxido de Carbono**

DEPC - Diethylpyrocarbonate – **Dietil pirocarbonato**

DOTAP - N-(2,3-Dioleoyloxy-1-propyl) trimethylammonium methyl sulfate

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid - **Ácido etilenodiamino tetra-acético**

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay – **Ensaio Imunoenzimático**

ExoAg - Exoantígeno do fungo *Sporothrix schenckii*

FITC - Fluorescein isothiocyanate - **Isotiocianato de fluoresceína**

GM-CSF - granulocyte–macrophage colony-stimulating factor - **Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos**

H₂SO₄ - Sulfuric acid - **Ácido sulfúrico**

HIV - Human Immunodeficiency Virus – **Vírus da Imunodeficiência Humana**

IFN-γ – Interferon gamma – **Interferon gama**

IL – Interleukin - **Interleucina**

LPS - Lipopolysaccharide - **Lipopolissacarídeo**

mAbs – Monoclonal antibodies – **Anticorpos monoclonais**

mg – Milligram – **Miligrama**

MHC – Major histocompatibility complex – **Complexo principal de histocompatibilidade**

mL – Millilitre - **Mililitro**

NaOH - Sodium hydroxide - **Hidróxido de sódio**

ng – Nanogram - **Nanograma**

PAMP – Pathogen associated molecular patterns – **Padrões moleculares associados ao patógeno**

PBS - Phosphate buffered saline - **Solução salina tamponada de fosfatos**

PE - Phycoerythrin - **Ficoeritrina**

PE-Cy-5 – Phycoerythrin-Cyano 5 – **Ficoeritrina-Ciano 5**

pg – Picogram - **Picograma**

PMA - Phorbol myristate acetate - **Acetato de forbol miristato**

PRR – Pattern recognition receptors – **Receptores de reconhecimento padrão**

RPM - Revolutions per minute - **Rotação por minuto**

ROR – Related Orphan Receptor

SEM - standard error of the mean – **Erro padrão da média**

SFB – Soro Fetal Bovino

TGF- β – Transforming growth factor beta - **Fator de crescimento transformante beta**

Th – T helper cell – **Célula T auxiliadora**

TNF- α – Tumor necrosis factors alpha – **Fator de necrose tumoral alfa**

μg – Microgram – **Micrograma**

μL – Microlitre - **Microlitro**

UV – Ultraviolet - **Ultra-violeta**

SUMÁRIO

Dedicatória.....	IV
Agradecimentos	VII
Lista de Figuras	VIII
Lista de Tabelas.....	X
Lista de Abreviaturas	XI
Resumo.....	XVI
Abstract.....	XVII
Capítulo I.....	1
Introdução.....	2
1. Esporotricose	3
2. Células Dendríticas: características fenotípicas e funcionais	9
3. Papel das células dendríticas nas infecções fúngicas	13
Objetivos	15
1. Objetivo Geral.....	16
2. Objetivos Específicos	16
Materiais e Métodos	18
1. Animais.....	18
2. Microorganismo e condições de cultivo.....	18
3. Infecção Experimental	18
4. Obtenção dos antígenos de <i>S. schenckii</i>	18
5. Dosagem de proteínas	20
6. Dosagem de RNA	20
7. Diferenciação de CDs a partir de precursores de Medula Óssea.....	21
8. Transfecção de células dendríticas com RNA fúngico via lipídio catiônico DOTAP	22
.....	22

9. Estimulação <i>in vitro</i> das CDs diferenciadas da medula	23
10. Análise da expressão de receptores de superfície por citometria de fluxo.....	24
11. Obtenção de linfócitos T para o ensaio de co-cultura	25
12. Ensaio de co-cultura.....	25
13. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção da produção de citocinas	26
14. Avaliação intracelular da citocina TGF- β por citometria de fluxo.....	26
15. Ensaio de proteção	27
16. Análise Estatística	30
Delineamento Experimental.....	31
1. Obtenção e diferenciação de CDs a partir de precursores de Medula Óssea	32
2. Análise fenotípica e funcional das CDs estimuladas ou não com <i>S. schenckii</i> ou antígenos fúngicos e co-cultura dessas com Linfócitos totais de baço de animais primados	33
3. Ensaio de proteção.....	34
Resultados.....	35
1. Diferenciação de CDs a partir de precursores derivados da medula óssea	36
2. Avaliação do RNA total das formas leveduriforme e miceliar do fungo <i>S. schenckii</i>	39
3. Alterações fenotípicas das CDs após estimulação	42
4. Alterações funcionais das CDs após estimulação	48
5. Ensaio de co-cultura entre as CDs estimuladas e linfócitos totais primados.....	52
6. Ensaio de proteção	60
Discussão.....	67
Conclusões.....	78
Referências Bibliográficas	80
Capítulo II.....	96
1. Artigo em Submissão	

RESUMO

A esporotricose é uma infecção micótica provocada pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenckii*. Apresenta em geral lesões cutâneas nodulares e/ou ulcerativas, da qual o fungo dissemina por via linfática, provocando em alguns casos, infecção sistêmica. As células dendríticas (CDs) são células apresentadoras de antígenos profissionais, capazes de traduzir a informação associada ao fungo e promover uma resposta celular tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Entretanto, os mecanismos envolvidos na interação entre CDs e o fungo *S. schenckii* ainda não foram esclarecidos. O presente estudo investigou as mudanças fenotípicas e funcionais em células dendríticas derivadas da medula óssea de camundongos, *in vitro*, promovidas pelos diferentes estímulos fúngicos e sua capacidade em iniciar uma resposta imune celular. Os antígenos estudados foram o exoantígeno, RNA total de levedura ou hifa, e levedura viva do fungo *S. schenckii*. Os resultados demonstraram que todos os estímulos foram capazes de ativar as CDs em termos de geração de uma resposta imune celular. Enquanto o grupo Levedura promoveu uma produção mais acentuada de IFN- γ do que IL-17, o grupo Exo100 gerou uma produção similar entre essas citocinas. Esse resultado sugere que o exoantígeno pode ser capaz de desviar a resposta imune celular de um perfil Th1 efetor para Th17 inflamatório. O RNA obtido do fungo *S. schenckii* em sua forma leveduriforme foi capaz de ativar CDs, promovendo uma resposta Th1 enquanto o RNA obtido a partir da hifa promoveu resposta Th17 em 48 horas de ensaio de co-cultura. Nesse contexto, a citocina IL-12 foi essencial para a ativação de células T produtoras de IFN- γ , enquanto as citocinas TGF- β e IL-6 foram necessárias para ativação de células T produtoras de IL-17. Nossos dados demonstram a plasticidade das CDs em traduzir diferentes estímulos derivados do fungo *S. schenckii* em uma resposta diferencial de células T *in vitro*. Posteriormente, por meio da transferência adotiva dessas CDs estimuladas, foi avaliada a capacidade de essas células exercerem proteção na infecção induzida de esporotricose. Os resultados encontrados não demonstraram a presença de UFC no baço desses animais, enquanto que as análises histopatológicas sugerem capacidade dessas células em reduzir a carga fúngica no baço na esporotricose sistêmica. Os grupos de tratamento Exo100, RNA Hifa e RNA Levedura, ao mesmo tempo em que promoveram uma diminuição na classificação da carga fúngica histológica nos animais infectados quando comparados ao controle somente infectado, promoveram um aumento significativo de células CD4/CD62Lhi e CD8/CD62Lhi em células totais do baço, o que sugere a formação de memória central nesses grupos de tratamentos. Embora não se conheça ainda as conseqüências de uma maior ativação de células Th17 na esporotricose, a indução dessas parece estar associada com a proteção vacinal no modelo da esporotricose sistêmica. A utilização das CDs *ex-vivo* como ferramentas protetoras para esporotricose exige estudos posteriores para melhor caracterização desse modelo vacinal.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a disease caused by the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*. The main clinical manifestations occur on the skin, however the number of systemic and visceral cases has increased, especially in immunocompromised patients. Dendritic cells (DC) are highly capable of recognizing the fungus associated data and translate it into differential T cells responses both in vitro and in vivo. Although, the mechanisms involved in the interaction between DCs and *S. schenckii* are not fully elucidated. The study aimed to investigate the phenotypic and functional changes in bone marrow dendritic cells stimulated in vitro with the yeast form, or exoantigen, or total RNA from yeast or hyphal forms, of the fungus *S. schenckii* and its ability to trigger a cellular immune response. Our results demonstrated that live yeast-form from *S. schenckii* and exoantigen, on its higher dose, were able to activate BMDC and made them fully capable of triggering T cell responses in vitro. Whereas the Yeast group promoted a more enunciated IFN- γ production than IL-17, the Exo100 group generated a similar production of both cytokines. The exoantigen stimulus suggest an ability in deviating the immune response from an effector Th1 to inflammatory Th17 response, although we do not know the effects of an increase on Th17 cells in sporotrichosis. Similarly, RNA antigens were equally capable of immunomodulation, with yeast RNA promoting a Th1 whereas hyphal RNA promoted Th17 responses at 48 hours co-culture assay. In this context, the IL-12 cytokine was shown essential to the activation of IFN- γ producing T cells, whilst TGF- β and IL-6 cytokines were shown needed for IL-17 producing T cells activation. Our data demonstrated the plasticity of DC on translating the data associated with the fungus *S. schenckii* and ExoAg and total RNA into differential T cells response in vitro. Further we assessed the ability of these cells on a protection assay for sporotrichosis, adoptively transferring these cells as a vaccinal tool. Although we didn't recover CFU values from spleen, our histopathological analyzes suggests a great ability of these cells in reducing the fungal burden in spleen for systemic sporotrichosis. The treatment groups Exo100, Hyphal RNA and Yeast RNA promoted decay on histological fungal burden when compared with non-treated infected group, together with a significant augment on CD4/CD62Lhi and CD8/CD62Lhi cells in spleen cells, suggesting central memory triggering for these groups. Although the consequences of increased Th17 cells activation are not known in sporotrichosis, the induction of Th17 cells seems to have a protective role for systemic sporotrichosis. Our data provides the possibility of using ex vivo-generated DCs as vaccinal tools for sporotrichosis, however further studies are still need to optimize this vaccinal tool.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1. Esporotricose

A esporotricose é uma doença de distribuição mundial, sendo mais comum nas regiões de clima temperado e tropical. A maioria dos casos se concentram no México, América Central e América do Sul, com incidência de um para cada 1000 habitantes nas áreas rurais (Pappas, Tellez *et al.*, 2000; De Araujo, Marques *et al.*, 2001). A Esporotricose é a micose subcutânea mais comum na América do Sul, e, atualmente, o Japão e a América do Norte também são considerados áreas endêmicas (Barros, Schubach Ade *et al.*, 2004). No Brasil, a região metropolitana do Rio de Janeiro é considerada uma região epidêmica, sendo as populações de condições socioeconômicas desfavoráveis as mais atingidas (Barros, Schubach *et al.*, 2010).

A esporotricose foi descrita pela primeira vez por Benjamin Schenck em 1898, um estudante de medicina do Hospital Johns Hopkins, Baltimore, Estados Unidos. Após Schenck isolar o agente etiológico, a amostra foi analisada pelo micologista Erwin Smith e identificada como um microorganismo do gênero *Sporotrichum*. Em 1900, a doença foi noticiada pela segunda vez por Hektoen and Perkins, os quais classificaram o agente etiológico como *Sporothrix schenckii* (*S. schenckii*), nome usado até os dias atuais (Hektoen e Perkins, 1900). O primeiro caso de esporotricose no Brasil foi noticiado em 1907 pelos Drs Adolpho Lutz e Alffonso Splendore (Lutz e Splendore, 1907).

O fungo *Sporothrix schenckii* é o agente etiológico da esporotricose humana e animal. Pertence à classe dos *Hyphomycetes*, presente na natureza como bolor, na forma miceliar, constituído de hifas septadas, hialinas, com conídios posicionados lateralmente na hifa ou em grupos no final de conidióforos, organizados em formato de bouquet. A forma miceliar infectante, ao entrar em contato com o tecido do hospedeiro, a 37°C, se modifica para a forma de levedura, tipicamente redondas, ovais ou em forma de charuto e com reprodução por brotamento (Gori, Lupetti *et al.*, 1997; Mendez Tovar, Anides-Fonseca *et al.*, 2004).

Na natureza ou no laboratório, em temperaturas que variam de 25 a 30°C, o fungo cresce na forma miceliar. O organismo cresce bem em meios de cultura artificiais padrão, como Sabouraud dextrose ágar, produzindo colônias úmidas de coloração creme, com aspecto membranoso e uma superfície dobrada ou enrugada. Após alguns dias, variável entre as cepas (Almeida-Paes, Frases *et al.*, 2009), as colônias adquirem uma coloração de marrom à preta (Lopes-Bezerra, Schubach *et al.*, 2006). Entretanto, existem cepas que não alteram a cor, denominadas como cepas albinas ou não

pigmentadas (Almeida-Paes, Frases *et al.*, 2009). Por outro lado, quando cultivado a 37°C, o *S. schenckii* assume a forma leveduriforme em meios de cultura suplementados, como BHI (brain-heart infusion) ou glicose-cisteína ágar sangue. Diante dessas características, o fungo *S. schenckii* é classificado como dimórfico termo-dependente. Apesar de fatores como aeração, tensão de CO₂, pH, fonte de carbono e presença de cátions divalentes influenciarem a transição morfológica, a temperatura é o fator determinante para o dimorfismo (Lopes-Bezerra, Schubach *et al.*, 2006; Carlos, Sassa *et al.*, 2009).

A melanina é o pigmento responsável pela coloração observada nas colônias de *S. schenckii*. Nas hifas, existem conídios pigmentados, com paredes celulares grossas, que variam em número, o que determina a intensidade da cor da colônia (Nobre, Madrid *et al.*, 2008). Apesar das colônias na forma leveduriforme não apresentarem variações de cor entre cepas, sendo sempre de coloração creme, foi demonstrado uma fina camada de melanina nas células leveduriformes (Morris-Jones, Youngchim *et al.*, 2003).

O fungo *S. schenckii* é saprófito no ambiente e amplamente distribuído na natureza. Podem ser encontrados em plantas, arbustos, solo, materiais orgânicos em decomposição, ou materiais sob condições adequadas de temperatura e umidade. Não existem fatores que predispõem a doença, a qual afeta pessoas de qualquer idade, sexo ou raça, e o número de casos envolvendo homens ou mulheres varia de região para região (Muir e Pritchard, 1984; Itoh, Okamoto *et al.*, 1986; Rippon, 1988; Barros, Schubach Ade *et al.*, 2004). As pessoas com maior risco de infecção são aquelas ligadas a certas ocupações associadas ao contato com o solo e plantas como fazendeiros, jardineiros, floristas, horticultores, mineradores e outros profissionais (Matter, Bailey *et al.*, 1984; Conti Diaz, 1989; Neyra, Fonteyne *et al.*, 2005; Carlos, Sassa *et al.*, 2009) e, atualmente, devido ao grande número de casos de transmissões zoonóticas, os profissionais veterinários, cuidadores de animais e donos de animais domésticos, principalmente gatos (De Lima Barros, Schubach *et al.*, 2001; Barros, Schubach Ade *et al.*, 2004; Schubach, Schubach *et al.*, 2006; Barros, Schubach *et al.*, 2010).

O *S. schenckii* é um fungo patogênico dimórfico que produz uma micose subcutânea típica, apesar de apresentar caráter oportunista em pacientes imunocomprometidos. A infecção clássica é adquirida através da implantação cutânea, em geral através de pequenos traumas com materiais contaminados com matéria orgânica do solo, através de ferimentos causados por fragmentos de vidro, pedras, vegetação, espinhos de roseira, ou ferimentos com feno contaminado (Lopes-Bezerra,

Schubach *et al.*, 2006; Carlos, Sassa *et al.*, 2009). A transmissão zoonótica tem sido descrita em casos isolados ou em pequenos surtos, através de picadas, mordidas, ou arranhões de animais contaminados, como roedores, peixes, gatos, tatus, pássaros, insetos, ou répteis (Lopes-Bezerra, Schubach *et al.*, 2006; Carlos, Sassa *et al.*, 2009). O período de incubação varia de 3 dias a 12 semanas, com média de 3 semanas (Lopes, Alves *et al.*, 1992; Kajiwara, Saito *et al.*, 2004).

Existem diferentes formas clínicas da doença. A forma clínica mais comum da doença é a linfocutânea, na qual as lesões aparecem como uma pápula, que, gradativamente, aumenta e torna-se nodular e freqüentemente úlcera (Lyon, Zurita *et al.*, 2003; Lopes-Bezerra, Schubach *et al.*, 2006). Essa forma clínica pode curar de forma espontânea ou tornar-se crônica se não houver tratamento. Outra forma clínica da doença é a cutânea, na qual as lesões são placas em formas de verruga que podem evoluir para úlceras, porém a disseminação linfática não é observada. As lesões apresentam cura espontânea, porém existe a possibilidade de recorrência caso não haja tratamento. A última e mais grave forma clínica é a disseminada, a qual ocorre como resultado de uma disseminação hematogênica do sítio de inoculação primário ou do linfonodo. Essa forma atinge principalmente hospedeiros imunocomprometidos e pode se apresentar de diversas formas, dentre elas sinusite e meningite (De Araujo, Marques *et al.*, 2001). Mais raramente, o fungo pode ser inalado, aspirado ou ingerido, produzindo infecção sistêmica em indivíduos suscetíveis (Matter, Bailey *et al.*, 1984; Lopes, Alves *et al.*, 1992).

Estas diferentes formas clínicas são atribuídas à quantidade inicial do inóculo, a profundidade do trauma, a virulência da cepa, ao estado imunológico do hospedeiro, e a tolerância térmica do fungo (Fernandes, Mathews *et al.*, 1999). A capacidade da resposta imune celular do hospedeiro determina o grau de invasão pelo fungo patogênico. As formas mais graves da esporotricose têm sido associadas a pacientes imunocomprometidos, como aqueles infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), sugerindo que o *S. schenckii* é um patógeno oportunista emergente (Gori, Lupetti *et al.*, 1997; Al-Tawfiq e Wools, 1998; De Araujo, Marques *et al.*, 2001; Nascimento e Almeida, 2005).

Atualmente, tem-se voltado à atenção aos componentes do fungo que possam estar envolvidos no reconhecimento e na indução da resposta imune. Os mecanismos de virulência do fungo são pouco conhecidos, mas sugere-se que a termotolerância, pigmentos como a melanina, as enzimas extracelulares e peptídeos-polissacarídeos

estejam envolvidos. As enzimas extracelulares como as fosfatases ácidas, produzidas pelo fungo, parecem desempenhar papel importante na interação das células leveduriformes de *S. schenckii* com os macrófagos (Hogan, Klein *et al.*, 1996; Nascimento e Almeida, 2005).

No fungo *S. schenckii*, a forma leveduriforme possui uma fina camada de complexo peptídico-polissacarídeo na superfície celular (Alviano, Pereira *et al.*, 1982). A porção polissacarídea é composta de ramnose, manose, galactose e glicose. A ramnose desempenha um papel importante na reação de hipersensibilidade do tipo imediata, enquanto que a porção peptídica está envolvida nas reações de hipersensibilidade tardias (Shimonaka, Noguchi *et al.*, 1975). O peptídeo-ramnomanana, isolado da forma leveduriforme do fungo, pode estar envolvido na virulência do fungo (Lloyd e Bitoon, 1971; Carlos, Sgarbi *et al.*, 1999). A fagocitose das células leveduriformes pelos macrófagos peritoneais é inibida *in vitro* pela galactomanana e ramnomanana purificadas da superfície celular do *S. schenckii* (Oda, Kubelka *et al.*, 1983), assim bem como pelo extrato lipídico (Carlos, Sgarbi *et al.*, 2003).

A composição de carboidratos da parede celular do fungo está relacionada à virulência dos conídios em diferentes tempos de cultivo. Verificou-se que os conídios cultivados por um menor período de tempo foram mais virulentos e que em sua superfície havia maior proporção de ramnomanana em relação à manose (Fernandes, Mathews *et al.*, 1999).

A capacidade de adesão do fungo a células epiteliais é primordial para a colonização do tecido e para a disseminação da doença. Inicialmente, estudos demonstraram que o fungo *S. schenckii* adere a fibronectina e laminina (Lima, Figueiredo *et al.*, 1999; Lima, Figueiredo *et al.*, 2001; Lima, Bouchara *et al.*, 2004), células endoteliais (Figueiredo, De Lima *et al.*, 2004), e que isso é um passo essencial para a transposição da barreira endotelial (Figueiredo, Deccache *et al.*, 2007). Ambos os processos são modulados por citocinas (Figueiredo, De Lima *et al.*, 2004; Figueiredo, Deccache *et al.*, 2007). Recentemente, uma proteína com funções de adesina, de 70 kDa, foi caracterizada por dois grupos diferentes (Nascimento, Espindola *et al.*, 2008; Ruiz-Baca, Toriello *et al.*, 2009). Essa proteína, presente na parede celular, medeia a adesão do fungo às proteínas da matriz extracelular, e é responsável por importante produção de anticorpos na infecção esporotricótica (Scott e Muchmore, 1989; Nascimento e Almeida, 2005). A imunização de camundongos com um anticorpo

monoclonal para a proteína de 70 kDa induziu proteção contra a esporotricose, demonstrando a importância dessa proteína como fator de virulência (Nascimento, Espindola *et al.*, 2008). Outro trabalho sugere que a virulência do Fungo *S. schenckii* está relacionada, pelo menos em parte, à expressão de adesinas para fibronectina na superfície do fungo (Teixeira, De Castro *et al.*, 2009). Similarmente, diferentes autores têm descrito uma correlação positiva entre adesão fúngica e virulência (Hanna, Monteiro Da Silva *et al.*, 2000; Wasylnka e Moore, 2000; Mendes-Giannini, Andreotti *et al.*, 2006).

A camada peptídica-polissacarídea, presente na forma leveduriforme, pode se desprender da camada mais central da parede celular devido ao atrito gerado pela agitação nos meios de cultura, necessária para a transição da forma miceliar para a leveduriforme *in vitro*. Esses antígenos que são liberados no meio de cultura são denominados exoantígenos e também podem estar relacionados à resposta imune gerada na infecção fúngica (Polonelli e Morace, 1982). Em 1989, Scott e Muchmore demonstraram, usando a técnica de immunoblotting, que todos os soros de pacientes com esporotricose testados reagem com antígenos solúveis de *S. schenckii* de 40 e 70 kDa. Pacientes com esporotricose extracutânea também demonstraram reatividade contra o antígeno de 32 kDa, demonstrando a possível importância destes três antígenos na resposta humoral na esporotricose (Scott e Muchmore, 1989). Em 2005, Nascimento e Almeida demonstraram que todos os soros de camundongos infectados com esporotricose reagiram contra o antígeno de 70 kDa (Nascimento e Almeida, 2005).

Carlos e cols. demonstraram que a resposta imune celular de animais infectados com *O fungo S. schenckii* está diminuída entre a 4^a e a 6^a semanas de infecção, quando as células do baço destes animais foram estimuladas com exoantígeno obtido a partir do fungo em sua forma leveduriforme (Carlos, Zini *et al.*, 1994). Neste período também se pôde observar um aumento na multiplicação fúngica no fígado e baço dos camundongos infectados (Maia, Sassa *et al.*, 2006).

Moléculas de ácido siálico também foram encontradas na superfície do *S. schenckii* e podem ter um papel na patogenicidade deste fungo, devido ao fato que as formas saprofitas têm menos resíduos de ácido siálico em sua superfície que as formas leveduriformes. As formas de *S. schenckii* que tiveram seus resíduos de ácido siálico removidos enzimaticamente são mais suscetíveis à fagocitose (Alviano, Travassos *et al.*, 1999).

O componente lipídico da parede celular desempenha um papel importante na patogênese desta micose, inibindo o processo fagocítico através da elevada liberação de óxido nítrico (NO) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em culturas de macrófagos (Carlos, Sgarbi *et al.*, 2003). Recentemente, Sassá e colaboradores demonstraram que macrófagos deficientes para TLR-4 não apresentaram produção de NO e TNF- α quando estimulados com o lipídeo de *S. schenckii*, sugerindo uma importância desse receptor na resposta ao mesmo (Sassa, Saturi *et al.*, 2009).

Uma grande variedade de fungos sintetizam pigmentos marrom escuros ou pretos conhecidos como melanina, os quais são produzidos principalmente por duas vias metabólicas: 1,8-dihidroxi-naftaleno (DHN) ou dihidroxifenilalanina (DOPA) (Bell e Wheeler, 1986; Butler e Day, 1998). Ao exemplo de alguns fungos patogênicos de coloração escura, como *Exophiala (Wangiella) dermatitidis*, *Cladosporium carrioni*, e *Fonsecaea pedrosoi*, o fungo *S. schenckii* é capaz de sintetizar melanina pela via DHN (Romero-Martinez, Wheeler *et al.*, 2000). Mais recentemente, dois grupos demonstraram a capacidade do fungo *S. schenckii* em produzir melanina pela via DOPA (Almeida-Paes, Frases *et al.*, 2009; Teixeira, De Castro *et al.*, 2010).

Estudos *in vitro* demonstraram a capacidade da melanina fúngica em agir como um protetor à resposta imune, baseado em sua capacidade de remover radicais livres eficientemente, o que aumenta a sobrevivência de células melanilizadas na presença de derivados de nitrogênio e oxigênio quando comparadas com células deficientes em melanina (Doering, Nosanchuk *et al.*, 1999; Romero-Martinez, Wheeler *et al.*, 2000). Romero-Martinez e cols. (2000) demonstraram *in vitro* que conídios pigmentados são mais resistentes à fagocitose, radiação UV e radicais livres, quando comparados a conídios albinos (Romero-Martinez, Wheeler *et al.*, 2000).

Em modelo experimental murino de esporotricose cutânea, Nobre e colaboradores demonstraram diferenças na virulência de cepas pigmentadas e mutantes albinos, sendo a melanina um fator importante para a disseminação de lesões na esporotricose (Nobre, Madrid *et al.*, 2008). Em modelo de esporotricose sistêmica, cepas cultivadas com meio rico em L-DOPA promoveram um aumento na virulência do fungo, determinando maior mortalidade, maior UFC e pior condição dos órgãos (Teixeira, De Castro *et al.*, 2010). Além da produção da melanina ser variável entre as cepas, as condições de cultura influenciam a sua produção e devem ser levadas em conta para não haver alterações de virulência da cepa utilizada (Almeida-Paes, Frases *et*

al., 2009). Todos esses fatores fazem da melanina um importante fator de virulência do fungo *S. schenckii*.

O teste ideal para se analisar um fator de virulência é realizar comparações entre respostas biológicas ao fungo com e sem esse fator (Hogan, Klein *et al.*, 1996). Para viabilizar essas comparações, mutantes que não são naturais podem ser obtidos por mutagênese química ou através de radiação UV. Mutantes com virulência atenuada ou inexistente permitem uma base para o estudo de fatores de virulência, incluindo a aplicação de ferramentas da biologia molecular para definir os genes envolvidos (Stevens, Brummer *et al.*, 1997).

2. Células Dendríticas: características fenotípicas e funcionais

As Células Dendríticas foram descobertas por Ralph M. Steinman e Zanvil Cohn em 1973, e descritas em uma série de artigos, de 1973 até 1979, após serem isoladas do baço de camundongos (Steinman e Cohn, 1973; 1974; Steinman, Lustig *et al.*, 1974; Steinman, Adams *et al.*, 1975; Steinman, Kaplan *et al.*, 1979). Ao analisarem as células acessórias do sistema imune por microscopia de contraste de fase e eletrônica, Cohn e Steinman encontraram células estreladas e alongadas que não se assemelhavam com nenhum macrófago descrito. Devido ao seu formato ramificado, que remetia ao de uma árvore, eles nomearam essas de Células Dendríticas, terminologia derivada da palavra *dendron*, que significa árvore em grego (Steinman, 2007). Esta morfologia é de extrema importância para sua função, pois as ramificações lançadas pela CD funcionam para aumentar sua superfície de contato e otimizam suas funções, diretamente relacionadas ao contato célula-célula.

Curiosamente, as células de Langerhans, descobertas por Paul Langerhans em 1868 (Langerhans, 1868), permaneceram por mais de 100 anos como células constituintes do sistema nervoso localizadas na epiderme e, somente em 1989, foram classificadas como um dos muitos tipos de CDs (Becker, 2003).

Durante os primeiros 20 anos de pesquisa, as CDs foram cuidadosamente isoladas dos tecidos e estudadas por um pequeno número de pesquisadores. Entretanto, a identificação de métodos de diferenciação com grande geração de CDs *in vitro* (Caux, Dezutter-Dambuyant *et al.*, 1992; Inaba, Inaba *et al.*, 1992; Romani, Gruner *et al.*, 1994) permitiu muitas descobertas de suas propriedades biológicas e moleculares. Logo se tornou evidente que as células dendríticas eram únicas e particularmente potentes em

promover a ativação de células T (Steinman, 2007). Como se voltando no tempo, a descoberta de diferentes subtipos levou os pesquisadores de volta ao trabalhoso isolamento de CDs de tecidos ou detecção específica através de proteínas de fusão in vivo (Dudziak, Kamphorst *et al.*, 2007; Klechevsky, Morita *et al.*, 2008).

As CDs são células hematopoiéticas que pertencem à família das células apresentadoras de antígenos (do inglês APC), que inclui também os linfócitos B e os macrófagos (Merad e Manz, 2009). Entretanto, as CDs são pelo menos de 100 a 300 vezes mais potentes em iniciar a resposta de células T quando comparadas as outras APCs (Steinman, Gutchinov *et al.*, 1983).

As CDs são compostas por diversas formas e subtipos, cada um com receptores distintos para captura de antígeno e sinalização, diferentes mecanismos de processamento de antígenos e diferentes resultados funcionais. Estudos recentes têm demonstrado que diferentes tipos de CDs apresentam papéis imunorreguladores distintos, com complexa interação entre os mesmos (Dudziak, Kamphorst *et al.*, 2007; Shklovskaya, Roediger *et al.*, 2008; Kaplan, 2010). As pesquisas nessa área devem determinar que os subtipos das CDs se desenvolveram para lidar com categorias específicas de infecções e antígenos (Steinman, 2007).

As células dendríticas são compostas por populações heterogêneas de células que podem ser divididas em dois grupos principais: (1) CDs não linfóides migratórias e CDs linfóides residentes; (2) CDs plasmocitóides (pCDs). O termo CDs clássicas ou convencionais (cCD) têm sido usado recentemente para opor CDs linfóides residentes às pCDs. Por outro lado, as CDs não linfóides são principalmente denominadas CDs teciduais (Merad e Manz, 2009).

As CDs migratórias e as residentes possuem duas principais funções: a manutenção da tolerância ao próprio e a promoção de uma resposta imune específica contra patógenos invasores (Banchereau e Steinman, 1998; Steinman, Hawiger *et al.*, 2003); enquanto a principal função das CDs plasmocitóides é secretar grandes quantidades de interferon- α em resposta às infecções virais e ativar células T contra os antígenos virais (Liu, 2005).

As CDs, juntamente com todas as células sanguíneas, têm sua última origem nas células tronco hematopoiéticas da medula óssea. Estas dão origem a uma série de precursores que progressivamente se tornam mais comprometidos a uma linhagem celular específica. Um dos primeiros passos é o desenvolvimento de precursores que possuem uma grande tendência em gerar células das linhagens mielóides ou linfóides,

denominados precursores mielóide comum e precursor linfóide comum, respectivamente. Inicialmente, foi considerado óbvio que as CDs seriam células da linhagem mielóide, entretanto, os precursores comprometidos com a linhagem mielóide ou linfóide podem se desenvolver em CDs e pCDs em camundongos e humanos. Estudos recentes revelaram que a manutenção da possibilidade de um precursor hematopoiético se tornar uma CD está relacionada com a expressão do receptor Flt3 e sua capacidade em responder ao ligante de Flt3. Mais estudos são necessários para demonstrar todas as possibilidades do sistema hematopoiético em gerar CDs e os fatores envolvidos, porém, está claro que existe uma grande plasticidade de destino entre os precursores (Shortman e Naik, 2007; Merad e Manz, 2009).

Quanto à distribuição, as CDs podem ser encontradas tanto em órgãos linfóides como em órgãos não linfóides. As CDs estão continuamente vigiando o ambiente no qual se encontram, processando antígenos e apresentando esses para outras células imunes. Elas são sentinelas que garantem que uma resposta imune seja apropriada em especificidade, intensidade, e tipo (Bashyam, 2007).

Os patógenos apresentam assinaturas moleculares, conservadas evolutivamente, descritas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen Associated Molecular Patterns*), que promovem a ativação das CDs. Os PAMPs estão associados tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa e são reconhecidos por uma vasta família de receptores denominada receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Nos últimos anos, várias classes de PRRs têm sido descritos, por exemplo, receptores tipo NOD (nucleotide oligomerization domain), receptores tipo RIG-I (retinoic acid inducible gene), alguns membros da família lectina tipo-C, e principalmente os receptores do tipo toll (TLRs). As CDs expressam um grande repertório de PRRs e, em resposta a sinais promovidos pelo receptor, promovem uma profunda transformação fenotípica e funcional, denominadas ativação de CDs. Desse modo, tornam-se células apresentadoras de antígenos competentes para sustentar a expansão e diferenciação de células T antígeno-específicas em células efetoras apropriadas. As CDs ativadas pelo contato com o patógeno normalmente apresentam altos níveis da molécula de histocompatibilidade principal (MHC), as quais apresentam os peptídeos derivados do patógeno, que podem ser reconhecidos por receptores de células T (TCR) em células T virgens antígeno-específicas. Esse é o primeiro sinal de ativação para a célula T e é conhecido como sinal 1. As CDs ativadas pelo encontro com o patógeno também expressam uma variedade de moléculas co-estimuladoras, as

quais se ligam aos seus receptores nas células T e transmitem sinais que são importantes para a proliferação e manutenção das células T, conhecido como sinal 2. As moléculas co-estimuladoras mais conhecidas nesse contexto são as CD80 e CD86, que se ligam à CD28 na célula T. Por fim, as células dendríticas ativadas produzem mediadores que promovem a diferenciação de células T em células efetoras, conhecido como sinal 3. Por exemplo, a interleucina-12 é um mediador típico secretado por CDs ativadas, que instruem o desenvolvimento da imunidade do tipo 1, caracterizado pelas células T auxiliaadoras 1 (Th1) ou linfócito T citotóxico (CTL). A integração desses três sinais pela célula T determina o seu destino. Esses sinais parecem ser necessários para geração de células T efetoras, enquanto o sinal 1, na ausência dos sinais 2 e 3, parece ser utilizado para inativar a célula T virgem, ou promover destinos reguladores (Joffre, Nolte *et al.*, 2009).

As CDs imunogênicas são geralmente definidas pela expressão de marcadores de maturação apropriados, como moléculas MHC classe II, CD80, CD86, CD40 e CCR7. Entretanto, existem evidências que CDs podem expressar marcadores de maturação sem serem capazes de estimular respostas de células T, e, em algumas vezes, induzindo tolerância (Albert, Jegathesan *et al.*, 2001; Menges, Rossner *et al.*, 2002; Fujii, Liu *et al.*, 2004). Portanto, a nomenclatura CD ativada ao invés de maturada é mais adequada para demonstrar capacidade de ativar células T.

Nesse contexto, Steinman demonstrou que o estado de ativação e diferenciação das CDs determina ambos a magnitude e a natureza da resposta imune adaptativa elaborada pelo hospedeiro. Isso revela o papel central da CD como intérprete da entidade estranha e como determinante chave do tipo adequado da resposta imune que deve ser iniciada (Bashyam, 2007).

De acordo com as informações descritas acima, a ativação apropriada das CDs pode ser extremamente relevante para o direcionamento das respostas mediadas pelos linfócitos T auxiliares, seja o objetivo aumentar a resistência ou silenciar respostas indesejadas. Uma caracterização minuciosa abordando a interação de CDs com antígenos distintos pode originar novos princípios de intervenção imunológica, como já vem sendo investigado na terapia anti-tumoral (O'Neill, Wilson *et al.*, 2004; Reichardt, Brossart *et al.*, 2004; Steinman, 2007).

Em diferentes modelos experimentais de doenças infecciosas têm sido proposto que CDs podem servir como vacinas carreadoras de antígenos mediando proteção

contra vários tipos de patógenos (Bourguin, Moser *et al.*, 1998; Moll, 2003; Lu, Arraes *et al.*, 2004).

Estudos na última década têm estabelecido o papel essencial das CDs na manutenção da integridade imunológica e sua importância no desenvolvimento e possível tratamento de doenças humanas. Em reconhecimento à sua importância, o descobridor das CDs Dr. Ralph Steinman ganhou o prêmio Albert Lasker de Pesquisa Médica Básica no ano de 2007 (Rockefeller University, New York, NY) (Merad e Manz, 2009).

3. Papel das células dendríticas nas infecções fúngicas

Nos últimos anos tem sido demonstrado que a estimulação de CDs com peptídeos antigênicos, lisado de tumores, ou vetores virais codificando antígenos relevantes, induz uma resposta imune, que inclui a imunidade protetora e terapêutica para tumores e infecções bacterianas em modelos animais (Esche, Shurin *et al.*, 1999; Gonzalez-Juarrero, Turner *et al.*, 2002; Moll, 2003) e ensaios clínicos (Ide, Nakamura *et al.*, 2006; Srivastava, 2006; Ferrantini, Capone *et al.*, 2008; Palma, Adamson *et al.*, 2008).

Além da imunidade protetora contra bactérias e antígenos tumorais, tem sido descrito também o papel de CDs nas infecções fúngicas (Mansour, Latz *et al.*, 2006; Pietrella, Bistoni *et al.*, 2006; Dan, Wang *et al.*, 2008). Estudos recentes demonstram que CDs são capazes de identificar informações associadas a fungos, necessárias para promover de maneira qualitativa uma resposta imune adquirida e protetora contra este patógeno (D'ostiani, Del Sero *et al.*, 2000). D'ostiani e cols. (2000) observaram que CDs mielóides imaturas fagocitam eficientemente as formas de levedura e hifas do fungo *Candida albicans* e induzem diferencialmente uma resposta mediada por células T auxiliares (Th). CDs estimuladas com a forma leveduriforme de *C. albicans* produziram quantidades significativas de IL-12, ativando, conseqüentemente, uma resposta de padrão Th1, enquanto que a estimulação das CDs com a forma miceliar induziu a produção de IL-4 e a ativação de células Th2 (D'ostiani, Del Sero *et al.*, 2000). Entretanto, somente as CDs estimuladas com as formas leveduriformes foram capazes de induzir uma resposta protetora quando transferida adotivamente *in vivo* (D'ostiani, Del Sero *et al.*, 2000).

Outros estudos têm demonstrado também que a transfecção de CDs com RNA fúngico promove a maturação funcional das mesmas (Bacci, Montagnoli *et al.*, 2002; Claudia, Bacci *et al.*, 2002; Bozza, Perruccio *et al.*, 2003). Bacci e cols. (2002) observaram que a transfecção *in vitro* de CDs com RNA total extraído tanto da forma leveduriforme quanto miceliar de *C. albicans* foi capaz de promover a maturação das CDs, com aumento na expressão de MHC classe II e de moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 (Bacci, Montagnoli *et al.*, 2002). Entretanto, apenas as CDs transfectadas com RNA de levedura foram capazes de induzir um padrão de resposta Th1 e resistência fúngica *in vivo* (Bacci, Montagnoli *et al.*, 2002). Posteriormente, Bozza e cols. (2004) observaram que as CDs capturam de maneira eficiente o RNA fúngico extracelular, promovendo um aumento na expressão de TLR. Neste caso, a expressão de TLR2, TLR3, TLR4, TLR8 e TLR9 aumentou em CDs estimuladas com RNA de *Aspergillus* de ambas as formas, levedura e conídias (Bozza, Montagnoli *et al.*, 2004). Estes dados sugerem que a utilização de CDs transfectadas com RNA fúngico pode representar uma estratégia de terapia celular promissora contra as infecções fúngicas.

A imunidade mediada por células a antígenos de *S. schenckii* está associada ao mecanismo imune que controla esta infecção. Entretanto, o papel das CDs na esporotricose não está totalmente esclarecido. Recentemente, Uenotsuchi e cols. demonstraram que CDs derivadas de monócitos humanos pulsados com o fungo *S. schenckii*, de origem cutânea e visceral, promoveram uma resposta imune celular diferencial. As CDs imaturas estimuladas com *S. schenckii* de origem cutânea foram mais potentes em ativar uma resposta Th1 quando comparadas com as CDs estimuladas com *S. schenckii* de origem visceral (Uenotsuchi, Takeuchi *et al.*, 2006).

Desta forma, este estudo tem como objetivo a utilização de CDs estimuladas com o RNA total do fungo *S. schenckii* ou com seus diferentes antígenos para avaliar o possível papel imunomodulador destas células em modelo experimental de esporotricose sistêmica.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Avaliação fenotípica e funcional de CDs estimuladas *in vitro* com RNA total ou exoantígeno do fungo *S. schenckii* e do possível efeito imunomodulador em modelo experimental de esporotricose sistêmica.

2. Objetivos Específicos

- Obtenção e diferenciação de CDs a partir de precursores da medula óssea.
- Avaliação morfológica e fenotípica de CDs estimuladas *in vitro* com a forma leveduriforme, ou RNA total, ou exoantígeno de *S. schenckii*.
- Avaliação funcional das CDs estimuladas *in vitro* com a forma leveduriforme, ou RNA total, ou exoantígeno de *S. schenckii* através da produção de citocinas no sobrenadante de cultura.
- Avaliar a capacidade de CDs estimuladas *in vitro* com a forma leveduriforme, ou RNA total, ou exoantígeno de *S. schenckii* em estimularem células T *in vitro*.
- Avaliar o efeito protetor das CDs estimuladas com RNA total ou exoantígeno de *S. schenckii* quando transferidas adotivamente para animais infectados com *S. schenckii*.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Camundongos C57BL/6, fêmeas, com 6 a 14 semanas de idade, obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica - CEMIB/UNICAMP e no Biotério da FCFRP - USP. Os animais foram mantidos em mini-isoladores com temperatura, umidade, fluxo de ar e ciclo de luz claro/escuro controlado e livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética da Instituição (Protocolo CEP/FCF/CAR nº 10/2009).

2. Microorganismo e condições de cultivo

Foi utilizada amostra de *S. schenckii* 1099-18 isolada de um caso humano de esporotricose (da seção de Micologia do Departamento de Dermatologia da Columbia University, New York, NY, USA), cedida pela Dra. Celuta Sales Alviano do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. As formas de micélio foram mantidas em meio de Sabouraud em temperatura ambiente e as formas de levedura em meio BHI (Brain Heart Infusion, Difco) a 37°C sob agitação de 150 ciclos/minuto.

3. Infecção Experimental

Para a realização do ensaio de proteção, os animais foram infectados por via intravenosa com 5×10^6 de células leveduriformes diluídas em 0,1 mL de PBS (pH 7,2) estéril. As células leveduriformes foram obtidas após um dia em cultura em BHI sob rotação de 150 ciclos/minuto a 37°C. A infecção foi realizada após 7 dias da transferência adotiva de células dendríticas estimuladas com antígenos fúngicos, como descrito no item 15.

4. Obtenção dos antígenos de *S. schenckii*

4.1. Obtenção do Exoantígeno (ExoAg)

A obtenção do ExoAg do fungo foi feita de acordo com a metodologia descrita por Carlos e cols. (2003). O fungo foi cultivado em sua forma leveduriforme em meio BHI líquido com agitação constante de 150 ciclos/minuto a 37°C, foi submetido à radiação ultravioleta (UV) por uma hora. Essa suspensão celular foi mantida por 24 h a 37°C e em seguida novamente submetida à radiação UV por mais uma hora. Após o

tratamento com radiação UV, foi acrescentada solução de Timerosal (1/5000). A suspensão celular foi mantida sob agitação (150 ciclos/minuto) por 48 h. Após esse período, uma alíquota de 100 µL da solução foi plaqueada em ágar Sabouraud para controle de esterilidade da mesma. A suspensão celular foi centrifugada e o sobrenadante filtrado em membrana de éster de celulose com poros de 0,45 µm (Millipore). O filtrado obtido foi concentrado por polietilenoglicol “overnight” e as proteínas foram dosadas pelo método de Lowry (Lowry, Rosebrough *et al.*, 1951), com concentração final de 9,5 mg/mL. A citotoxicidade do exoantígeno foi testada em células murinas através do ensaio de MTT (Mosmann, 1983) e forneceu taxa de viabilidade celular maior que 80% na maior dose utilizada nos ensaios (100µg/mL).

4.2. Extração de RNA fúngico Total

Foram utilizados micélios com 7 dias de cultura em ágar Sabouraud mantido à temperatura ambiente (25°C). As leveduras foram preparadas deste mesmo micélio de 7 dias, que foi coletado e mergulhado em meio de BHI e mantido em agitação constante de 150 ciclos/minuto à 37°C por 7 dias. Depois, o meio BHI foi filtrado em gaze estéril e as leveduras coletadas.

O experimento de extração de RNA foi realizado no laboratório de Biologia Molecular da Prof. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini e o protocolo preconizado no mesmo foi obedecido. Brevemente, em tubos de polipropileno de 50 mL (Corning) foram adicionados 3,5 mL de reagente Tri (Sigma) para as leveduras e 7 mL para as hifas. Pérolas de vidro foram adicionadas e os tubos foram agitados em vortex durante 15 minutos. Permaneceram por 10 minutos em descanso à temperatura ambiente. A seguir, seguiu-se de uma centrifugação a 1600 x g por 10 minutos a 4°C e a fase superior foi transferida pra um tubo novo. Nesta etapa, o volume de reagente Tri recuperado foi anotado. Foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio para cada 0,75 mL de volumes recuperados e agitados em vortex. Após mais 10 minutos de descanso, os tubos foram centrifugados a 1600 x g por mais 15 minutos a 4°C. Novamente, a fase superior foi transferida para um novo tubo e foram adicionados o mesmo volume de Fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1)(USB). Seguiu-se de agitação cuidadosa e novamente foram deixados em repouso por mais 10 minutos e centrifugados a 1600 x g por 15 minutos a 4°C. Mais uma vez, a fase superior foi transferida para um tubo novo e foram adicionados 0,25 mL de isopropanol e 0,25 mL de solução de citrato de sódio 0,4

M e cloreto de sódio 0,8 M para cada 0,75 mL de reagente Tri recuperado inicialmente. Após agitação cuidadosa, os tubos foram deixados em repouso por 10 minutos e centrifugados a 1600 x g por 30 minutos a 4°C. Nesse momento ocorre a formação de “pellet”, que pode ser visível ou não de acordo com o rendimento da extração. Assim, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de etanol 75 % para cada 0,75 mL de reagente Tri recuperado inicialmente. Os tubos foram centrifugados a 1600 x g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” deixado secar em cabine de fluxo laminar deixado secar. Por fim, o “pellet” foi ressuspense em água bidestilada com dietil pirocarbonato (DEPC) (Amersham), alicotados e estocados a -70°C. Todo o experimento foi realizado em fluxo laminar e todas as soluções foram preparadas com água bidestilada com DEPC. O RNA foi dosado por espectrofotometria e sua integridade foi conferida através de eletroforese em gel de agarose 1,5% em cuba tratada com água com DEPC. Após 1 hora de eletroforese, 20 minutos a 80 V e 40 minutos em 120 V, o gel foi retirado da cuba e fotografados em um transiluminador acoplado a uma câmera fotográfica (INGenius Syngene Bio Imagino - SYNGENE)

5. Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método preconizado por Lowry e cols. (1951) (Lowry, Rosebrough *et al.*, 1951). Foi adicionado 100 µL das amostras em 900 µL de água MiliQ. Como padrão foi utilizado BSA (Soro albumina bovino) 0,1% em diferentes diluições em água MiliQ. A cada tubo foram adicionados 3 mL da mistura reativa (NaOH 0,1N 2% Na₂CO₃, CuSO₄x5H₂O e tartarato de sódio) e incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente adicionou-se 300 µL do reagente de Folin (Merck) em cada um dos tubos e incubou-se novamente por 30 minutos a temperatura ambiente. A leitura da absorvância foi realizada a 660 nm em espectrofotômetro (Genesys 10 uv, Thermo Electron Corporation) e as concentrações das amostras foram calculadas a partir da curva padrão de BSA. A concentração do exoantígeno foi de 9,5 mg/mL.

6. Dosagem de RNA

Uma alíquota do RNA total foi descongelada e diluída 100 vezes com água bidestilada com DEPC. Assim, foram realizadas as leituras das absorvâncias de 260 nm

e 280 nm em espectrofotômetro (Ocean Optics Chemusb4-uv/vis). As concentrações e a pureza foram calculadas por meio das seguintes fórmulas:

$$\text{Leitura 260 nm} \times 50 \text{ (fator de correção)} \times 100 \text{ (diluição)} = [\text{ng}/\mu\text{L}]$$

$$\text{Leitura 260 nm} / \text{Leitura 280 nm} = \text{pureza (ideal: 1,8 a 2,0)}$$

7. Diferenciação de CDs a partir de precursores de Medula Óssea

As CDs foram diferenciadas a partir de precursores da medula óssea isolados do fêmur e tíbia dos animais segundo protocolo preconizado por Lutz e cols. (1999), com algumas adaptações (Lutz, Kukutsch *et al.*, 1999). Após o sacrifício dos animais, o fêmur e a tíbia foram retirados e permaneceram de 3 a 5 minutos em placa de petri com álcool 70%. Em seguida, foram transferidos por duas vezes para placas de petri com meio RPMI (Sigma) incompleto, nas quais permaneceram de 3 a 5 minutos. Posteriormente, as extremidades dos ossos foram cortadas e a extração da medula óssea foi realizada injetando-se RPMI incompleto com auxílio de uma seringa. A suspensão de células, coletada em um tubo Falcon de 15 mL, foi centrifugada a 700g por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação descartou-se o sobrenadante e, a fim de realizar-se a lise de hemácias, foi adicionado 1,5 mL de tampão de lise ACK (150 mM cloreto de amônio, 1 mM bicarbonato de potássio, 0,1 mM EDTA pH 7,3) e realizada uma nova centrifugação. Novamente descartou-se o sobrenadante e, na intenção de lavar as células do tampão ACK, foram adicionados 5 mL de RPMI incompleto e realizada outra centrifugação. Terminada a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” células foi ressuspensionado em 1 mL de meio RPMI completo, contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, Sigma), 100 U/mL penicilina, 100 g/mL estreptomicina, 5 mM 2-mercaptoetanol, 1 mM piruvato de sódio (Sigma), para contagem celular em câmara de Neubauer pelo método de exclusão por trypan. Nesse momento, 20 mL de meio RPMI completo foi filtrado em filtro de seringa com porosidade de 0,20 µm (Sartorius Stedim Biotech GmgH-Germany) e 60 ng/mL de GM-CSF (BD PharMingen) e 20 ng/mL de IL-4 recombinante murino (BD PharMingen) foi adicionado. Em seguida, ajustou-se a concentração celular para 2×10^6 /mL em um volume final de 19 mL de RPMI completo contendo as citocinas GM-CSF e IL-4. Posteriormente, 18 mL dessa suspensão celular foram distribuídos em uma placa de cultura de 6 poços, com volume final de 3 mL por poço, e então incubadas em estufa a 37°C e 5% de tensão de CO₂. No dia dois foram

adicionados 3 mL de meio RPMI completo contendo GM-CSF e IL-4. No quarto dia de cultura, foram retirados 3 mL de meio e adicionou-se 3 mL de meio fresco contendo GM-CSF e IL-4. No sexto e nono dia as células foram coletadas para análise da expressão de CD11c por citometria de fluxo, descrito no item 9. As células em diferenciação foram acompanhadas quanto as modificações morfológicas através de microscopia ótica invertida (NIKON Eclipse TS100) e fotos foram tiradas através do “software” VD480 OPTMEDICAL.

Devido ao sofrimento observado no ensaio de nove dias, optou-se por realizar somente o ensaio de seis dias e ainda assim com algumas adaptações. No dia 1 realizamos a adição de 3 mL de meio RPMI completo. Nos dias dois e quatro foram retirados 3 mL e adicionados 3 mL de RPMI completo contendo GM-CSF e IL-4. Nos dias 3 e 5 foram retirados 3 mL e adicionados 3 mL de RPMI completo.

8. Transfecção de células dendríticas com RNA fúngico via lipídio catiônico DOTAP

Antes de ser adicionado à cultura, o RNA foi incubado por 20 minutos a temperatura ambiente com o lipídio catiônico N-(2,3-Dioleoyloxy-1-propyl) trimethylammonium methyl sulfate (DOTAP, Sigma), na proporção de 2 µg de DOTAP para cada 1 µg de RNA. Este foi responsável pela facilitação da entrada do RNA nas CDs. As células dendríticas foram diferenciadas como descritas no item 6. No sexto dia de cultura as células foram ou não transfectadas com RNA+Alexa Fluor 488, e a positividade de emissão de fluorescência Alexa Fluor 488 nas células dendríticas foi mensurada em citômetro de fluxo nos tempos 2, 4 e 8 horas após a transfecção. Deste modo, a emissão de fluorescência Alexa Fluor 488 por uma célula dendrítica comprova a entrada do RNA na célula e através da porcentagem de células positivas para Alexa Fluor 488 pode-se inferir a eficiência da transfecção.

8.1 Marcação do RNA com o fluorocromo Alexa Fluor 488

O RNA foi marcado de acordo com as instruções do kit de marcação ULYSIS Alexa Fluor 488 Nucleic Acid Labeling Kits (Molecular probes, Invitrogen). Brevemente, 1 µg de RNA foi precipitado com a adição de 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2) e dois volumes de etanol absoluto. Cada tubo foi levado ao freezer -70°C por 30 minutos e centrifugado por 15 minutos a 15300 x g a 4°C. O precipitado

foi lavado com etanol 70% e deixado secar em cabine de fluxo laminar. Após estar seco, o precipitado foi ressuspendido com 20 μL do componente C (5 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0). O RNA foi aquecido a 95°C por 5 minutos e colocado no gelo em seguida. Esse passo é importante para linearizar o RNA, o que aumenta a eficiência da marcação. Em seguida, foram adicionados 5 μL do componente B (DMSO) no componente A (reagente de marcação liofilizado) e adicionou-se 1 μL deste em cada tubo com 1 μg de RNA. O tubo foi incubado por 15 minutos a 90°C e a reação foi encerrada colocando-se o tubo em banho de gelo.

8.2 Preparação das colunas de purificação de RNA e purificação do RNA+Alexa Fluor 488

A purificação do RNA se faz necessária para a retirada do excesso de reagente de marcação presente no tubo, garantindo que somente RNA+Alexa Fluor 488 esteja presente no mesmo. Para isso, foram utilizadas as colunas de eluição NucAway™ Spin Columns (Ambion), as quais permitiram a recuperação do RNA e remoção de sais e nucleotídeos não incorporados. O procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, o gel seco das colunas foi direcionado para o fundo das mesmas e foi hidratado com 650 μL de água livre de RNase, vortexado e permaneceu a temperatura ambiente por 15 minutos. A coluna de purificação foi colocada em um tubo de coleta de 2 mL e centrifugada por 2 minutos a 750 x g para remover o excesso de líquido. O tubo de coleta foi descartado e a amostra do RNA marcado com Alexa Fluor 488, descrito no item acima, foi aplicada à coluna de purificação. A coluna de purificação foi colocada no tubo de eluição de 1,5 mL e centrifugada por 2 minutos a 750 x g. A amostra purificada RNA+Alexa Fluor 488 no tubo de eluição está pronta para uso.

9. Estimulação *in vitro* das CDs diferenciadas da medula

Após os seis dias de diferenciação, as células não aderentes em cultura foram coletadas, ajustadas para a concentração de $1,1 \times 10^6$ céls/mL e plaqueadas em placas de 24 ou 48 poços com volume final de 0,9 mL. Assim, essas foram estimuladas ou não com diferentes concentrações da forma leveduriforme do fungo *S. schenckii*, na proporção de 1:1 ou 1:10 (CDs:leveduras); ou com ExoAg, na concentração de 10 ou 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ou com RNA total de levedura ou hifa, na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; e

incubadas por mais 24 horas a 37°C e 5% de tensão CO₂. Como controle positivo, foi utilizado LPS (Sigma) na concentração de 1 e 10 µg/mL. Os volumes finais dos poços foram de 1 mL e a concentração final foi de 1x10⁶ céls/mL. Duas horas após a adição das células leveduriformes, foi adicionado ao poço solução de Anfotericina β (Sigma) a 2,5 µg/mL com o intuito de inibir o crescimento fúngico.

Após o período de incubação de 24 horas, as células foram coletadas e centrifugadas por 10 minutos a 405 x g. O sobrenadante foi coletado para posterior dosagem de citocinas pelo método de ELISA, de acordo com protocolo do fabricante, descrito no item 13. As células foram utilizadas para análise da expressão de marcadores de ativação, como descrito abaixo no item 10, ou para o ensaio de cocultura, como descrito no item 12.

10. Análise da expressão de receptores de superfície por citometria de fluxo

Para a análise de marcadores específicos de CDs e linfócitos T, foram pesquisadas a maturação fenotípica de CDs, analisando-se a expressão de CD11c, MHCII, CD80 e CD86, após o período de incubação com os diferentes antígenos fúngicos (item 9). No ensaio de proteção, foi analisada a expressão de CD4, CD8, CD44 e CD62L, com o intuito de avaliar a ativação de linfócitos T CD4 e CD8, após tratamento e infecção por *S. schenckii*, descrito no item 15. Tanto CDs quanto células totais do baço foram coletadas, contadas e distribuídas em tubos FACS (BD PharMingen, San Diego, USA), na concentração de 0,5-1x10⁶ células por tubo para realização da análise fenotípica das mesmas. Para o bloqueio das ligações inespecíficas, as células foram incubadas por 30 minutos a 4°C com anticorpo anti-CD16/CD32 (Fc Block™ – BD PharMingen), na concentração de 0,5 µg/5x10⁵ células. Posteriormente, foram adicionados os anticorpos monoclonais de interesse: CD11c (clone: HL3), CD80 (clone: 16-10a1), CD86 (clone: GL1), MHCII (clone: AF6-120.1), CD4, CD8, CD44 e CD62L, na concentração de 0,2 – 0,5 µg de anticorpo/5x10⁵ células, seguido de nova incubação de 30 minutos a 4°C. Após esse período de incubação, foram adicionados 2 mL de PBS (solução salina tamponada de fosfatos) pH 7,2 contendo 2% SFB e as células foram centrifugadas a 700 x g por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 500 µL de PBS 2% SFB. Trinta mil eventos por tubo foram adquiridos em citômetro FACSCanto™ (Becton & Dickinson, San Diego, CA, USA) e analisados pelo programa FACSDiva™. Todos

os anticorpos foram adquiridos da BD PharMingen (BD PharMingen, San Diego, USA) e usados seguindo-se as instruções do fabricante. Os anticorpos foram marcados com FITC (isotiocianato de fluoresceína), PE (ficoeritrina) e PE-Cy-5.

11. Obtenção de linfócitos T para o ensaio de co-cultura

Para a realização do ensaio de co-cultura, os animais foram previamente infectados por via intravenosa com injeção de 100 μ L de uma suspensão celular de PBS pH 7,2 + levedura na concentração de 1×10^7 células leveduriformes, 14 dias antes da obtenção dos linfócitos para realização do ensaio de co-cultura. No dia do ensaio, os animais foram sacrificados e os baços retirados de forma estéril e colocados em um placa de petri contendo 2 mL de meio RPMI incompleto. Então, o órgão foi macerado com o auxílio de pinças estéreis e as células foram liberadas no meio. Neste momento, o meio foi retirado, transferido para um tubo Falcon de 15 mL e centrifugado a $405 \times g$ por 10 minutos a 4°C . As células foram centrifugadas novamente com 1,5 mL tampão de lise ACK e lavadas com 5 mL de RPMI completo. Terminada a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de RPMI completo para contagem em câmara de Neubauer pelo método de exclusão por trypan. As células foram ajustadas para uma concentração final de 2×10^6 células/mL em um volume final de 40 mL. Essas foram cultivadas por 2 horas a 37°C e 5% de tensão CO_2 em placas de 6 poços em um volume de 3 mL por poço, no total de 12 poços. As células não aderentes foram coletadas, centrifugadas a $405 \times g$ por 10 minutos a 22°C , ressuspensas em 1 mL para contagem e ajustadas às concentrações necessárias ao ensaio de co-cultura.

12. Ensaio de co-cultura

As CDs foram diferenciadas e estimuladas como descrito nos itens 3.7 e 3.9, respectivamente. Após o período de incubação de 24 horas, as células dendríticas foram coletadas e centrifugadas por 10 minutos a $405 \times g$. Simultaneamente, os linfócitos foram obtidos como descrito no item 11. Os linfócitos foram provenientes de animais primados, ou seja, que já haviam entrado em contato com o fungo *S. schenckii*. Após as lavagens, os linfócitos foram adicionados em concentrações diferentes, estabelecendo-se razões de 1:1, 1:4 e 1:9 para CD:LT (linfócitos totais) em placas de 96 poços. As células permaneceram em cultura durante 72 horas a 37°C e 5% de tensão CO_2 . No ensaio de

co-cultura das CDs estimuladas com o antígeno RNA total, as células permaneceram em cultura por 48 horas e 72 horas com linfócitos totais, na proporção única de 1:9 (CD:LT). Após esse período, as placas foram centrifugadas a 2600 x g por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi coletado, transferido para uma nova placa de 96 poços e congelado a -20 °C. A ativação dos linfócitos pelas CDs foi analisada pela produção das citocinas IL-17, IFN- γ , IL-4 por meio do teste imunoenzimático ELISA, descrito abaixo no item 13.

13. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção da produção de citocinas

As citocinas IL-12 (BD PharMingen), IL-6 (BD PharMingen), IL-10 (BD PharMingen), TGF- β (BD PharMingen), IL-23 (e-Bioscience), IFN- γ (BD PharMingen), IL-4 (BD PharMingen) e IL-17 (e-Bioscience) foram detectadas pelo método de ELISA, de acordo com protocolo do fabricante. Basicamente, placas de 96 poços (Corning, NY, USA) foram recobertas com 100 μ L/poço de solução contendo anticorpos purificados de captura, diluídos em tampão apropriado. As placas foram incubadas a 4°C, durante uma noite. Após a incubação, foram realizadas 3 lavagens com solução PBS-Tween 20 (0,05%) e as placas foram incubadas com 200 μ L/poço de solução de bloqueio (PBS contendo 10% SFB) durante uma hora a temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas por 3 vezes e adicionou-se o padrão e 100 μ L/poço das amostras (sobrenadante). As placas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, as placas foram lavadas por 5 vezes e incubadas com 100 μ L/poço do “working detector” (anticorpo biotilado mais Sav- β -HRP) por 1 hora a temperatura ambiente. Novamente as placas foram lavadas, desta vez por 7 vezes, e foram adicionados 100 μ L/poço da solução do substrato. Desta vez, as placas foram incubadas sob proteção da luz durante 30 minutos. Após o tempo determinado a reação foi interrompida com a adição de 50 μ L/poço da solução de parada (H₂SO₄ 2N). A absorvância foi lida a 450 nm em um leitor de microplaca (Multiskan Ascent, Labsystems) e as concentrações das citocinas foram calculadas pela curva padrão das concentrações conhecidas das citocinas em questão. Os resultados foram expressos em pg/mL.

14. Avaliação intracelular da citocina TGF- β por citometria de fluxo

A suspensão de CDs estimuladas destinadas à detecção da citocina intracitoplasmática TGF- β foi distribuída em uma placa de 24 cavidades (10^6 cels/mL). Parte destas células foi estimulada com 25 ng/mL de forbol miristato acetato (PMA) (Sigma) e 1 μ g/mL de ionomicina (Sigma), e a outra parte não recebeu estímulo. As células foram incubadas por 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂, por 4 horas. Em seguida, foi adicionado 10 μ g /mL de brefeldina A (Sigma) a todas as cavidades e a placa foi incubada, nas mesmas condições de temperatura e tensão de CO₂, por mais duas horas. A brefeldina A foi utilizada para melhorar a análise das citocinas intracelulares devido ao seu efeito inibitório na secreção de proteínas, o que permite um acúmulo das citocinas no complexo de Golgi e conseqüentemente um aumento do sinal detectado pelo citômetro de fluxo. Ao final do período total de seis horas de incubação, as suspensões de células foram lavadas a 350 x g por 5 minutos e ressuspensas em PBS 1% de BSA. Foi adicionada às suspensões celulares 1 μ L da solução Mouse FcBlock (BD PharMingen) e as células foram incubadas a 4°C por 20 minutos. Terminada esta incubação, as células foram distribuídas nos respectivos tubos de citometria e iniciou-se a marcação das moléculas de superfície.

Para isto, foi adicionado o anticorpo anti-CD11c (FITC), com posterior incubação por 30 minutos, a 4°C e ao abrigo da luz. Em seguida as células foram lavadas duas vezes com BSA a 1% em PBS a 350 x g por 5 minutos e ressuspensas em solução CytoFix / CytoPerm (BD PharMingen), a fim de proporcionar-se a fixação e permeabilização das células. Após uma incubação de 20 minutos a 4°C ao abrigo da luz, as células foram lavadas com o tampão Perm Wash (BD PharMingen). As células foram ressuspensas em 50 μ L de Perm Wash e então foram adicionados os anticorpos citocina-específico anti-TGF- β (PE) ou o anticorpo monoclonal isotipo-controle. Seguiu-se nova incubação a 4°C e ao abrigo da luz por um período de 30 minutos. As células foram lavadas duas vezes com Perm Wash, ressuspensas com BSA a 1% em PBS e mantidas a 4°C ao abrigo da luz até o momento da análise no citômetro de fluxo. Trinta mil eventos por tubo foram adquiridos em citômetro FACSCanto™ (Becton & Dickinson, San Diego, CA, USA) e analisados pelo programa FACSDiva™.

15. Ensaio de proteção

O ensaio de proteção foi realizado utilizando-se os seguintes grupos de animais:

Grupo 1 – animais infectados com *S. schenckii*.

Grupo 2 – grupo com transferência adotiva de CDs não estimuladas e infectados com *S. schenckii*.

Grupo 3 – grupo com transferência adotiva de CDs estimuladas com 10 µg/mL de RNA de hifa do *S. schenckii* e infectados.

Grupo 4 - grupo com transferência adotiva de CDs estimuladas com 10 µg/mL de RNA de levedura de *S. schenckii* e infectados.

Grupo 5 - grupo com transferência adotiva de CDs estimuladas com exoantígeno do *S. schenckii* na concentração de 10 µg/mL(Exo10) e infectados.

Grupo 6 - grupo com transferência adotiva de CDs estimuladas com exoantígeno do *S. schenckii* na concentração de 100 µg/mL(Exo100) e infectados.

Camundongos C57BL/6, com aproximadamente 6-8 semanas de idade, receberam via subcutânea $3-5 \cdot 10^5$ células dendríticas estimuladas ou não com antígenos fúngicos. Sete dias após a transferência adotiva de CDs, os animais foram infectados via intravenosa com $5 \cdot 10^6$ de células leveduriformes do fungo *S. schenckii*. Duas semanas após o desafio, os animais foram sacrificados e o possível efeito profilático foi avaliado através de três parâmetros: recuperação de unidades formadoras de colônia no baço destes animais (UFC); histologia do baço desses animais; e análise do perfil de expressão dos marcadores de ativação CD44 e CD62L em linfócitos T CD4 e CD8.

15.1. Detecção de marcadores de ativação CD44 e CD62L em linfócitos T CD4 e CD8

Após os animais serem sacrificados, os baços foram retirados de forma estéril e colocados em um placa de petri contendo 2 mL de meio RPMI incompleto. Então, o órgão foi macerado com o auxílio de pinças estéreis e as células foram liberadas no meio. Após centrifugação em tubo Falcon de 15 mL a 405 x g por 10 minutos a 4 °C, as células foram ressuspendidas e centrifugadas novamente com 1,5 mL tampão de lise ACK e lavadas com 5 mL de RPMI completo. Terminada a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 1 mL de RPMI completo para contagem em câmara de Neubauer pelo método de exclusão por trypan. As células foram ajustadas a uma concentração final de $0,5-1 \cdot 10^6$ células/mL e colocadas em tubos FACS com volume final de 1 mL por tubo. A partir daí, avaliamos a

expressão dos marcadores de ativação CD44 e CD62L em linfócitos T CD4 e CD8, como descrito no item 10.

15.2. Unidade Formadora de Colônia (UFC)

A determinação da UFC foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Maia e cols., 2006. Após o sacrifício dos animais, o baço foi retirado, pesado e macerado em 2 mL de meio RPMI incompleto. Uma alíquota de 100 μ L de cada amostra foi utilizada para este ensaio. Diluições seriadas de 10^2 , 10^3 e 10^4 foram realizadas e plaqueadas em BHI ágar por 7 dias a 37°C. Após 7 dias, todas as colônias em todas as diluições foram contadas e uma carga fúngica foi calculada de acordo com o peso inicial dos baços.

15.3. Histologia do baço

Animais infectados e tratados como descrito acima, tiveram o baço congelado em meio próprio (Jung Tissue Freezing) para posterior realização dos cortes histológicos. Os baços foram mantidos a -20°C e os cortes foram realizados em um criostato (Leica CM 1850) na mesma temperatura. Após o corte, foram aderidos em lâminas previamente siliconizadas e fixados em acetona a -20°C por aproximadamente um minuto. Para a melhor visualização dos fungos no órgão, os baços foram corados pelo método Gomori nitrato de prata modificado para fungos (Grocott, 1955). A coloração foi realizada pelo laboratório IPC de Araraquara, seguindo-se as instruções do kit da Easy Path. Brevemente, o ácido crômico foi adicionado na quantidade suficiente para cobrir o corte e esperou-se 10 minutos. A seguir, a lâmina foi lavada em água corrente por três minutos e depois seca. Adicionou-se solução de bissulfito e esperou-se 30 segundos. A lâmina foi lavada em água corrente, depois água destilada e seca. Uma solução de água destilada (40 mL), solução de metanamina + nitrato de prata (40 gotas), e Bórax (20 gotas), foi preparada e colocada junto com as lâminas dentro de uma cuba de Coplin, que permaneceu de 25 a 50 minutos em estufa a 70°C. Assim que o corte adquiriu uma coloração caramelo a lâmina foi lavada com água destilada e seca. Depois, foi coberto com solução de cloreto de ouro por um minuto. Novamente a lâmina foi lavada em água corrente e seca. A lâmina foi coberta com solução de hipossulfito e, após um minuto, lavada como anteriormente. Por último, foi adicionado solução de verde luz por 20 segundos e lavou-se a lâmina rapidamente em água corrente. Após

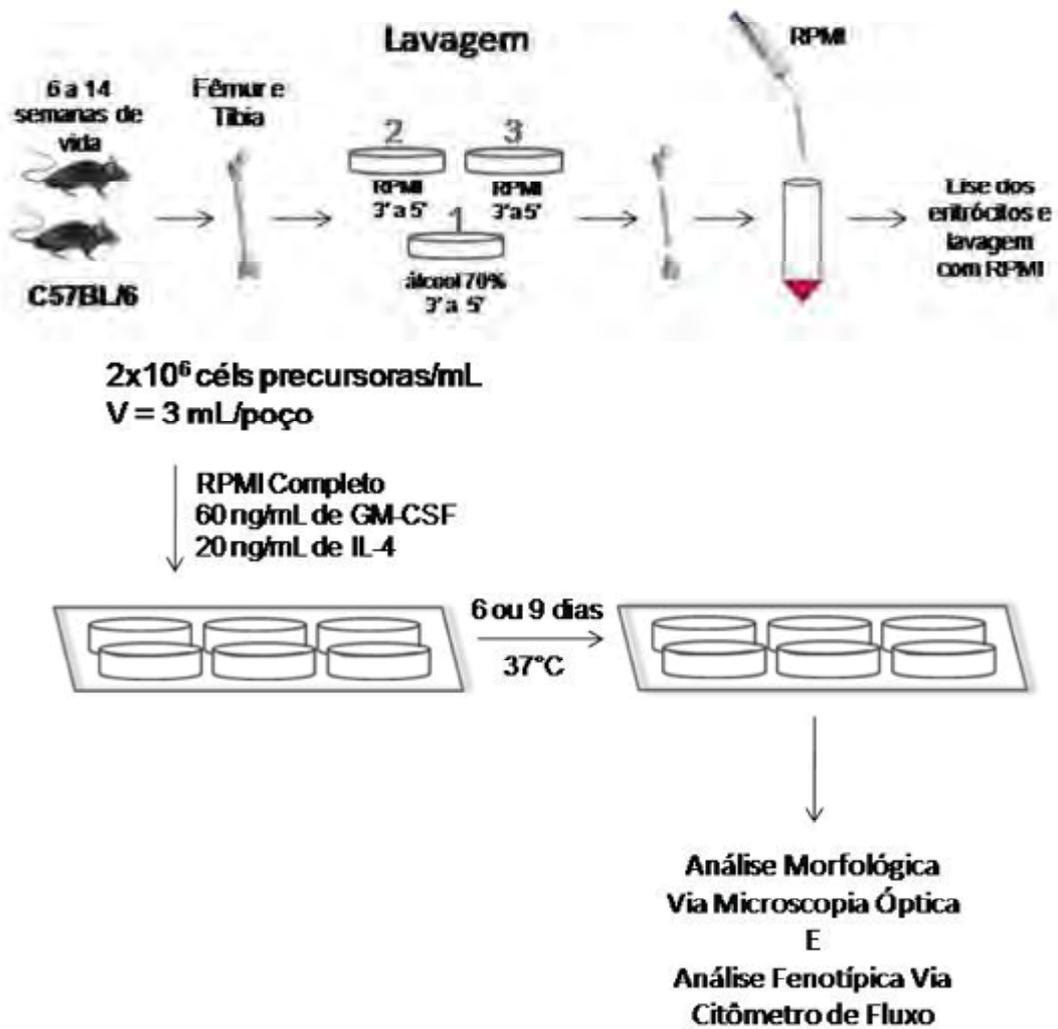
secar, a lâmina foi desidratada com álcool ascendente até o xilol e montada com ERV-MOUNT. As lâminas foram analisadas em microscopia óptica (NIKON Eclipse E200) e as fotos foram capturadas através do “software” VD480 OPTMEDICAL.

16. Análise Estatística

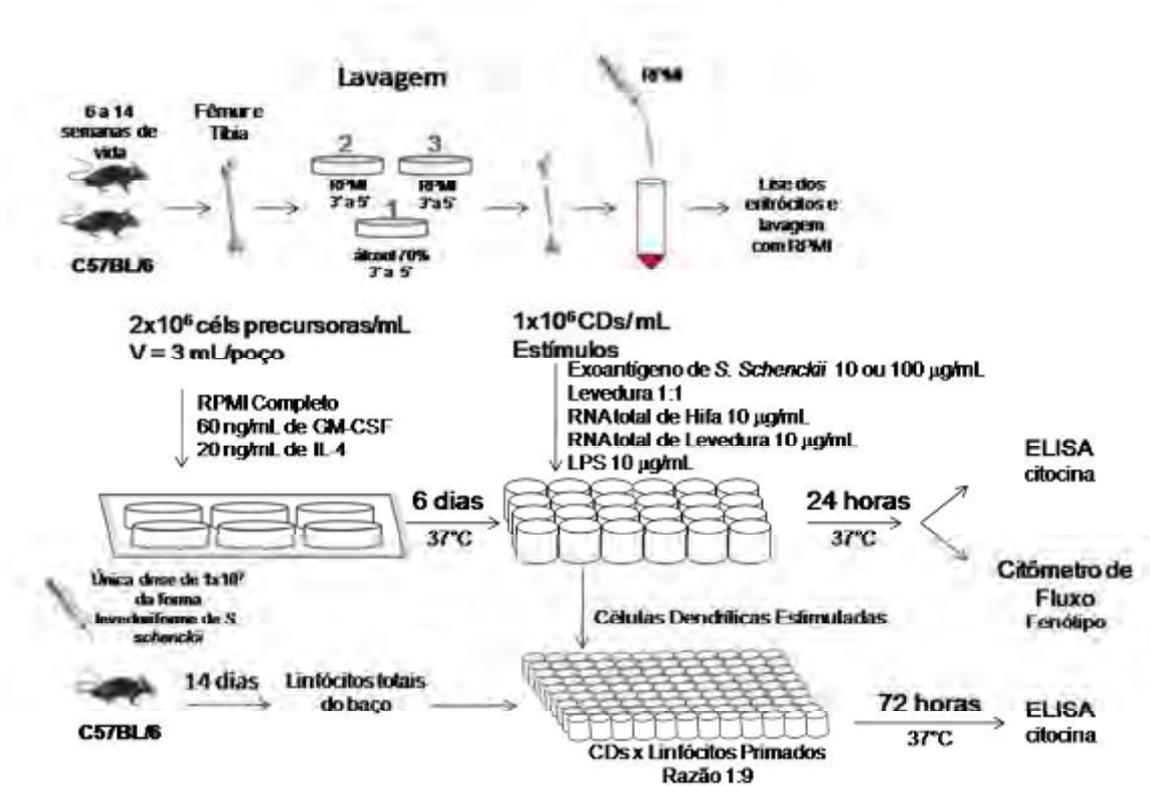
Para realização da análise estatística foi utilizado o programa Graph Prism 5.0. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste Tukey para comparar os dados entre os diferentes grupos experimentais. Foram considerados significativos os valores com $p < 0,05$.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

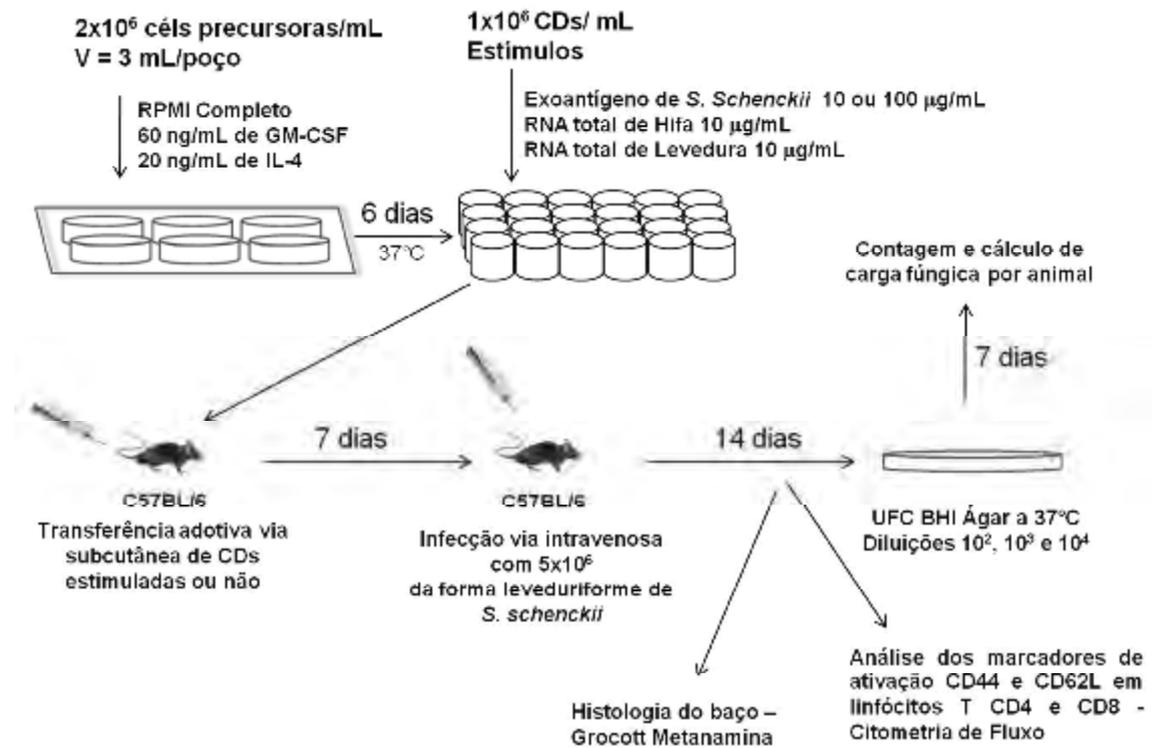
1. Obtenção e diferenciação de CDs a partir de precursores de Medula Óssea



2. Análise fenotípica e funcional das CDs estimuladas ou não com *S. schenckii* ou antígenos fúngicos e co-cultura dessas com Linfócitos totais de baço de animais primados.



3. Ensaio de proteção



RESULTADOS

1. Diferenciação de CDs a partir de precursores derivados da medula óssea.

1.1 Alterações morfológicas das células em diferenciação

Inicialmente foram analisadas as características morfológicas das CDs durante o período de diferenciação com o auxílio do microscópio óptico invertido. No primeiro dia de cultura (dia zero), as células cultivadas em meio RPMI completo apresentaram tamanho pequeno com aspecto morfológico arredondado e superfície lisa, característico de células precursoras indiferenciadas (figura 1 A). As alterações morfológicas foram melhor visualizadas a partir do terceiro dia de cultura, no qual as células em diferenciação apresentavam aspecto alongado e alguns dendritos expandidos (figura 1 C e D). Neste dia também foram observadas células com maior tamanho, superfície rugosa e presença de protuberâncias similares aos dendritos característicos de CDs (figura 1 C e D). No sexto dia de diferenciação, as células já haviam adquirido o aspecto morfológico característico de células dendríticas, com o aspecto estelar típico e grande tamanho (figura 1 E e F). No nono dia de cultura, apesar das células ainda apresentarem aspecto morfológico característico de CDs (figura 1 G), o aspecto vacuolizado das células ao nono dia demonstrava o sofrimento das mesmas (figura 1 G).

1.2. Avaliação da expressão da molécula CD11c na superfície das células diferenciadas da medula óssea

Além da análise morfológica, foram avaliados também o rendimento e o fenótipo das células nos dias seis e nove de cultura na presença de GM-CSF e IL-4. Na figura 2, foram observados que no sexto dia de diferenciação aproximadamente 80% das células em cultura expressavam o marcador de superfície característico de CDs, CD11c. A porcentagem de células CD11c⁺ aumentou significativamente no nono dia de diferenciação, no qual aproximadamente 90% das células expressavam a molécula de CD11c em sua superfície (figura 2). Entretanto, foi observado pelo método de exclusão por azul de trypan, que o número de células viáveis no sexto dia de diferenciação foi maior quando comparado ao número de células viáveis obtidas no nono dia de diferenciação (Dados não mostrados).

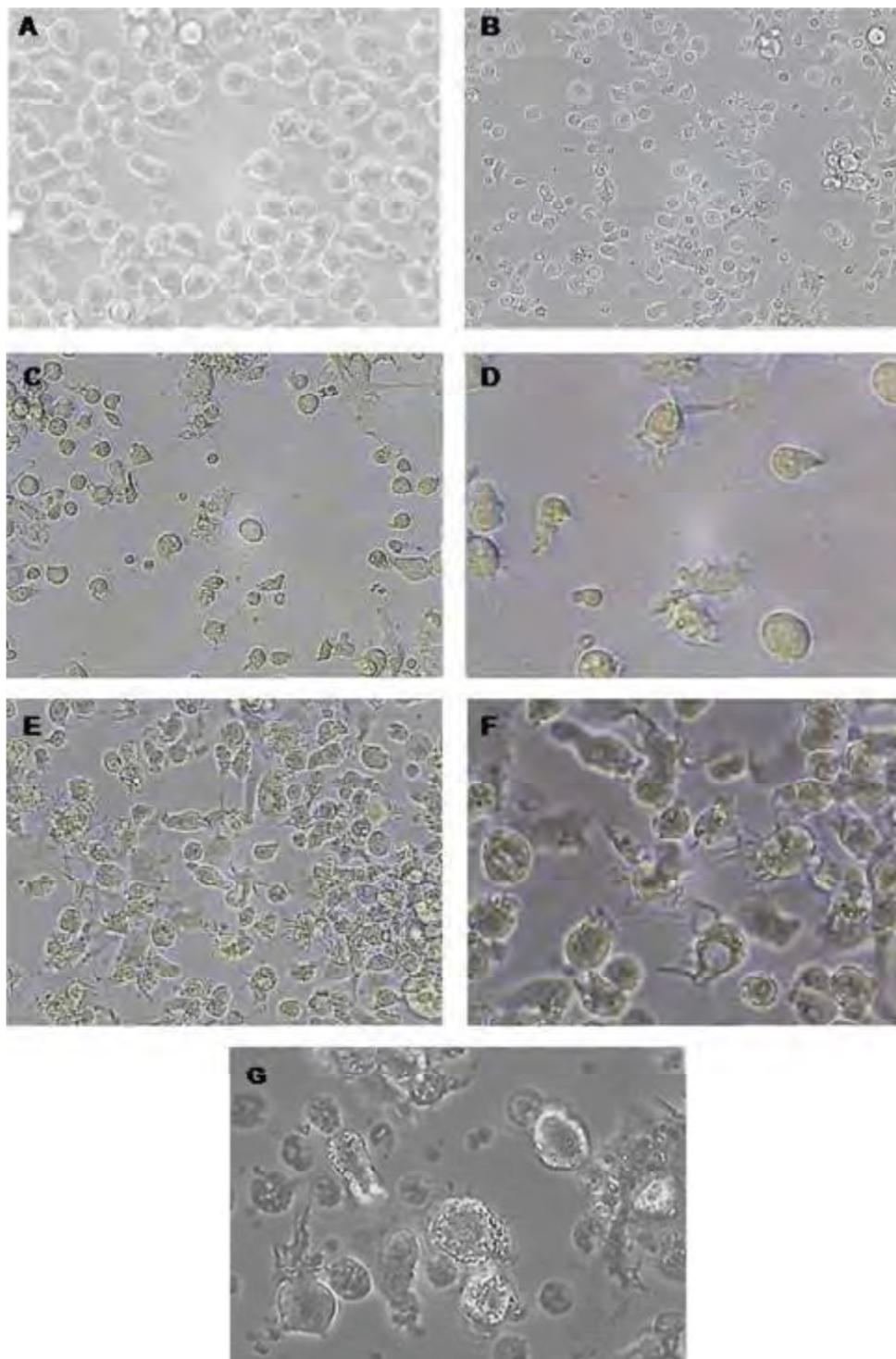


Figura 1: Diferenciação de CDs a partir de precursores da medula óssea de camundongos C57BL/6. O fêmur e a tíbia foram retirados para extração de células da medula óssea. As células precursoras foram plaqueadas na concentração de 2×10^6 células/mL em meio RPMI completo suplementado com as citocinas recombinantes GM-CSF e IL-4, e cultivadas a 37°C durante nove dias. A captura de imagens foi realizada com auxílio do “software” VD480 OPTMEDICAL acoplado ao microscópio óptico invertido (NIKON Eclipse TS100), nos dias zero (A), um (B), três (C e D), seis (E e F) e nove (G) de cultura. Aumento de 200x nas figuras B, C e E; aumento de 400x nas figuras A, D e F.

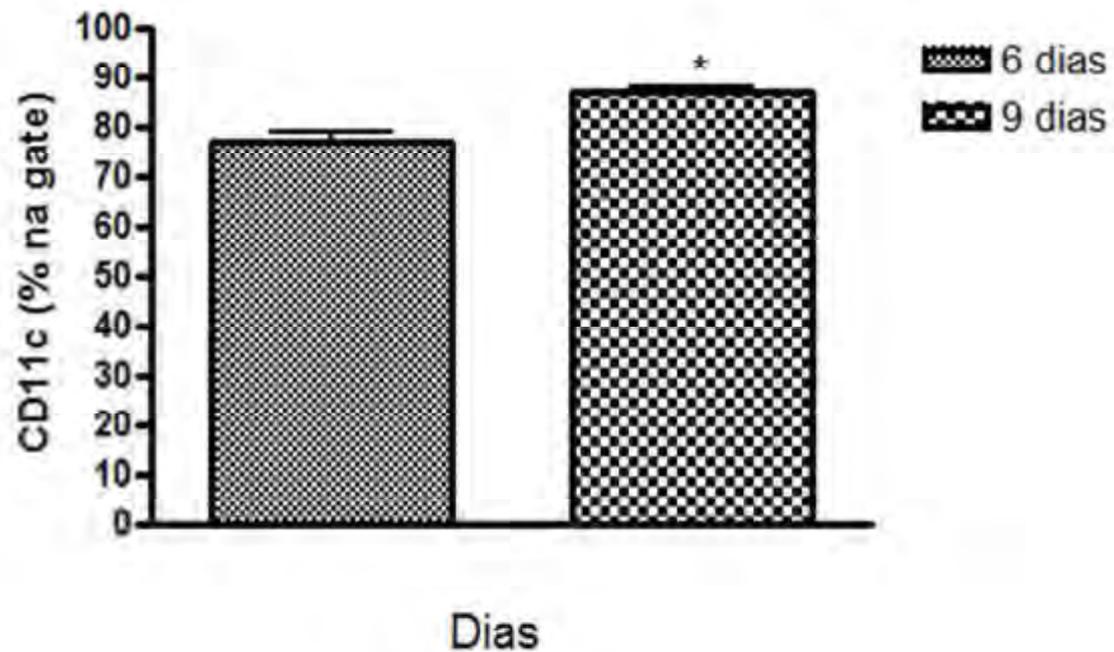


Figura 2: Avaliação da porcentagem de células CD11c⁺ em diferentes períodos de cultura na presença de GM-CSF e IL-4. As células precursoras da medula óssea foram plaqueadas na concentração de 2×10^6 células/mL em meio RPMI completo suplementado com as citocinas recombinantes GM-CSF e IL-4, e cultivadas a 37° C durante nove dias. Nos dias seis e nove, as células não aderentes foram coletadas para posterior análise por citometria de fluxo. Aproximadamente 5×10^5 células foram marcadas com anticorpos anti-CD11c conjugado com FITC e analisadas quanto a porcentagem de CDs que expressavam a molécula de superfície CD11c. O resultado é a média de três experimentos independentes. Os valores estão apresentados como médias \pm SEM. Os asteriscos indicam comparações estatísticas entre os dias: * $p < 0,05$ quando comparado ao sexto dia de diferenciação.

2. Avaliação do RNA total das formas leveduriforme e miceliar do fungo *S. schenckii*

Após extração do RNA, as amostras foram avaliadas em gel de eletroforese 1,5%, para confirmação da integridade das mesmas. O gel de RNA total possui a característica de apresentar duas bandas bem evidentes e um rastro. A fotografia confirmou a integridade das amostras, que permitem apenas a identificação das duas subunidades do RNA ribossomal, 18S e 28S (figura 3). Os cálculos de pureza foram realizados e as amostras ficaram entre os valores ideais 1,8 e 2.

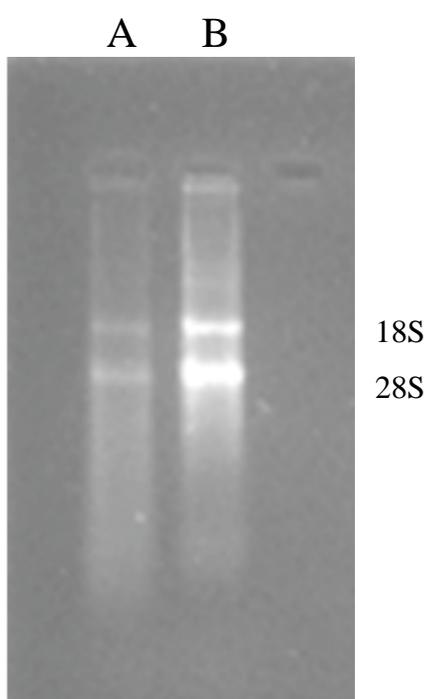


Figura 3: Avaliação da integridade do RNA total das formas leveduriformes e miceliar do fungo *S. schenckii*. Após a extração do RNA total das formas leveduriformes e miceliar do fungo, foi realizada uma eletroforese em gel 1,5% em cuba tratada previamente com água DEPC. A canaleta (A) representa o RNA total da forma miceliar e a canaleta (B) representa o RNA total da forma leveduriforme. Foto representativa de duas extrações independentes.

2.1. Eficiência da transfecção do RNA fúngico nas células dendríticas com o lipídio catiônico DOTAP

Após a marcação da amostra de RNA total com o fluorocromo Alexa Fluor 488, esse foi transfectado com o auxílio do lipídio catiônico DOTAP (Sigma) nas CDs e foi analisada a emissão de fluorescência Alexa Fluor 488 por citometria de fluxo nos tempos 2, 4 e 8 horas após a transfecção, descrito em materiais e métodos no item 8. Observou-se que as CDs transfectadas demonstraram alta positividade para o fluorocromo Alexa Fluor 488, observada em todos os tempos de cultura (figura 4 A e B). Apesar da quantidade de células positivas para o fluorocromo Alexa Fluor 488 não ter se alterado muito entre os tempos, com leve aumento observado, quando foi analisada a intensidade de fluorescência mediana (MIF), foi visualizado um aumento significativo para o tempo de 8 horas com relação aos demais tempos e para o tempo de 4 horas com relação ao tempo de 2 horas (figura 4 B). Esse aumento demonstra que o RNA continua sendo incorporado às CDs durante os períodos analisados, apesar de não haver um aumento significativo do número de células positivas entre os tempos.

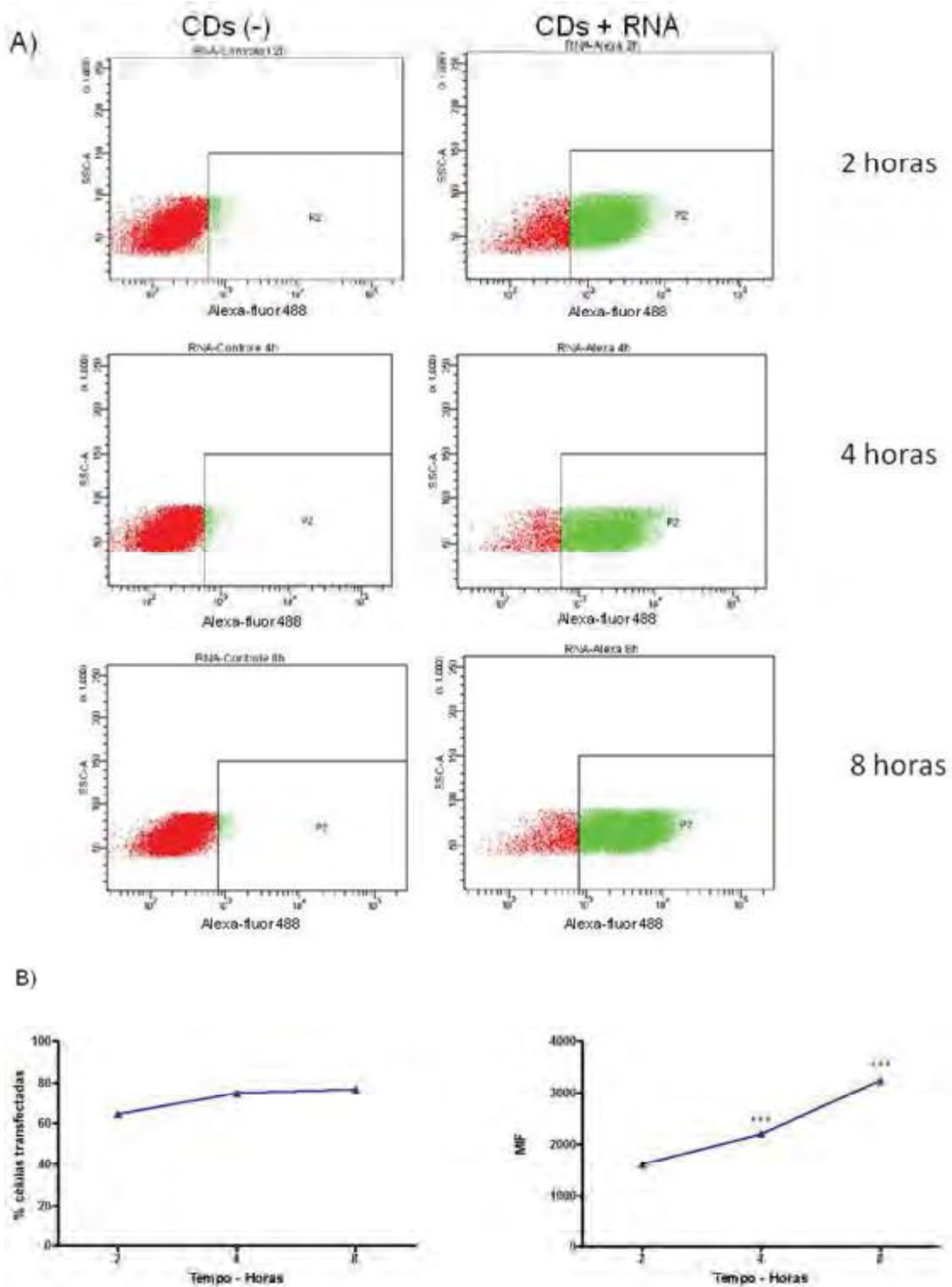


Figura 4: Avaliação da emissão do fluorocromo Alexa Fluor 488 pelas CDs transfetadas com RNA marcado. A) DotPlots que demonstram a emissão de fluorescência pelas CDs controle e CDs transfetadas nos tempos 2, 4 e 8 horas após a transfecção. B) Análise comparativa da % de células positivas para a emissão de fluorescência e mediana da intensidade de fluorescência (MIF) nos tempos 2, 4 e 8 horas após a transfecção. O resultado é representativo de dois experimentos independentes. Os asteriscos indicam comparações estatísticas entre os tempos: *** $p < 0,001$ quando comparado ao tempo anterior.

3. Alterações fenotípicas das CDs após estimulação.

3.1. Expressão dos marcadores de maturação MHCII, CD80 e CD86 nas CDs após estimulação com as formas leveduriformes ou o ExoAg do fungo *S. schenckii*

Nesta etapa, as CDs diferenciadas foram coletadas e estimuladas com 10 ou 100 µg/mL de ExoAg; ou com as formas leveduriformes na proporção de 1:1 e 1:10 (CDs:levedura); ou com 1 µg/mL de LPS; ou não estimuladas. Após 24 horas da adição do estímulo, as células foram coletadas e marcadas com anticorpos específicos para as CDs, CD11c, e seus marcadores de maturação MHCII (I-A[b]), CD80 e CD86 para avaliação do fenótipo de ativação no citômetro de fluxo. No citômetro, as células foram selecionadas de acordo com a expressão positiva para CD11c e assim avaliadas quanto a expressão de MHCII, CD80 e CD86 (figura 5).

Com relação à molécula CD11c, foi observado que as células que não foram estimuladas, grupo RPMI, apresentaram aproximadamente 62% das células com expressão positiva de CD11c na superfície celular (figura 6 A). Por sua vez, o grupo de células que foram estimuladas com LPS, grupo LPS, não apresentou aumento significativo na porcentagem de células CD11c⁺ em relação aos demais grupos. De todos os estímulos, apenas as células leveduriformes na proporção 1:10, grupo 1:10, foram capazes de aumentar significativamente a expressão de CD11c quando comparadas ao grupo RPMI (figura 6 A). Esse mesmo grupo também apresentou aumento significativo quando comparado ao grupo de estímulo de células leveduriformes na proporção 1:1, grupo 1:1 (figura 6 A).

Analisando a população de células CD11c⁺, foi observado que a expressão da molécula de MHC-II teve uma modulação positiva em todos os grupos de estímulo quando comparados ao grupo RPMI (figura 6 B), não havendo aumento significativo apenas para o grupo Exo100. Essa modulação positiva foi expressa pelo aumento na % de células MHCII positivas. Diferentemente do que foi encontrado na expressão de CD11c, o grupo 1:1 foi mais eficiente em estimular a expressão da molécula de MHC-II que o grupo 1:10 (figura 6 B). O mesmo pode ser visto nos grupos estimulados pelo ExoAg, no qual as culturas que receberam 10 µg/mL de ExoAg, grupo Exo10, apresentaram um aumento significativo na expressão da molécula de MHC-II quando comparadas ao grupo que recebeu 100 µg/mL do mesmo, grupo Exo100 (figura 6 B).

Analisando a expressão da molécula co-estimuladora CD80, foi observado novamente um aumento em todos os grupos de estímulo quando comparados ao grupo

RPMI, não havendo um aumento significativo somente para os grupos 1:1 e 1:10 (figura 6 C). Esse aumento foi expresso pelo aumento na % de células CD80 positivas. De maneira semelhante, a expressão da molécula CD86 também aumentou significativamente em todos os grupos, exceto no grupo Exo10 (figura 6 D). Esse aumento foi expresso pelo aumento na % de células CD86 positivas.

Esses resultados sugerem a maturação das CDs estimuladas tanto com a levedura quanto com o exoantígeno do fungo *S. schenckii*.

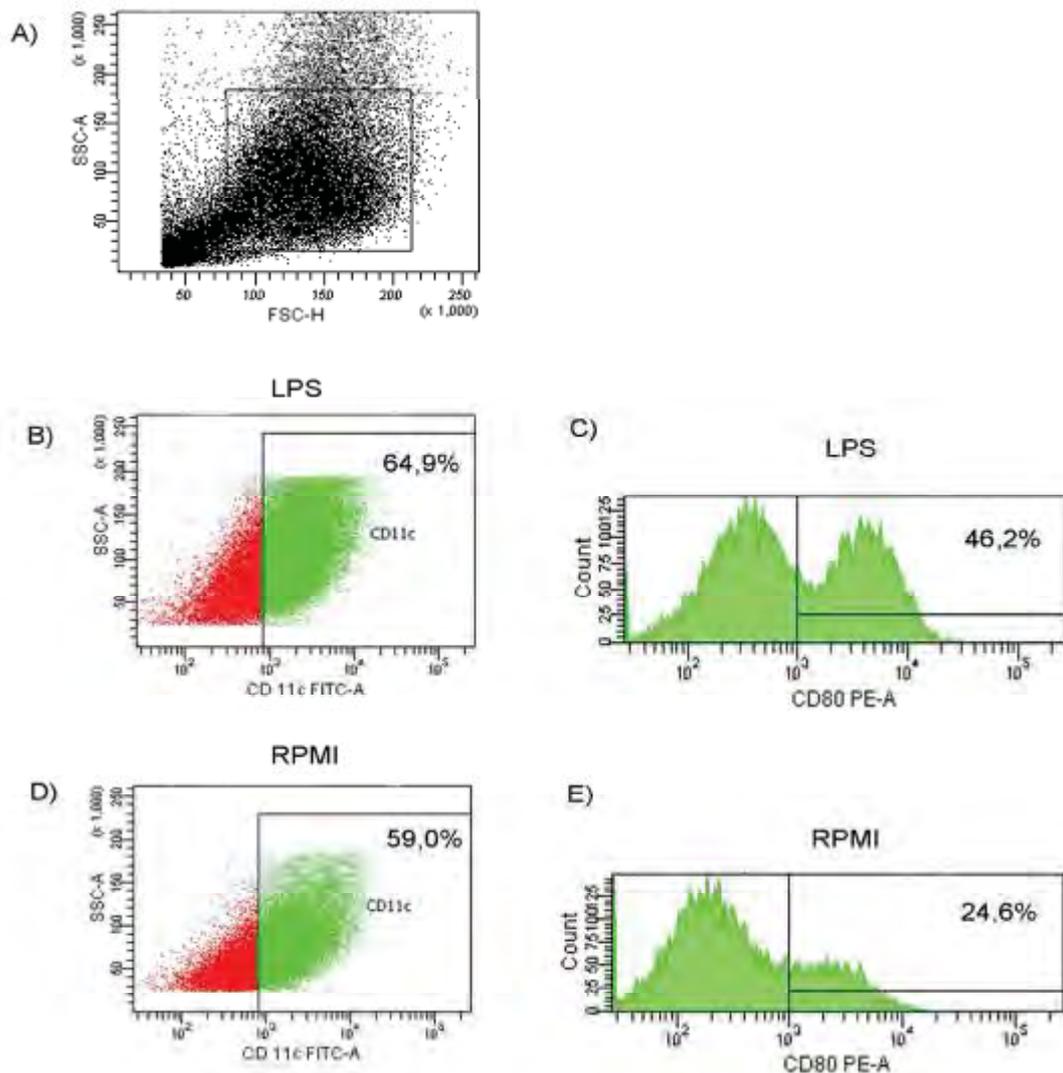


Figura 5: Representação referente à avaliação no citômetro de fluxo da expressão de marcadores de maturação de CDs após 24hs da adição dos estímulos. Após seis dias de diferenciação, as CDs foram estimuladas com as formas leveduriformes na proporção de 1:1 ou 1:10 (CD:levedura), ou com ExoAg nas concentrações de 10 ou 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ou LPS na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ou não estimuladas, por 24 horas a 37° C. As células foram coletadas e marcadas com anticorpos anti-CD11c, anti- MHC-II (I-A[b]), anti-CD80 e anti-CD86 para análise do fenótipo de maturação por citometria de fluxo. A) As células foram analisadas quanto ao tamanho e granulosidade e a população de CDs foi delimitada como mostrado na gate 1. B) Dotplot do gate 1 que demonstra a % de células positivas para CD11c quando estimuladas com LPS. C) Histograma das células CD11c⁺ que expressam CD80 quando estimuladas com LPS. D) Dotplot do gate 1 que demonstra a % de células positivas para CD11c quando não estimuladas. E) Histograma das células CD11c⁺ que expressam CD80 quando não estimuladas. O resultado é representativo de três experimentos independentes.

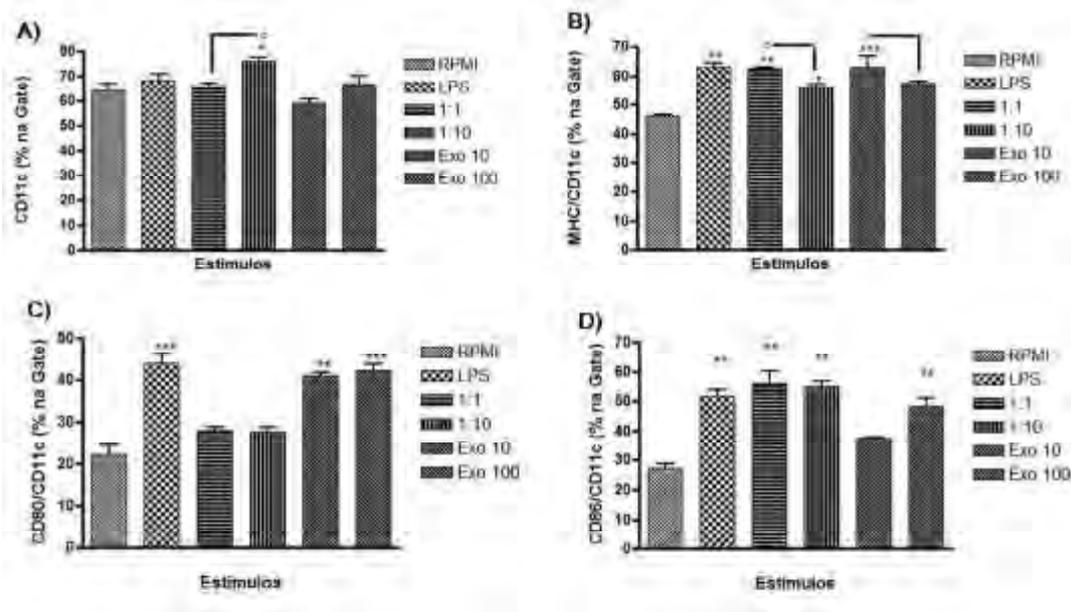


Figura 6: Expressão dos marcadores de CDs, CD11c, e marcadores de maturação MHCII, CD80 e CD86 nas CDs após estimulação com as formas leveduriformes ou o ExoAg do fungo *S. schenckii*. Após seis dias de diferenciação, as CDs foram estimuladas com as formas leveduriformes na proporção de 1:1 ou 1:10 (CD:levedura), ou com ExoAg nas concentrações de 10 ou 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ou LPS na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ou não estimuladas, por 24 horas a 37 $^{\circ}$ C. As células foram coletadas e marcadas com anticorpos anti-CD11c, anti-CD80, anti-CD86 e anti-MHC-II para análise do fenótipo de maturação por citometria de fluxo. A) As CDs foram avaliadas quanto a expressão da molécula CD11c após estimulação. Células CD11c $^{+}$ foram selecionadas e analisadas quanto à expressão de MHC-II (B), CD80 (C) e CD86 (D). Os resultados são representativos de três experimentos independentes. Os valores estão apresentados como médias \pm SEM. Os asteriscos indicam comparações estatísticas entre os grupos de estímulos e o grupo RPMI: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os círculos abertos indicam comparações estatísticas entre os grupos 1:1/1:10 e Exo10/Exo100: $^{\circ}p < 0,05$.

3.2. Expressão dos marcadores de maturação MHCII, CD80 e CD86 nas CDs após estimulação com RNA total de hifa ou levedura do fungo *S. schenckii*.

Nesta etapa, as CDs diferenciadas foram coletadas e estimuladas com 2 ou 10 µg/mL de RNA total de levedura ou RNA total de hifa; ou com 10 µg/mL de LPS; ou não estimuladas. Após 24 horas da adição do estímulo, as células foram coletadas e marcadas com anticorpos para avaliação de fenótipo de ativação no citômetro de fluxo. No citômetro, as células foram selecionadas de acordo com a expressão positiva para CD11c e assim avaliadas quanto a expressão de MHCII(I-A[b]), CD80 e CD86 (figura 7).

Analisando a população de células CD11c+, foi observado que a expressão da molécula de MHC-II apresentou uma modulação positiva em todos os grupos de estímulo quando comparados ao grupo RPMI (figura 7 A). Destes, apenas o grupo RNA Hifa2 não apresentou um aumento significativo na porcentagem de células expressando MHC-II quando comparado ao grupo RPMI.

Na análise da expressão da molécula co-estimuladora CD80, observou-se que somente as células estimuladas com LPS tiveram um aumento na porcentagem de células expressando a molécula CD80 quando comparado ao grupo RPMI (figura 7 B). Por outro lado, as CDs estimuladas com LPS ou RNA tiveram um aumento na porcentagem de células expressando a molécula CD86 quando comparado ao grupo RPMI (figura 7 C).

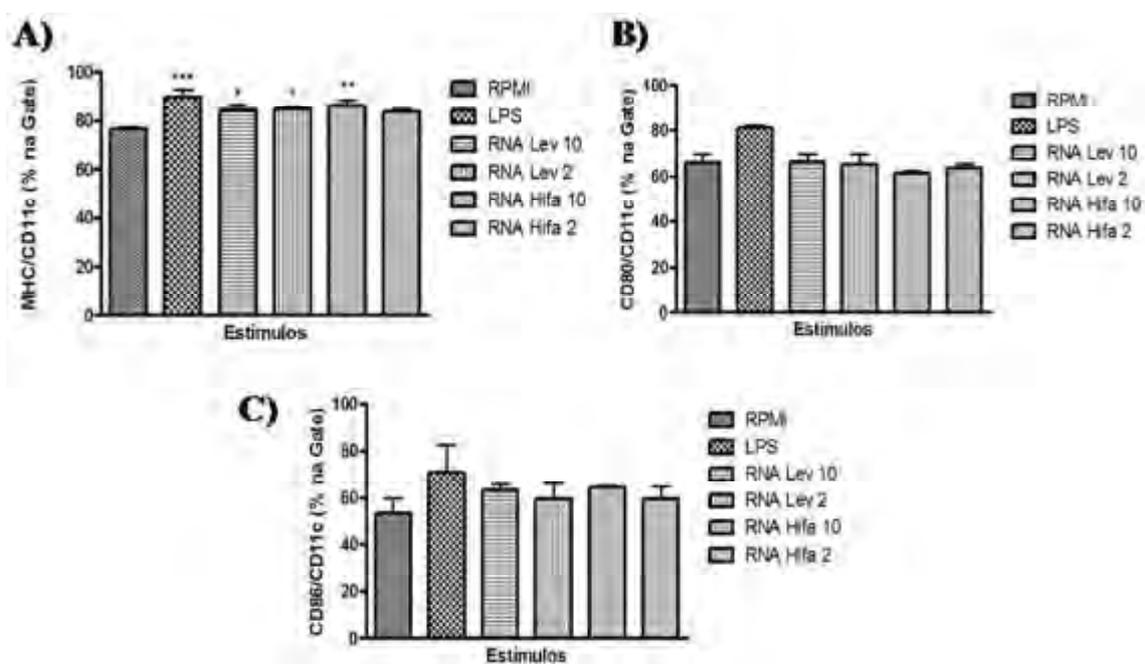


Figura 7: Expressão dos marcadores de maturação MHCII, CD80 e CD86 nas CDs após estimulação com RNA total de hifa ou levedura do fungo *S. schenckii*. Após seis dias de diferenciação, as CDs foram estimuladas com 2 ou 10 µg/mL de RNA total de levedura ou RNA total de hifa; ou com 1 µg/mL de LPS; ou não estimuladas por mais 24 horas a 37° C. As células foram coletadas e marcadas com anticorpos anti-CD11c, anti-MHC-II, anti-CD80 e anti-CD86. Células CD11c⁺ foram selecionadas e analisadas quanto à expressão de MHC-II (A), CD80 (B) e CD86 (C) por citometria de fluxo. Os resultados são as médias de três experimentos independentes. Os valores estão apresentados como médias ± SEM. Os asteriscos indicam comparações estatísticas entre os grupos de estímulos e o grupo RPMI: *p< 0,05; **p< 0,01 e ***p< 0,001.

4. Alterações funcionais das CDs após estimulação.

4.1. Avaliação da produção de citocinas pelas CDs estimuladas com as formas leveduriformes ou com o ExoAg do fungo *S. schenckii*.

Nesta etapa, foi avaliada a capacidade funcional das CDs estimuladas com as formas leveduriformes ou com o ExoAg do *S. schenckii* através da determinação do perfil de citocinas secretadas no sobrenadante de cultura nos diferentes grupos de estímulos. Para isso, foi analisada a secreção das seguintes citocinas: IL-12, IL-6 e IL-10.

Com relação a produção de citocinas pró-inflamatória, a citocina IL-12 e IL-6, foi observado que todos os grupos de estímulos promoveram uma alta produção das mesmas pelas CDs quando comparados ao grupo RPMI (figura 8). O grupo controle, ou seja, o grupo LPS, foi capaz de promover um aumento significativo da produção de ambas as citocinas quando comparado ao grupo RPMI (figura 8). Os grupos 1:1 e Exo100 foram capazes de promover um aumento significativo da produção de IL-12 quando comparados ao grupo RPMI (figura 8 A). No caso da citocina IL-6, este aumento foi significativo para os grupos 1:1 e 1:10, quando comparados ao grupo RPMI (figura 8 B), enquanto os grupos Exo10 e Exo100, apesar de apresentarem uma alta produção de IL-6, não apresentaram um aumento significativo com relação ao grupo controle RPMI (figura 8 B).

Analisando a citocina anti-inflamatória IL-10, foi detectado um aumento de produção da mesma pelas CDs de todos os grupos de estímulos, exceto do grupo Exo10, quando comparados ao grupo RPMI (figura 8 B). Entretanto, apenas o grupo 1:1 promoveu um aumento significativo da produção de IL-10 quando comparado ao grupo RPMI (figura 8 C).

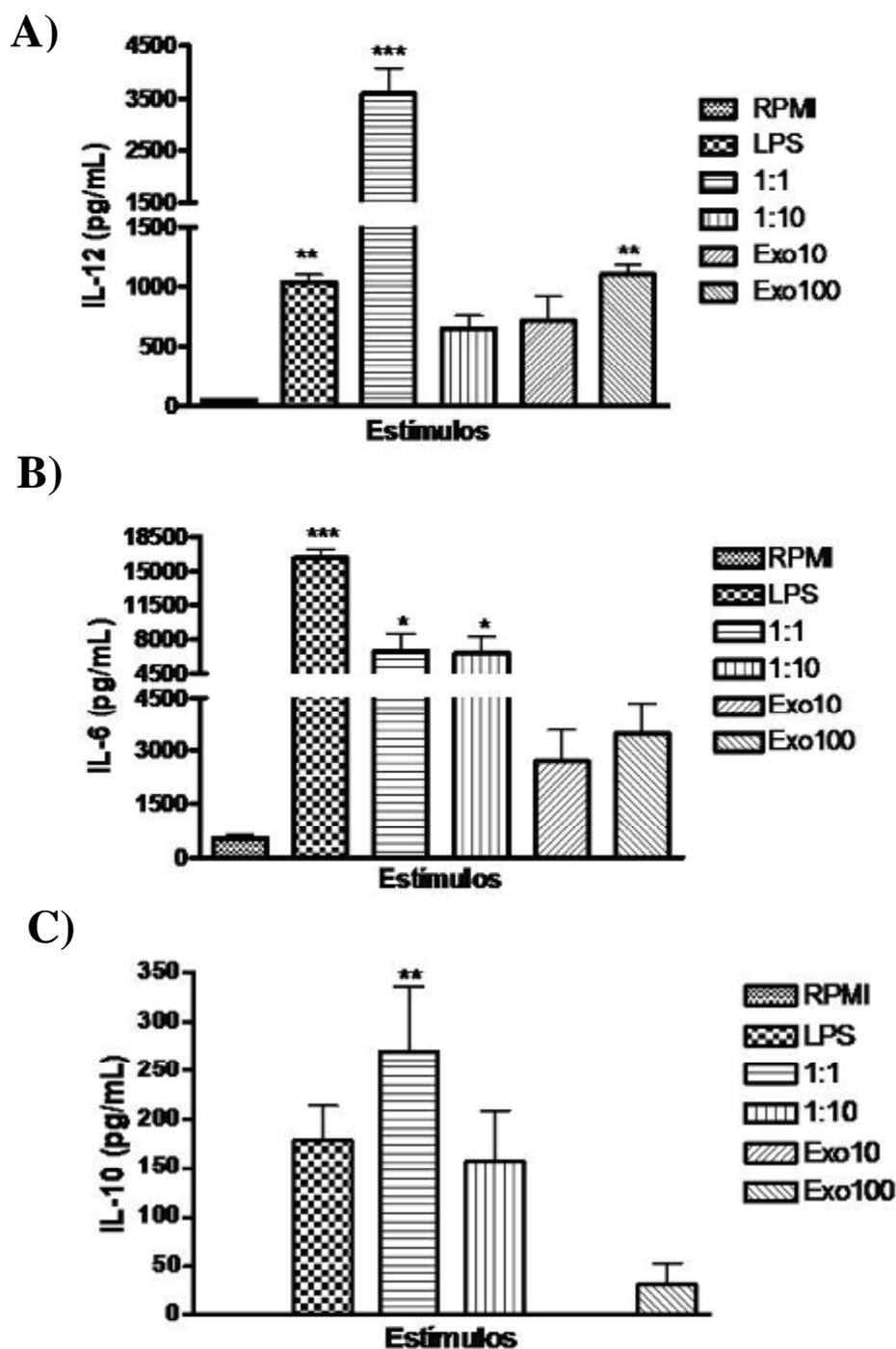


Figura 8: Produção de IL-12, IL-6 e IL-10 pelas CDs estimuladas com as formas leveduriformes ou com o ExoAg do fungo *S. schenckii*. Após seis dias de diferenciação, as CDs foram estimuladas com as formas leveduriformes na proporção de 1:1 ou 1:10 (CD:levedura), ou com ExoAg nas concentrações de 10 ou 100 µg/mL, ou LPS na concentração de 1 µg/mL, ou não estimuladas, por 24 horas a 37° C. Os sobrenadantes das culturas foram coletados para dosagem das citocinas IL-12 (A), IL-6 (B) e IL-10 (C) por ELISA. Os resultados são as médias de três experimentos independentes. Os valores estão apresentados como médias ± SEM. Os asteriscos indicam comparações estatísticas entre os grupos de estímulos e o grupo RPMI: *p < 0,05; **p < 0,01 e ***p < 0,001.

4.2. Avaliação da produção de citocinas pelas CDs após estimulação com RNA total de hifa ou levedura do fungo *S. schenckii*

Nesta etapa, foi avaliada a capacidade funcional das CDs estimuladas com RNA total de hifa ou levedura do fungo *S. schenckii* através da determinação do perfil de citocinas secretadas no sobrenadante de cultura nos diferentes grupos de estímulos. Para isso, foi analisada a secreção das seguintes citocinas: IL-12, IL-6 e IL-10.

No âmbito das citocinas pró-inflamatórias, foi observado que os grupos estimulados com RNA de levedura foram capazes de promover um aumento na produção de IL-12 (figura 9 A). Este aumento foi significativo tanto para o grupo RNA Lev10 quanto para o grupo RNA Lev2, quando comparado ao grupo RPMI. Por outro lado, os grupos estimulados com RNA Hifa demonstraram baixa produção desta citocina (figura 9 A). No caso da citocina IL-6, todos os grupos estimulados foram capazes de promover um aumento na produção dessa quando comparados ao grupo RPMI, sendo este significativo apenas para grupo LPS (figura 9 B). O grupo LPS foi destacado da figura 10 para auxiliar nas comparações estatísticas, já que os valores da produção de IL-12 pelo LPS estão muito acima dos valores dos grupos de RNAs.

Quanto à citocina anti-inflamatória IL-10, foi detectado um aumento significativo na produção deste mediador apenas no grupo LPS, quando comparado ao grupo RPMI (figura 9 C). Entre os grupos estimulados com RNA, apenas as células estimuladas com RNA Hifa10 tiveram um aumento na produção desta citocina, porém o mesmo não foi significativo em relação ao grupo RPMI (figura 9 C).

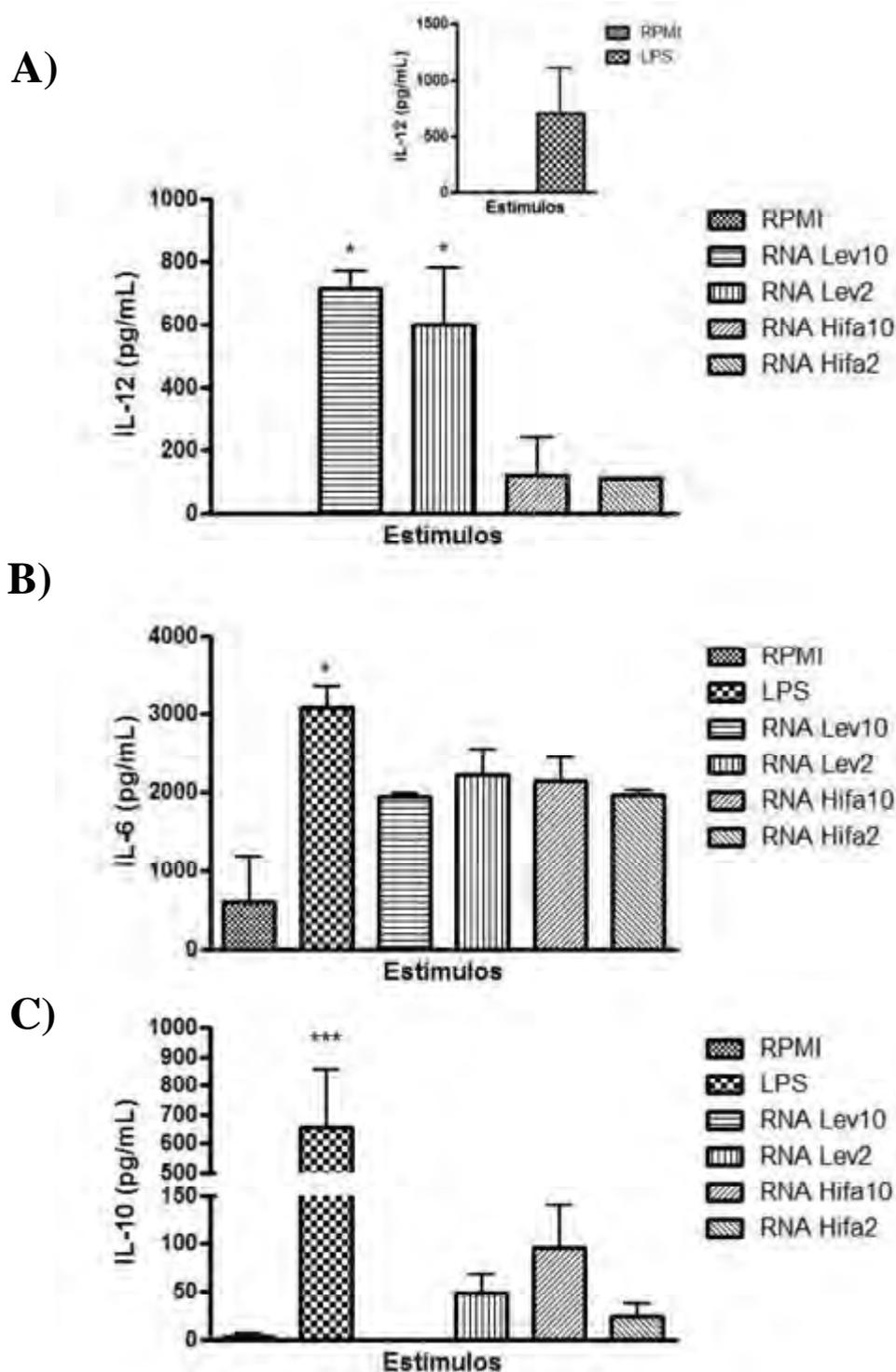


Figura 9. Produção de IL-12, IL-6 e IL-10 pelas CDs após estimulação com RNA total de hifa ou levedura do fungo *S. schenckii*. Após seis dias de diferenciação, as CDs foram estimuladas com 2 ou 10 $\mu\text{g/mL}$ de RNA total de levedura ou RNA total de hifa; ou com 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS; ou não estimuladas por mais 24 horas a 37° C. Os sobrenadantes das culturas foram coletados para dosagem das citocinas IL-12 (A), IL-6 (B) e IL-10 (C) por ELISA. Os resultados são as médias de três experimentos independentes. Os valores estão apresentados como médias \pm SEM. Os asteriscos indicam comparações estatísticas entre os grupos de estímulos e o grupo RPMI: * $p < 0,05$.

5. Ensaio de co-cultura entre as CDs estimuladas e linfócitos totais primados.

5.5.1. Avaliação da capacidade imunomoduladora de CDs estimuladas com as formas leveduriformes ou com o ExoAg do fungo *S. schenckii* sobre linfócitos totais de baço.

Nesta etapa, foi avaliado o possível efeito imunomodulador das CDs estimuladas com as formas leveduriformes ou com o ExoAg do fungo sobre linfócitos totais extraídos do baço de animais previamente desafiados com o *S. schenckii*, protocolo descrito em materiais e métodos no item 12. Para isso, foi analisada a produção de citocinas de padrões de respostas Th1, Th2 ou Th17 através da determinação da concentração de IFN- γ , IL-4, e IL-17 nos sobrenadantes de cultura pelo método de ELISA.

Com relação à citocina IL-4, associada ao padrão Th2 de resposta, não foi detectada a produção da mesma em nenhum dos grupos (dados não mostrados).

Quanto à citocina IFN- γ , associada ao padrão Th1 de resposta, os melhores resultados foram observados na proporção 1:9 (CD/LT), entretanto, a proporção 1:4 manteve um padrão semelhante de produção da citocina (figura 10 A). Somente o grupo levedura foi capaz de estimular a produção de IFN- γ nas três proporções. Com enfoque no ensaio realizado na proporção 1:9, foi observado que todos os grupos de estímulos, quando comparados ao grupo RPMI, foram capazes de aumentar a produção de IFN- γ pelos linfócitos totais. Os grupos Levedura e Exo100 promoveram um aumento significativo na produção de IFN- γ quando comparados ao grupo RPMI (figura 10 A). Também foi observada uma relação concentração-dependente entre os estímulos Exo10 e Exo100, sendo que, na maior concentração, houve um aumento significativo na produção de IFN- γ pelos linfócitos quando comparado ao grupo de menor concentração (figura 10 A). Por sua vez, o grupo Levedura promoveu um aumento significativo na produção da citocina em questão quando comparado aos grupos Exo.

Analisando a citocina IL-17, associada ao padrão Th17 de resposta, novamente os melhores resultados foram encontrados na proporção 1:9 (CD/LT), entretanto, as proporções 1:1 e 1:4 mantiveram um padrão semelhante de produção da citocina (figura 10 B). Ao analisar o ensaio na proporção 1:9, foi observado que todos os grupos de estímulos, quando comparados ao grupo RPMI, foram capazes de aumentar a produção de IL-17 pelos linfócitos. Entretanto, somente o grupo LPS e o grupo Exo100 o fizeram de maneira significativa (figura 10 B). Diferentemente do ocorrido na produção de IFN-

γ , o grupo Exo100 promoveu um aumento significativo na produção de IL-17 quando comparado ao grupo levedura. A relação concentração-dependente também foi mantida para essa citocina, já que o grupo Exo100 apresentou um aumento significativo na produção de IL-17 quando comparado ao grupo Exo10 (figura 10 B).

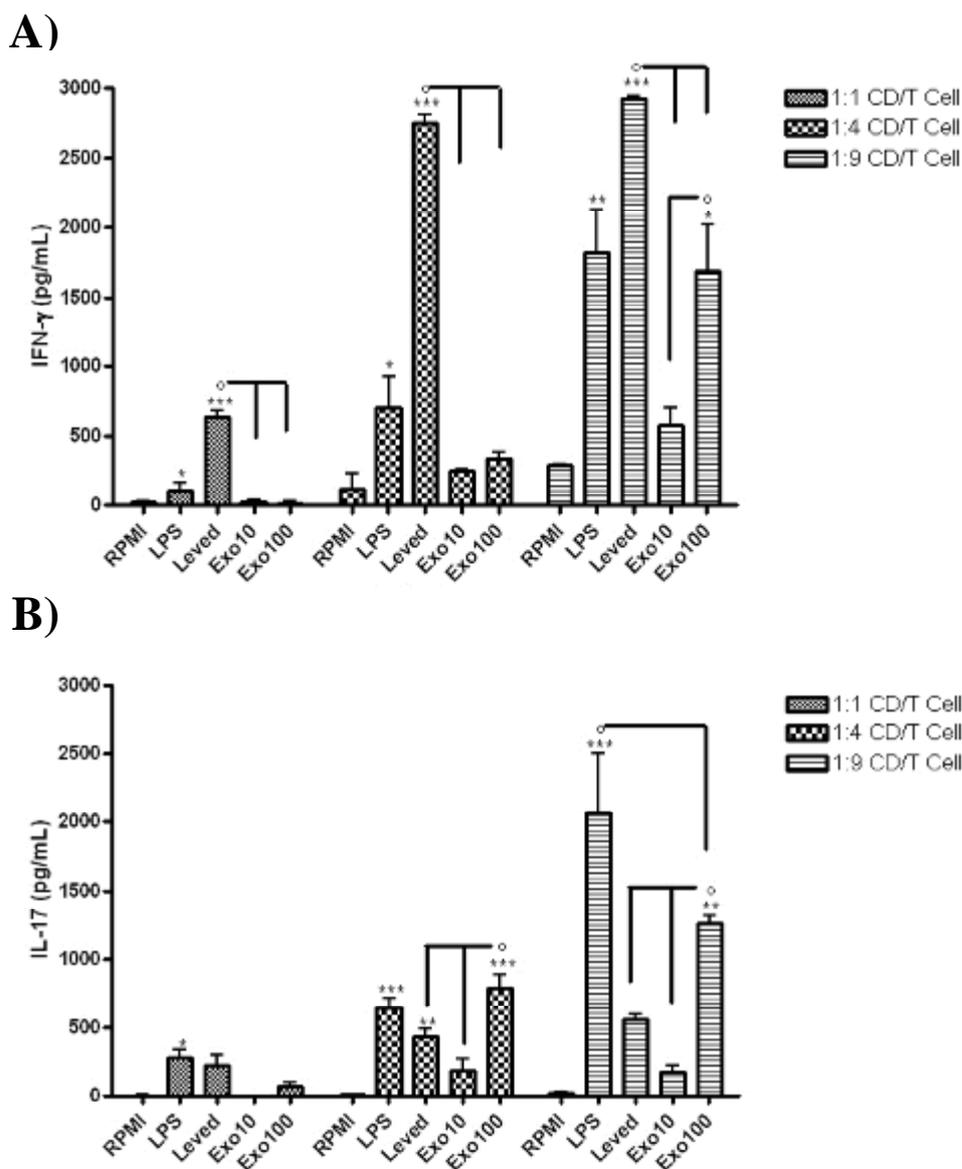


Figura 10: Produção de IFN- γ e IL-17 pelos linfócitos totais no ensaio de co-cultura com CDs estimuladas com as formas leveduriformes ou com o ExoAg do fungo *S. schenckii*. Células do baço de animais previamente desafiados com *S. schenckii* foram coletadas e cultivadas a 37°C. Após 2 horas, as células não aderentes foram coletadas e co-cultivadas, na proporção de 1:1, 1:4 e 1:9, com CDs diferenciadas e estimuladas com as formas leveduriformes na proporção de 1:1, ou com ExoAg nas concentrações de 10 ou 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ou LPS na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ou não estimuladas. Após o período de incubação de 72 horas a 37°C, o sobrenadante de cultura foi coletado para quantificação de IFN- γ (A) e IL-17 (B) por ELISA. Os resultados são as médias de três experimentos independentes. Os valores estão apresentados como médias \pm SEM. Os asteriscos indicam comparações estatísticas entre os grupos de estímulos e o grupo RPMI: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. Os círculos abertos indicam comparações estatísticas entre os grupos de estímulos indicados pelas linhas: $^{\circ}p < 0,05$.

5.2. Avaliação da capacidade imunomoduladora de CDs estimuladas com RNA total de hifa ou levedura do fungo *S. schenckii* sobre linfócitos totais de baço.

Nesta etapa, foi avaliado o possível efeito imunomodulador das CDs estimuladas com RNA total de hifa ou levedura do fungo *S. schenckii* sobre linfócitos totais extraídos do baço de animais previamente desafiados com o *S. schenckii*, protocolo descrito em materiais e métodos no item 12. Para isso, foi analisada a produção de citocinas de padrões de respostas Th1, Th2 ou Th17 através da determinação da concentração de IFN- γ , IL-4 e IL-17 nos sobrenadantes de cultura pelo método de ELISA. Para os estímulos de RNA, devido à sua menor capacidade em promover maturação fenotípica e funcional nas CDs, o sobrenadante do ensaio de co-cultura foi analisado em um tempo mais curto, 48 horas, e pelo tempo de 72 horas.

Analisando a citocina associada à subpopulação Th2, ou seja, IL-4, foi observado que as CDs estimuladas com RNA não foram capazes de estimular a produção dessa pelas células T em ambos os tempos de 48 e 72 horas de co-cultura (Dados não mostrados).

Quanto à citocina IFN- γ , associada ao padrão Th1 de resposta, as CDs estimuladas com RNA Lev10 foram capazes de estimular a produção de IFN- γ pelos linfócitos totais e promover um aumento significativo quando comparadas ao grupo RPMI tanto para o tempo de 48 horas quanto de 72 horas de co-cultura (figura 11 A). No tempo de 48 horas, o grupo RNA Lev10 foi mais eficiente em promover a produção de IFN- γ quando comparado ao tempo de 72 horas, entretanto, foram capazes de manter uma produção significativa de IFN- γ pelos linfócitos no tempo de 72 horas (figura 11 A).

Por outro lado, somente as CDs estimuladas com RNA Hifa10 foram capazes de estimular a produção de IL-17 pelos linfócitos totais, de maneira significativa quando comparado ao grupo RPMI no tempo de 48 horas (figura 11 B). No tempo de 72 horas não houve detecção da citocina IL-17 para os grupos de estímulos, indicando que o grupo RNA Hifa10, capaz de ativar células produtoras de IL-17 em 48 horas, não foram capazes de manter essa produção no ensaio de 72 horas.

O grupo LPS foi destacado das figuras para auxiliar nas comparações estatísticas, já que os valores da produção de IFN- γ e IL-17 pelo LPS estão muito acima dos valores dos grupos de RNAs (figura 11 A e B).

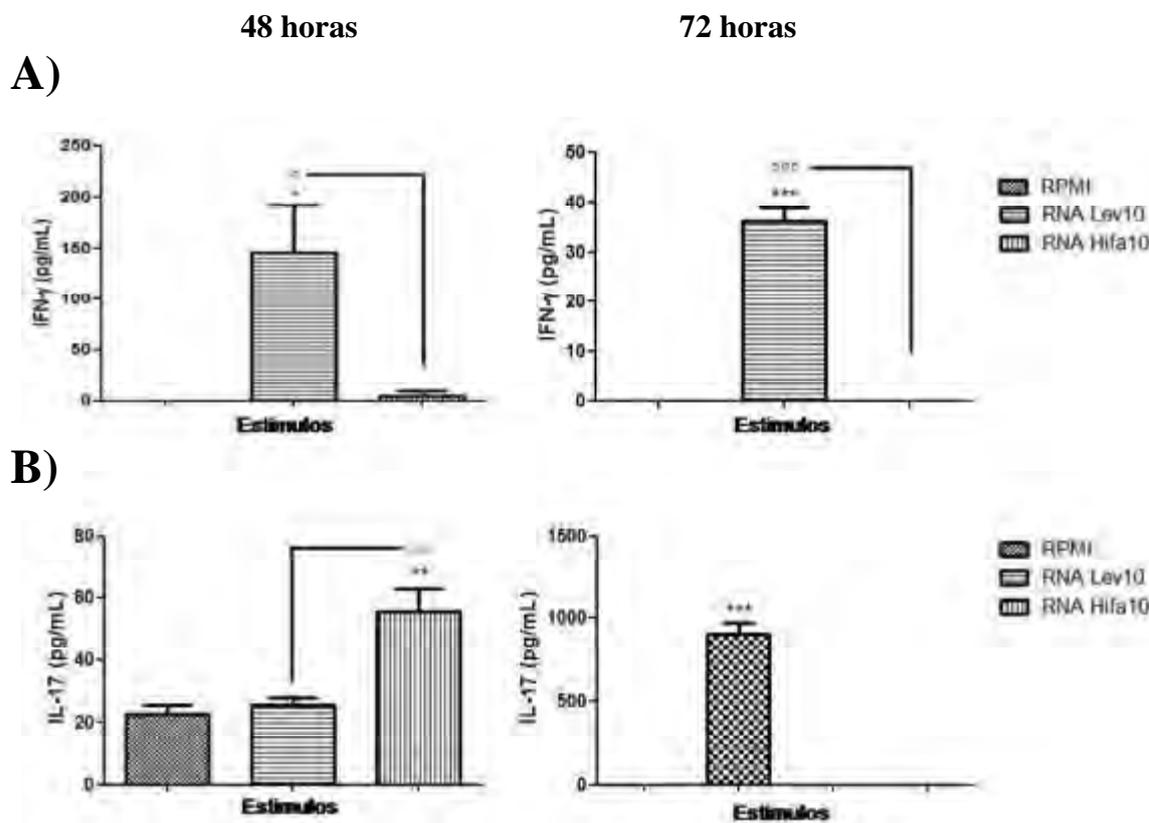


Figura 11: Produção de IFN- γ e IL-17 pelas células T no ensaio de co-cultura com CDs estimuladas com RNA total de hifa ou levedura do fungo *S. schenckii*. Células do baço de animais previamente desafiados com *S. schenckii* foram coletadas e cultivadas a 37°C. Após 2 horas, as células não aderentes foram coletadas e co-cultivadas, na proporção de 1:9, com CDs diferenciadas e estimuladas com 10 $\mu\text{g/mL}$ de RNA total de levedura ou RNA total de hifa; ou com 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS; ou não estimuladas. Após o período de incubação de 48 horas (esquerda) e 72 horas (direita) a 37°C, o sobrenadante de cultura foi coletado para quantificação de IFN- γ (A) e IL-17 (B) por ELISA. Os resultados são as médias de três experimentos independentes. Os valores estão apresentados como médias \pm SEM. Os asteriscos indicam comparações estatísticas entre os grupos de estímulos e o grupo RPMI: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os círculos abertos indicam comparações estatísticas entre os grupos de estímulos indicados pelas linhas: $^{\circ}p < 0,05$, $^{\circ\circ}p < 0,01$ e $^{\circ\circ\circ}p < 0,001$.

5.3. Avaliação da produção de citocinas TGF- β e IL-23 pelas CDs após estimulação.

A ativação de células T produtoras de IFN- γ no ensaio de co-cultura já era esperada devido aos altos níveis de IL-12, citocina de assinatura da subpopulação Th1 (Bettelli, Korn *et al.*, 2008), para vários grupos de estímulos, entretanto, a ativação de células T produtoras de IL-17 se tornou uma questão a ser resolvida. A diferenciação de células Th17 é dependente, em modelos murinos, das citocinas TGF- β e IL-6, e sua expansão e manutenção são dependentes de IL-23 (Korn, Bettelli *et al.*, 2009). Portanto, foi avaliada a produção dessas citocinas a procura de uma justificativa para a ativação de células Th17. Como a citocina IL-6 já havia sido avaliada (figura 8 B e 9 B), foi avaliada a produção das citocinas TGF- β e IL-23 pelas CDs estimuladas com as formas leveduriformes na proporção de 1:1, ou ExoAg nas concentrações de 10 ou 100 $\mu\text{g/mL}$, ou 10 $\mu\text{g/mL}$ de RNA total de levedura ou RNA total de hifa do fungo *S. schenckii*; ou com 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS; ou não estimuladas.

Interessantemente, quando o sobrenadante das CDs estimuladas com as formas leveduriformes ou com o ExoAg do fungo *S. schenckii* foram avaliadas, somente o grupo Exo100 foi capaz de promover um aumento significativo da produção de TGF- β (figura 12 A), o que somado com a produção de IL-6 e a detecção de IL-23 (figura 12 B) pode estar sendo responsável pela estimulação acentuada de IL-17 pelos linfócitos totais. O grupo Levedura e Exo10 também apresentaram um pequeno aumento na produção de TGF- β (figura 12 A), e a citocina IL-23 foi detectada para o grupo Levedura (figura 12 B).

Como esplanado anteriormente, os ensaios com os dois grupos de estímulos foram realizados em momentos distintos e, nos ensaios de CDs estimuladas com RNA total de hifa ou levedura do fungo *S. schenckii*, a produção de TGF- β foi analisada pela % de CDs positivas para TGF- β intracelular. De maneira similar ao ocorrido para o grupo Exo100, o grupo RNA Hifa10 apresentou uma alta porcentagem de células produtoras de TGF- β (figura 12 C), significativamente maior do que os demais grupos e, que, assim como para o grupo Exo100, pode estar justificando a produção de IL-17 pelos linfócitos totais promovida por esse grupo. O grupo RNA Lev10 também foi capaz de aumentar significativamente a porcentagem de células produtoras de TGF- β quando comparado ao grupo RPMI (figura 12 C), entretanto, essa quantidade não foi suficiente para promover a produção de IL-17 pelos linfócitos totais.

Com relação à citocina IL-23, não houve detecção da mesma nos sobrenadante de CDs estimuladas com RNA total de hifa ou levedura do fungo *S. schenckii* (dados não mostrados).

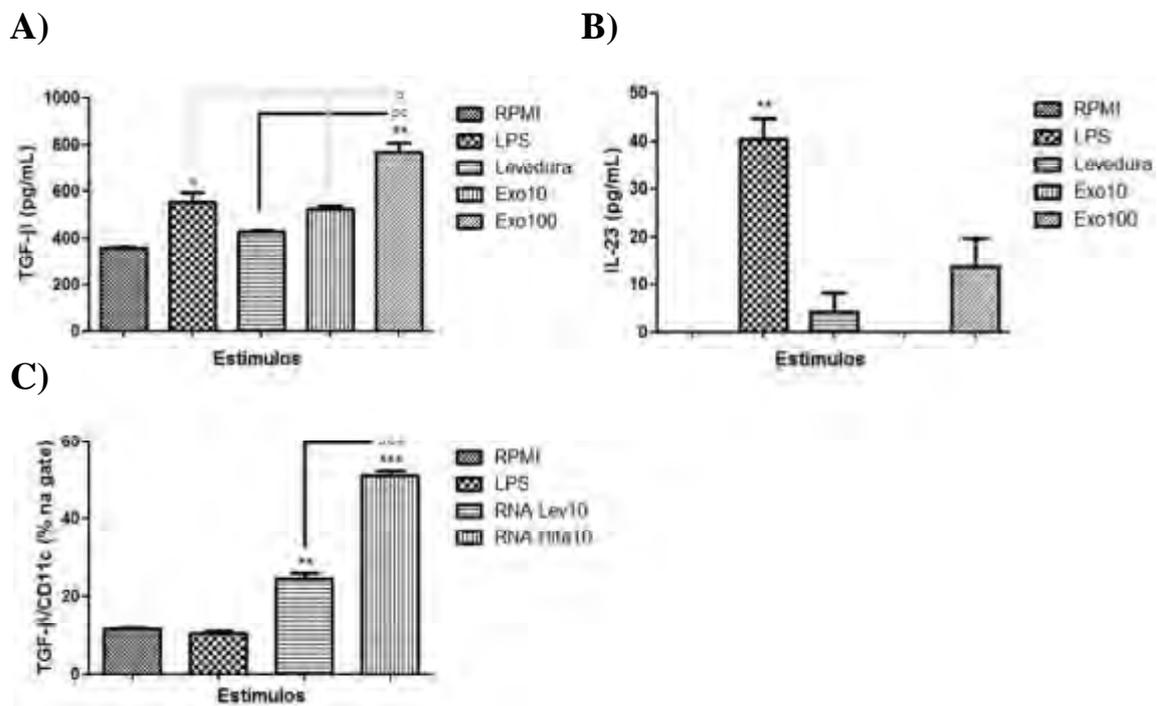


Figura 12: Produção de TGF- β e IL-23 pelas CDs estimuladas com as formas leveduriformes, ou com o ExoAg, ou com RNA total de hifa ou levedura do fungo *S. schenckii*. Após seis dias de diferenciação, as CDs foram estimuladas com as formas leveduriformes na proporção de 1:1 (CD:levedura), ou com ExoAg nas concentrações de 10 ou 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ou com 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNA total de levedura ou RNA total de hifa do fungo, ou LPS na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ou não estimuladas, por 24 horas a 37° C. Os sobrenadantes das culturas foram coletados para dosagem das citocinas TGF- β (A) e IL-23 (B) por ELISA. Para os estímulos de RNA, as CDs foram avaliadas quanto à citocina intracelular TGF- β e o resultado está expresso em % de CDs positivas para a citocina TGF- β (C). Os resultados são as médias de três experimentos independentes. Os valores estão apresentados como médias \pm SEM. Os asteriscos indicam comparações estatísticas entre os grupos de estímulos e o grupo RPMI: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. Os círculos abertos indicam comparações estatísticas entre os grupos de estímulos indicados pelas linhas: ° $p < 0,05$, °° $p < 0,01$ e °°° $p < 0,001$.

6. Ensaio de proteção

6.1. Marcadores de expressão CD44 e CD62L em linfócitos CD4 e CD8

A fim de avaliar o efeito profilático das CDs em animais infectados com *S. schenckii*, foi realizado a identificação e caracterização de linfócitos T CD4 e CD8 quanto a seu estado de ativação (efetora/memória) através da expressão dos marcadores CD44 e CD62L em células totais do baço em citômetro de fluxo.

Analisando a porcentagem de células CD4/CD44+ e CD8/CD44+ provenientes do baço de animais tratados ou não com CDs estimuladas com os diferentes antígenos do fungo *S. schenckii*, foi observado que os animais infectados com o fungo e que não foram previamente imunizados com os diferentes esquemas vacinais, apresentaram aproximadamente 80% e 62% de células CD4/CD44+ e CD8/CD44+, respectivamente (figuras 13 A e B). Os grupos de animais que receberam previamente os diferentes esquemas vacinais e posteriormente foram desafiados com *S. schenckii*, apresentaram um aumento na porcentagem destas populações celulares, porém não significativo quando comparado ao grupo somente infectado (figura 13 A e B). Os animais imunizados com CDs previamente estimuladas com Exo100, RNALevedura e RNAHifa, apresentaram aproximadamente 85,2%, 84,6% e 83,8% de células CD4/CD44+, respectivamente (figura 13 A). Com relação as células CD8/CD44+, foi observado que os animais imunizados com CDs previamente estimuladas com Exo10, Exo100, RNALevedura e RNAHifa, apresentaram aproximadamente 72,6%, 69,1%, 69,3% e 71,4% no número de células CD8/CD44+, respectivamente (figura 13 B).

Da mesma maneira, foi avaliada a expressão de CD62L nas populações de células CD4 e CD8 de animais imunizados um não com CDs previamente estimuladas com os antígenos fúngicos e posteriormente desafiados com *S. schenckii* (figuras 13 C e D). Na figura 13, foi observado que os animais apenas desafiados com *S. schenckii*, apresentaram aproximadamente 72% e 94% de células CD4/CD62L e CD8/CD62L, respectivamente (figuras 13 C e D). Os grupos de animais que receberam previamente os diferentes esquemas vacinais e posteriormente foram desafiados com *S. schenckii*, apresentaram um aumento na porcentagem de células CD4/CD62L (figura 13 C), porém não significativo quando comparado ao grupo somente infectado (figura 13 C). Com relação às células CD8/CD62L, não houve um aumento no número desta população celular quando comparado ao grupo somente infectado (figura 13 D). Para melhor avaliação destes dados, a expressão do marcador CD62L foi analisado quanto as populações CD4 (figura 13 E) e CD8 (figura 13 F) que apresentavam alta e baixa

expressão deste marcador. Neste caso, diferenças importantes foram observadas. Os animais que receberam CDs estimuladas com RNA Levedura e RNA Hifa, tiveram um aumento significativo de células CD4/CD62Lhi quando comparado ao grupo somente desafiado com *S. schenckii* (figura 13 E). Além disso, a porcentagem do número de células CD8 expressando o marcador CD62Lhi, também aumentou significativamente para os grupos imunizados com CDs estimuladas com Exo, RNA Levedura e RNA Hifa, quando comparado ao grupo não tratado (figura 13 F).

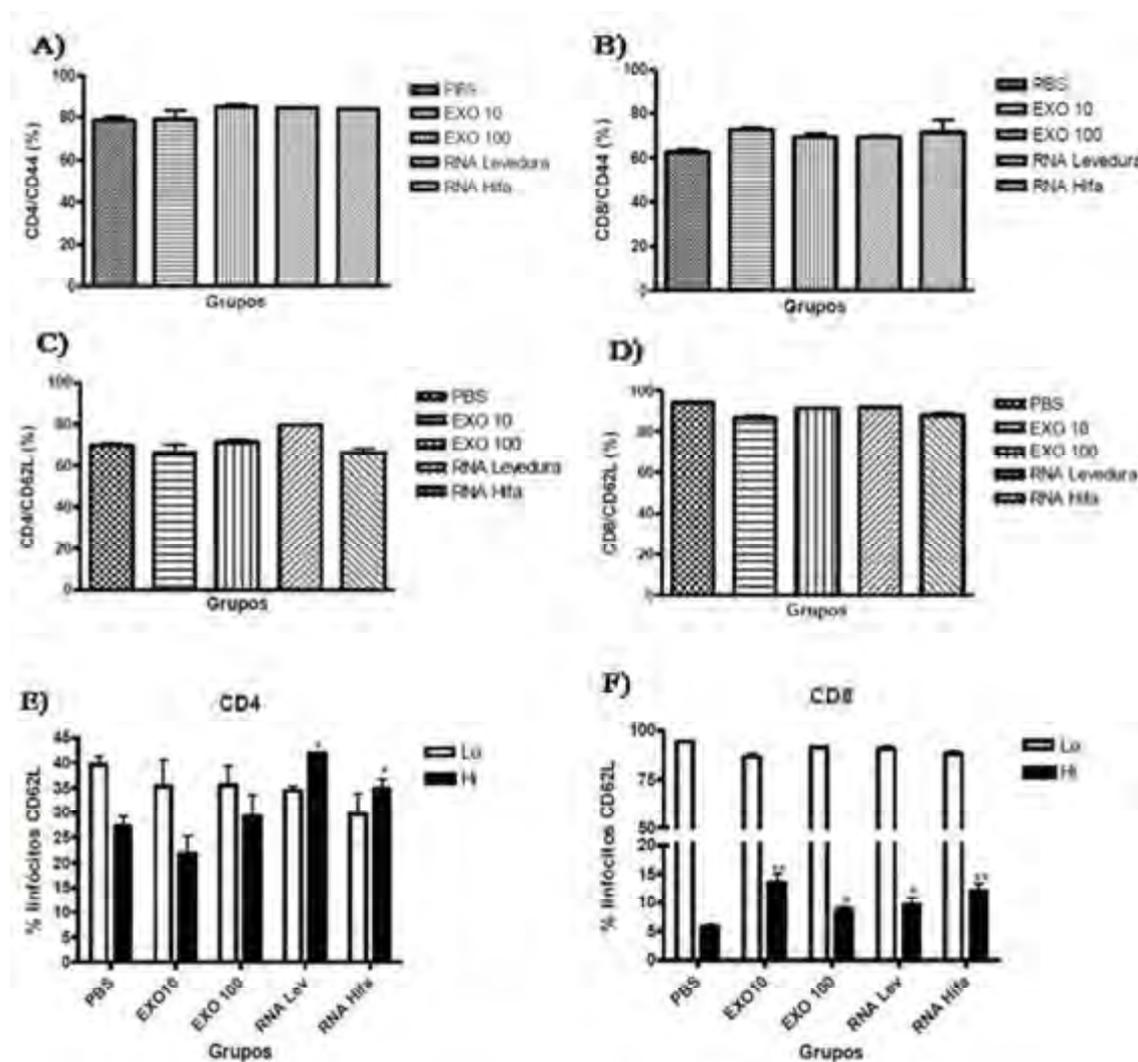


Figura 13. Avaliação dos marcadores de ativação CD44 e CD62L em células CD4⁺ e CD8⁺.

As células totais de baço dos animais do ensaio de proteção foram avaliadas via citometria de fluxo quanto à expressão dos marcadores de ativação CD44 e CD62L em células T CD4⁺ e CD8⁺. Células CD4⁺ (A) ou CD8⁺ (B) foram selecionadas e analisadas quanto à porcentagem de células positivas para o marcador de ativação CD44. Células CD4⁺ ou CD8⁺ foram selecionadas e analisadas quanto à porcentagem de células positivas para o marcador de ativação CD62L, (C) e (D), respectivamente; e analisadas quanto a expressão baixa e alta para o mesmo marcados, (E) e (F), respectivamente. Os resultados são as médias de dois experimentos independentes. Os valores estão apresentados como médias \pm SEM. Os asteriscos indicam comparações estatísticas entre os grupos tratados e o grupo não tratado (PBS): * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

6.2. Carga fúngica: Histologia e Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

Após a identificação e caracterização do estado de ativação dos linfócitos provenientes do baço de animais imunizados ou não com os diferentes esquemas vacinais a base de CDs, foi avaliado o possível efeito protetor das CDs estimuladas ou não com os diferentes antígenos fúngicos, através da contagem de UFC no baço dos animais que receberam a transferência adotiva de CDs e que foram posteriormente desafiados com as formas leveduriformes do fungo. Neste caso, as CDs foram previamente transferidas adotivamente via subcutânea para animais “naives” e uma semana após a transferência adotiva, os animais foram desafiados com 5×10^6 células leveduriformes do fungo *S. schenckii*, via intravenosa. Duas semanas após o desafio, os animais foram sacrificados e o baço foi coletado para realização de cultura e contagem da UFC. A contagem de UFC do baço destes animais foi negativa, sugerindo a ausência de carga fúngica.

Para a análise histológica, a coloração de escolha foi o método Gomori nitrato de prata modificado para fungos (Grocott, 1955), uma coloração que evidencia bem a parede celular de fungos, promovendo uma dupla refringência visualizada ao microscópio óptico. Ao contrário da UFC, foi detectado o fungo *S. schenckii* no baço desses animais através de cortes histológicos corados pelo método de Grocott. Os cortes foram corados no Laboratório IPC e analisados pelo professor Dr Cleverton Roberto de Andrade, do Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP e pela Dra Danielle Cardoso Geraldo Maia, do Departamento de Análise Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP. Assim, os cortes foram classificados da seguinte maneira: (-) negativo para a presença do fungo; (+) positivo com pouca presença do fungo; (++) positivo com moderada presença do fungo; (+++) positivo com alta presença do fungo. A classificação de cada corte está apresentada na tabela 1 e cada classificação está ilustrada na figura 14. De maneira ilustrativa, pode-se observar na figura 15 fotos que evidenciam as características do fungo *S. schenckii*, presente no baço em sua forma leveduriforme, com aspecto de redondo a oval, com típica dupla refringência ao microscópio óptico, a qual demonstra sua densa parede celular.

O resultado foi muito interessante, já que três grupos de tratamento, Exo100, RNALevadura e RNAHifa apresentaram melhora na classificação de carga fúngica histologicamente quando comparado ao grupo somente infectado. O grupo RNAHifa foi

o grupo que apresentou os melhores resultados, com classificação -/+, demonstrando uma possível atividade protetora promovida pelas células dendríticas transfectadas com RNA total de hifa no modelo da esporotricose sistêmica.

Outro grupo com bom resultado foi o grupo Exo100, com classificação +/+, as quais também sugerem uma atividade protetora à esporotricose sistêmica pelas células dendríticas estimuladas com Exoantígeno na concentração de 100 µg/mL. O grupo RNALvedura apresentou classificação ++ e esse tratamento também sugere uma atividade protetora à esporotricose sistêmica.

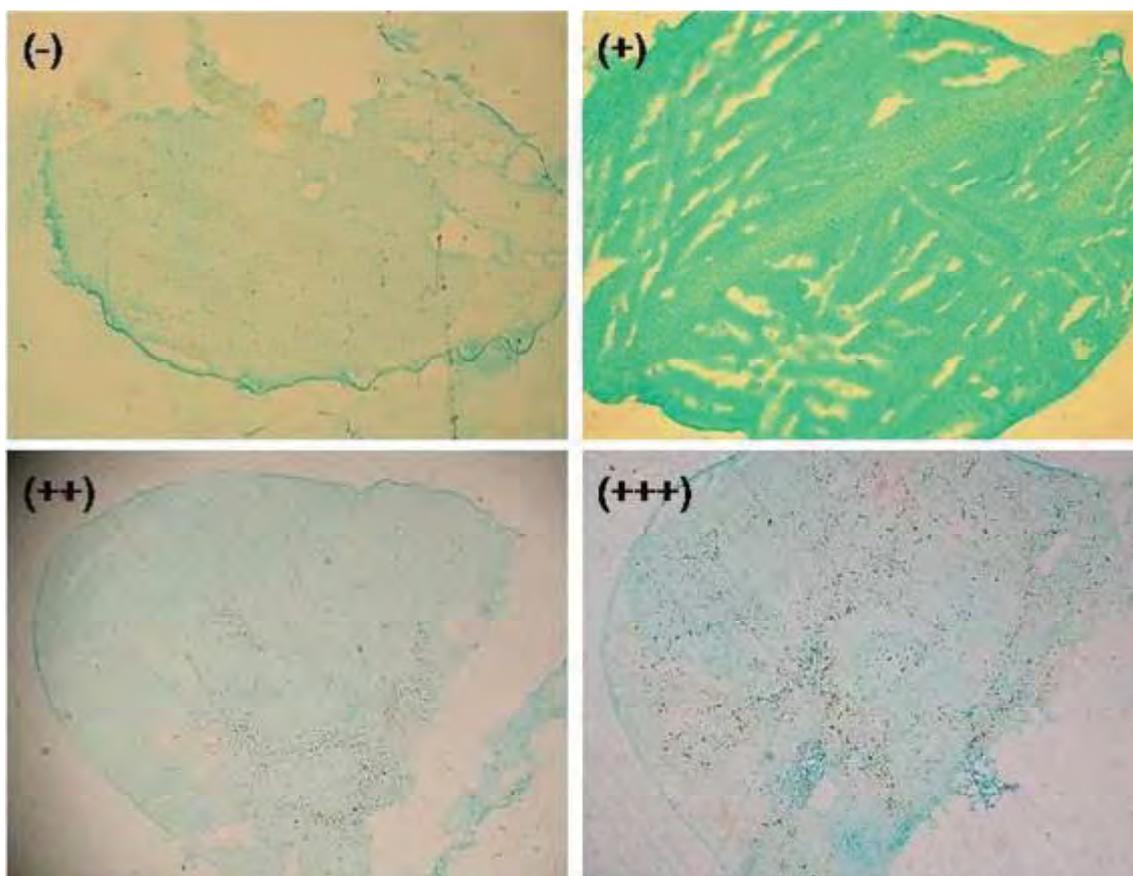


Figura 14: Classificação dos baços quanto à presença do fungo *S. schenckii*. Os cortes foram agrupados em quatro classificações diferentes, ilustradas acima, no aumento de 400x: (-) negativo para a presença do fungo; (+) positivo com pouca presença do fungo; (++) positivo com moderada presença do fungo; (+++) positivo com alta presença do fungo.

Tabela 1: Classificação dos cortes histológicos quanto à carga fúngica de acordo com cada grupo

Grupos	Classificação histológica*
Grupo PBS	+++
Grupo RPMI	+++
Grupo Exo 10	+++
Grupo Exo 100	+ / ++
Grupo RNA Levedura	++
Grupo RNA Hifa	- / +

experimental do ensaio de proteção.

* método Gomori nitrato de prata modificado para fungos (Grocott, 1955).

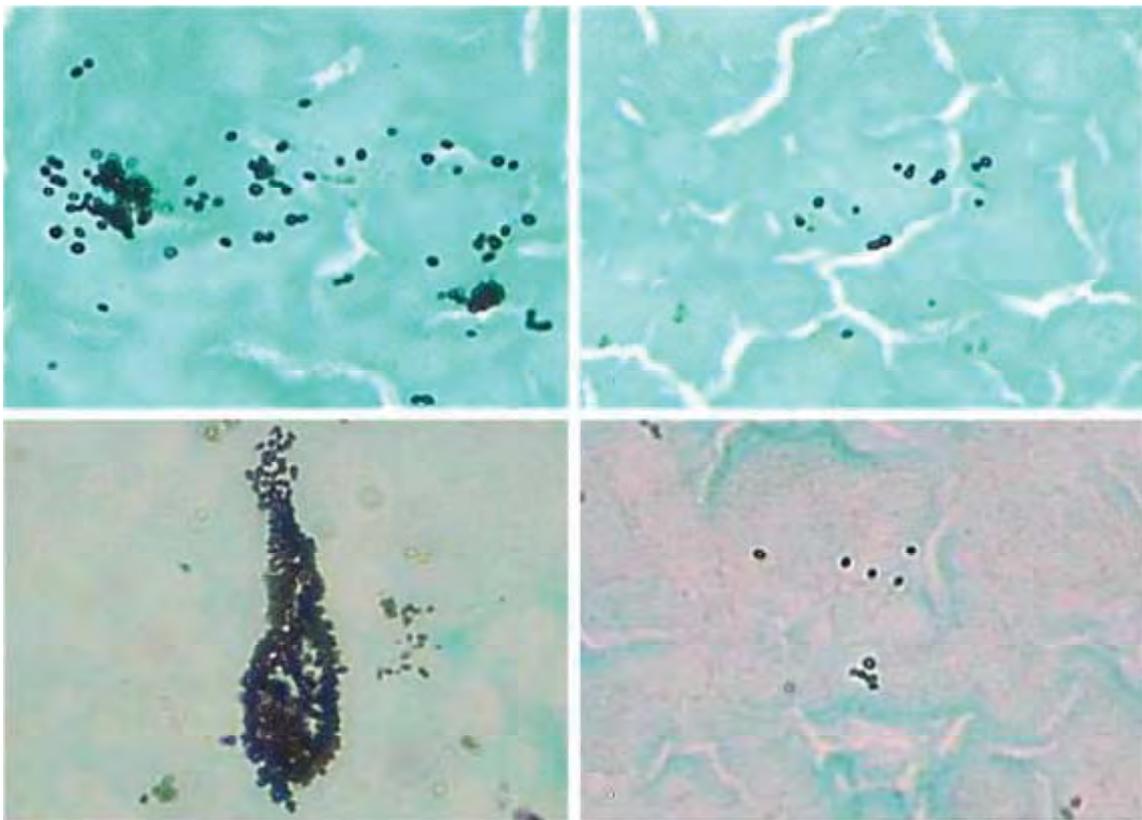


Figura 15: Fotos ilustrativas do fungo *S. schenckii* em sua forma leveduriforme no baço dos camundongos. As fotos foram capturadas por microscopia óptica no aumento de 1000x com o auxílio do “software” VD480 OPTMEDICAL acoplado ao microscópio NIKON Eclipse E200. As fotos demonstram a morfologia redonda ou oval típica da levedura de *S. schenckii* e a camada densa de parede celular.

DISCUSSÃO

Desde que a geração de células dendríticas a partir de precursores mielóides, derivados de medula óssea, foi noticiada, isto se tornou a ferramenta padrão para o estudo das CDs em sistemas biológicos (Lutz e Rossner, 2007).

As Células Dendríticas mielóides convencionais foram descritas pela primeira vez por Ralph M. Steinman em 1973, após serem isoladas do baço de camundongo (Steinman e Cohn, 1973; 1974; Steinman, Lustig *et al.*, 1974; Steinman, Adams *et al.*, 1975; Steinman, Kaplan *et al.*, 1979). Como elas representam populações raras em todos os órgãos (Austyn, 1998), sua geração *in vitro*, a partir de precursores, representa uma ferramenta muito valiosa. Em 1992, sua geração, a partir de precursores hematopoiéticos derivados de medula óssea, através da utilização do fator estimulante de colônia macrófago-granulócito (GM-CSF), foi primeiramente descrita em ratos (Bowers e Berkowitz, 1986); em seguida em camundongos (Inaba, Inaba *et al.*, 1992); e finalmente em humanos (Bai, Feuerer *et al.*, 2002). Como células precursoras mielóides estão também presentes no baço, a geração de CDs a partir de células do baço é similarmente possível (Lu, Hsieh *et al.*, 1995). Por sua acessibilidade, a medula óssea (Inaba, Inaba *et al.*, 1992; Lutz, Kukutsch *et al.*, 1999) e o baço (Vremec, Zorbas *et al.*, 1992) são, em camundongos, os tecidos preferidos como fontes para geração, ou purificação de CDs, enquanto monócitos do sangue periférico (Schreurs, Eggert *et al.*, 1999) são mais utilizados para geração de CDs humanas.

Células dendríticas convencionais podem ser geradas a partir de medula óssea murina por estímulo com GM-CSF ou IL-3 (Lutz, 2004). Por sua vez, a citocina IL-4 atua como um co-fator, contribuindo para o desenvolvimento de CDs juntamente com GM-CSF, na maturação de CDs, ou para o crescimento de subtipos de CDs (Lutz, Suri *et al.*, 2000; Menges, Baumeister *et al.*, 2005). Um dos pontos mais críticos na utilização de GM-CSF está na dose a ser utilizada. A geração eficiente de CDs maduras espontâneas e de CDs que possam ser maturadas posteriormente *in vitro* só é possível em doses maiores que 200 U/mL, enquanto doses inferiores podem gerar CDs imaturas tolerantes e CDs resistentes ao processo de maturação (Lutz, Suri *et al.*, 2000).

Nesse contexto, a geração de um número satisfatório de CDs a partir de precursores mielóides que possam ser utilizadas em esquemas terapêuticos tornou-se um desafio para os pesquisadores. São obtidos, em média, 1-10 x 10⁵ CDs do baço ou do timo por animal (Vremec, Zorbas *et al.*, 1992; Inaba, Turley *et al.*, 1998). No sangue periférico de camundongos, 1 x 10⁶ CDs podem ser geradas na presença de GM-CSF (Inaba, Inaba *et al.*, 1992), enquanto que os precursores da medula óssea tratados com

GM-CSF produzem 5×10^6 CDs por animal, após 8 dias de cultura (Inaba, Inaba *et al.*, 1992; Scheicher, Mehlig *et al.*, 1992; Inaba, Inaba *et al.*, 1993). Entretanto, as modificações realizadas por Lutz e cols. (1999) no protocolo de diferenciação de CDs a partir de precursores da medula óssea preconizado por Inaba (1992), apresentaram um rendimento aproximado de $1-3 \times 10^8$ CDs após 10-12 dias de cultura (Lutz, Kukutsch *et al.*, 1999).

No presente estudo, o protocolo de diferenciação para obtenção de CDs a partir de precursores da medula óssea apresentou um rendimento semelhante aos descritos na literatura, com produção de $1-1,5 \times 10^7$ células por animal. Foi obtido um rendimento de 70-80% (figura 2) de CDs, ou seja, células CD11c positivas, após seis dias de diferenciação, com um número elevado de células viáveis, aproximadamente 95-98% (dados não mostrados). Sendo assim, devido aos bons resultados ao sexto dia de diferenciação, e ao sofrimento celular observado ao nono dia, o experimento de diferenciação em 6 dias foi escolhido como experimento padrão.

Como uma das propostas do presente estudo foi a obtenção de uma estratégia vacinal por meio da utilização de RNA fúngico, foi avaliada a integridade do RNA e o método de transfecção do mesmo em células dendríticas. Na figura 3 observa-se que a extração foi bem sucedida mantendo a integridade e pureza ideais para continuidade dos testes aqui propostos.

O ensaio de marcação do RNA através do Kit Ulyssis Alexa fluor 488 demonstrou que o RNA foi transfectado com alta eficiência pelo lipídio catiônico DOTAP nas CDs, com a presença do RNA aumentando significativamente entre os tempos de 2, 4 e 8 horas após a transfecção (figura 4). Ainda, as CDs transfectadas com RNA via DOTAP apresentaram aparência vacuolizada por microscopia óptica, demonstrando a incorporação das moléculas de DOTAP+RNA. Bacci e cols. (2002) demonstraram que o RNA transfectado via lipídio catiônico DOTAP se mantém intacto dentro das CDs (Bacci, Montagnoli *et al.*, 2002). Assim, a transfecção do RNA via DOTAP se mostrou eficiente para utilização desse antígeno nos ensaios posteriores.

A capacidade das CDs em ativar linfócitos T depende do estado de maturação das mesmas. Após a estimulação das CDs imaturas com produtos microbianos e fúngicos, os receptores do tipo Toll (TLRs) expressos na superfície celular promovem a maturação e ativação via MyD88, TRIF e NF- κ B, levando a um aumento de moléculas co-estimuladoras na superfície e produção de citocinas inflamatórias (Meier, Kirschning *et al.*, 2003; Netea, Suttmüller *et al.*, 2004; Biondo, Midiri *et al.*, 2005; Gautier, Humbert

et al., 2005; Napolitani, Rinaldi *et al.*, 2005; Yarovinsky, Zhang *et al.*, 2005; Romani, 2008). A maioria destes estudos foi realizada com macrófagos provenientes de animais deficientes ou não de TLRs, entretanto, pouco se sabe como os antígenos fúngicos promovem a ativação de CDs. Romagnoli e cols. (2004) observaram que a interação de *C. albicans* com CDs provocou a maturação e ativação destas células, indicada pelo aumento dos marcadores de superfície e moléculas co-estimuladoras envolvidas na apresentação de antígeno e estimulação de células T (Romagnoli, Nisini *et al.*, 2004). Outros estudos têm demonstrado também que a transfecção de CDs com RNA fúngico promove a maturação funcional das mesmas (Bacci, Montagnoli *et al.*, 2002; Bozza, Perruccio *et al.*, 2003). Bacci e cols. (2002) observaram que a transfecção *in vitro* de CDs com RNA total extraído tanto da forma leveduriforme quanto miceliar de *C. albicans* foi capaz de promover a maturação das CDs, com aumento na expressão de MHC classe II e de moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 (Bacci, Montagnoli *et al.*, 2002).

Os resultados apresentados no presente estudo sugerem que, assim como ocorre na infecção por *C. albicans* (Bacci, Montagnoli *et al.*, 2002), as CDs diferenciadas a partir da medula óssea foram capazes de reconhecer e modular positivamente a expressão das moléculas de MHCII e moléculas co-estimuladoras quando estimuladas em cultura com as formas leveduriformes (figura 6), ou ExoAg (figura 6), ou RNA total das formas leveduriforme e miceliar (figura 7) do fungo *S. schenckii*. Entretanto, a modulação da expressão das moléculas de MHCII e co-estimuladoras foi menos evidente quando as células foram estimuladas com RNA total. A modulação diferenciada de acordo com os antígenos sugere uma orquestração diferencial de receptores, e seu entendimento exige estudos posteriores.

As CDs são componentes essenciais na imunidade inata e adaptativa devido a sua grande quantidade de receptores de reconhecimento de antígeno, os quais reconhecem assinaturas moleculares específicas de um patógeno e ativam uma resposta imune específica. A ativação das CDs leva à produção de citocinas e outros mediadores, o que promove o desenvolvimento de respostas específicas de células T CD4+(Th) que atuam decisivamente na formação de uma imunidade protetora contra agentes infecciosos (Steinman e Hemmi, 2006).

Nas últimas duas décadas, a imunopatogênese de infecções fúngicas foi explicada primariamente em termos do balanço entre Th1 e Th2. Embora respostas Th1, dirigidas pelas citocinas IL-12 e IFN- γ , sejam responsáveis pela proteção principal

contra fungos, outras citocinas e outros caminhos estão surgindo. O recém descrito padrão de resposta Th17 pode atuar em uma resposta exacerbada antes atribuída a Th1, e pode ajudar a explicar a associação entre respostas crônicas inflamatórias e persistência fúngica (Romani, 2008).

O perfil de citocinas secretadas pelas células T parece ser dependente da IL-12 secretada pelas CDs, uma vez que as CDs CD8⁺ derivadas de camundongos deficientes para o gene que codifica IL-12 falharam em induzir resposta de padrão Th1 (Macatonia, Hosken *et al.*, 1995; Maldonado-Lopez, Maliszewski *et al.*, 2001). Estudos realizados por Koga *et al.* (2002) demonstraram a presença de CDs em granulomas de indivíduos com esporotricose, e que estas atuavam na apresentação de antígenos e produção de IL-12 gerando uma resposta Th1 (Koga, Duan *et al.*, 2002).

A citocina IFN- γ é importante na resistência a infecções (O'garra, 1998) e tumores (Shankaran, Ikeda *et al.*, 2001), e é produzida por células T CD4⁺ auxiliares após a estimulação de CDs e macrófagos que secretam IL-12 (Macatonia, Hosken *et al.*, 1995; Pulendran, Lingappa *et al.*, 1997; Moser e Murphy, 2000). Fujimura e cols. (1996) detectaram mRNA para IFN- γ nas lesões granulomatosas de pele (Fujimura, Asai *et al.*, 1996) e a análise imuno-histoquímica demonstrou a presença de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ na periferia de tais lesões, sugerindo que a formação do granuloma na esporotricose pode estar associada com uma resposta Th1 (Koga, Duan *et al.*, 2002).

O papel da citocina IL-17 na regulação de resposta imune, principalmente no padrão de resposta Th17 tem sido investigado (Harrington, Hatton *et al.*, 2005; Park, Li *et al.*, 2005; Gocke, Cravens *et al.*, 2007). As citocinas derivadas da população de células Th17 estão associadas com importante papel na proteção contra vários agentes patológicos, incluindo bactérias e fungos, facilitando a ativação de neutrófilos e estimulando a produção de defensinas pelas células epiteliais (Ye, Rodriguez *et al.*, 2001; Huang, Na *et al.*, 2004). Entretanto, algumas inflamações crônicas, como a doença inflamatória do intestino, já estão sendo explicadas pela resposta de células Th17 (Elson, Cong *et al.*, 2007; Monteleone, Pallone *et al.*, 2009). As células Th17 apresentam a capacidade de produzirem IL-17 além de outras citocinas como, por exemplo IL-21, IL-22, TNF- α e IL-6 (Bettelli, Korn *et al.*, 2008).

Nesse estudo buscou-se identificar o reconhecimento da levedura e dos diferentes antígenos do fungo *S. schenckii* pelas CDs, analisar suas alterações

fenotípicas e funcionais em termos de maturação, a ativação diferencial de células T e, por fim, extrapolar a importância dessas respostas geradas *in vitro* para o ensaio de proteção *in vivo* no modelo da esporotricose sistêmica.

Os resultados demonstraram que as CDs foram capazes de reconhecer as células leveduriformes e o exoantígeno do fungo *S. schenckii*, com grande produção de citocinas pró-inflamatórias, e promover uma estimulação da produção de IFN- γ e IL-17 pelos linfócitos totais (figura 8 e 10), entretanto, enquanto as células leveduriformes foram mais eficientes em estimular a produção de IFN- γ , o ExoAg estimulou uma produção de IL-17 e IFN- γ equilibrada. Assumindo que as CDs estejam ativando células T CD4⁺ para perfis Th1 e Th17, já que as células T não foram caracterizadas fenotipicamente, o estímulo ExoAg sugere uma capacidade em desviar a resposta imune celular de um perfil Th1 efetor para um Th17 inflamatório. Por outro lado, o grupo Exo10 não foi capaz de ativar as CDs e conseqüentemente iniciar uma resposta de células T.

Os ensaios com RNA total de levedura e hifa demonstraram que as CDs foram capazes de reconhecê-lo, tornando-se ativados dependendo da origem do RNA. Enquanto o RNA de levedura, em concentrações mais altas, grupo RNA Lev10, foi capaz de promover a produção de IL-12 pelas CDs, o RNA de hifa não foi capaz (figura 9). Essa produção de IL-12 foi suficiente para ativar células T produtoras de IFN- γ no ensaio de 48 e 72 horas de co-cultura (figura 11), confirmando o caráter de ativação das CDs promovido pelo estímulo RNA total de levedura. Enquanto isso, as CDs estimuladas pelo RNA total de hifa foram capazes de ativar células T produtoras de IL-17 no ensaio de 48 horas de co-cultura, confirmando seu caráter de ativação. Esses resultados estão de acordo com estudos que demonstraram a capacidade das CDs em reconhecerem diferencialmente RNA de levedura e hifa (Bacci, Montagnoli *et al.*, 2002; Bozza, Montagnoli *et al.*, 2004), entretanto os resultados aqui apresentados demonstraram uma ativação de um padrão Th17 por CDs estimuladas com RNA de hifa, ao invés do perfil Th2.

Tradicionalmente, as repostas mediadas por células Th1 produtoras de IFN- γ são consideradas as responsáveis por conferir imunidade protetora contra fungos, enquanto repostas Th2, mediadas por IL-4, levam ao aumento da suscetibilidade a infecções fúngicas (Romani, 2011). As células Th17 produtoras de IL-17 compreendem uma nova subpopulação de células T com uma função na imunidade adaptativa ainda pouco

compreendida para uma variedade de fungos (Romani, 2011). Entretanto, uma função protetora vem sendo vislumbrada para as células Th17 na imunidade contra fungos patogênicos (Huang, Na *et al.*, 2004; Kleinschek, Muller *et al.*, 2006; Deepe e Gibbons, 2009; Chamilos, Ganguly *et al.*, 2010).

Enquanto a diferenciação de células Th1 e Th2 dependem das citocinas efetoras, IFN- γ e IL-4, respectivamente, a indução de células Th17 não requer IL-17 (Bettelli, Korn *et al.*, 2008). Por sua vez, o desenvolvimento de Th17 requer a atividade do fator de transcrição ROR γ t (do inglês “related orphan receptor”) e ROR α , e RUNX1, e é dirigida por TGF- β e IL-6 (Bettelli, Korn *et al.*, 2008; Zhang, Meng *et al.*, 2008). As citocinas relacionadas à Th1 e Th2 inibem a diferenciação de células Th17, enquanto IL-17 não é capaz de inibir células Th1 e Th2 (Gocke, Cravens *et al.*, 2007). Entretanto, a supressão de IFN γ e IL-4 é uma das maneiras pela qual a citocina TGF- β pode promover a diferenciação de células Th17, porém essa diferenciação pode ocorrer também na ausência de IFN- γ e IL-4 (Harrington, Hatton *et al.*, 2005; Park, Li *et al.*, 2005). Os efeitos de TGF- β na diferenciação de células Th17 são dependentes de concentração, sendo que baixas doses induzem Th17, enquanto altas doses inibem o desenvolvimento de Th17 e promove o desenvolvimento de células T reguladoras (Tregs) (Manel, Unutmaz *et al.*, 2008).

A geração de células T produtoras de IFN- γ no ensaio de co-cultura é justificada pela citocina IL-12, citocina essencial para a diferenciação de células Th1 (Bettelli, Korn *et al.*, 2008). Todos os grupos de estímulo que promoveram um aumento significativo na produção da citocina IL-12 pelas CDs, grupos Levedura, Exo100 e RNA Lev10, foram capazes de ativar células T produtoras de IFN- γ . Apenas o grupo Levedura foi capaz de promover um aumento significativo na produção da citocina IL-10 pelas CDs, entretanto essa produção pode estar associada à super estimulação das CDs promovida pela Levedura.

De maneira interessante, consistente com a literatura (Korn, Bettelli *et al.*, 2009), a produção das citocinas IL-6 e TGF- β induziu células T a produzirem IL-17 nos ensaios de co-cultura. Os grupos Exo100 e RNA Hifa10 promoveram um aumento na produção de IL-6 e um aumento significativo de TGF- β pelas CDs e essas, por sua vez, foram capazes de ativar células T produtoras de IL-17. De modo semelhante, o grupo Levedura promoveu um aumento significativo de IL-6 e um aumento de TGF- β pelas CDs e essas também foram capazes de ativar células T produtoras de IL-17.

A interação de TGF- β e IL-6 na indução de fatores transcricionais de Th17 não está completamente entendida. Células T naive expressam um receptor funcional de IL-6 que é composto por IL-6R α e pela subunidade sinalizadora gp130. A estimulação de TCR, assim como a exposição a IL-6, promove diminuição da expressão e internalização desses receptores, consequentemente reduzindo a resposta a IL-6. Entretanto, a citocina TGF- β induz a expressão de IL-6R α e é necessária para manter a responsividade de células T a IL-6. Por sua vez, a citocina IL-6 leva a ativação de STAT3, a qual, juntamente com TGF- β , promove uma indução completa do fator de transcrição ROR γ t e permite a indução de células Th17 (Korn, Bettelli *et al.*, 2009).

Assim, embora os estímulos tenham gerado uma produção diferencial de IL-6 e TGF- β , o aumento de TGF- β parece ter sido essencial para a geração de células T produtoras de IL-17 no ensaio de co-cultura. Dessa maneira, o aumento significativo da porcentagem de células positivas para TGF- β intracelular para o grupo RNA Lev10, não deve estar representando uma quantidade suficiente de TGF- β para indução de células T produtoras de IL-17 no ensaio de co-cultura. A citocina IL-23, responsável pela manutenção e expansão da subpopulação Th17 (Korn, Bettelli *et al.*, 2009), foi detectada apenas para os grupos Levedura e Exo100 e, embora encontrada em níveis muito baixos, sua presença corrobora com dois dos três grupos (Levedura, Exo100 e RNA Hifa10) que induziram a ativação de células T produtoras de IL-17.

As células dendríticas são exclusivamente adaptadas em decodificar informações associadas aos patógenos. Sua capacidade em responder através de diferentes programas de ativação e de ativar vias distintas de sinalização frente a ligação de diferentes PRRs confere uma plasticidade única ao sistema de CDs e contribui para a modulação de respostas de células T em infecções e vacinações (Romani, 2011).

Recentemente, Torchinsky e cols. (2009), demonstraram que o reconhecimento de células apoptóticas infectadas direciona a síntese simultânea de citocinas anti-inflamatórias (TGF- β) e citocinas pró-inflamatórias (IL-6) pelas APCs e, dessa forma, gera condições ideais para a diferenciação de células Th17 (Torchinsky, Garaude *et al.*, 2009). Curiosamente, apesar de muitos estudos sobre células Th17, esse mecanismo foi o primeiro a propor um modelo fisiológico de diferenciação de células Th17 (Torchinsky, Garaude *et al.*, 2010). Esse mecanismo foi comprovado *in vivo* pelo modelo de infecção por *Citrobacter rodentium*, conhecido por induzir resposta do padrão Th17, no qual o bloqueio do fenômeno de apoptose anulou a resposta por células Th17 (Torchinsky, Garaude *et al.*, 2009).

Nesse contexto, algumas razões que podem justificar as ativações diferenciais de células T foram elaboradas: (i) a produção da citocina IL-12 foi decisiva para a geração de células T produtoras de IFN- γ e, como essa citocina também atua na inibição da diferenciação de células Th17 (Gocke, Cravens *et al.*, 2007), o aumento significativo da produção de IL-12 do grupo Levedura quando comparado ao grupo Exo100 pode explicar a menor ativação de células T produtoras de IL-17 para o grupo Levedura; (ii) o aumento na produção de TGF- β e IL-6 foi decisivo para a geração de células T produtoras de IL-17, sendo que o aumento significativo de TGF- β no grupo Exo100 quando comparado ao grupo Levedura pode explicar a maior ativação de células T produtoras de IL-17 para o grupo Exo100; (iii) apesar de não termos avaliado o fenômeno de apoptose nos ensaios, a indução de apoptose pelos estímulos pode gerar células apoptóticas infectadas, o que pode ser o mecanismo responsável pela geração de células T produtoras de IL-17 no ensaio de co-cultura.

As células dendríticas diferenciadas da medula óssea foram capazes de reconhecer os estímulos e geraram respostas diferenciais de células T primadas para o fungo *S. schenckii*, incluindo Th17. Esse resultado é inédito para o fungo em questão.

Quanto ao ensaio de proteção, primeiramente foi avaliado a expressão dos marcadores CD44 e CD62L em linfócitos CD4 e CD8. O marcador CD44 é uma molécula de adesão expressa em diversos tipos celulares, como macrófagos, linfócitos, granulócitos, fibroblastos, células endoteliais e epiteliais. O ácido hialurônico (AH), altamente expresso nas células endoteliais dos vasos sanguíneos, é o principal ligante de CD44. A forma padrão da molécula CD44 (CD44s) é expressa na maioria dos tecidos, sendo algumas isoformas (CD44v5) expressas principalmente em linfócitos T ativado. Linfócitos T não ativado expressam a isoforma CD44s, a qual possui baixa afinidade pelo AH. Após estimulação antigênica, os linfócitos T ativado passam a expressar grande quantidade da isoforma CD44v5, a qual auxilia os mesmos a migrarem para o sítio de inflamação, uma vez que esta isoforma possui grande afinidade pelo AH. Desse modo, CD44 é descrito como um marcador de ativação celular em decorrência do aumento de sua expressão após estimulação dos linfócitos T. Juntamente com as selectinas e integrinas, a molécula CD44 auxilia no processo de adesão celular e transmigração para sítios inflamados (Ponta, Sherman *et al.*, 2003).

Outra molécula de adesão é a L-selectina, também conhecida como CD62L, encontrada na maioria das células hematopoiéticas, como linfócitos B, T, monócitos, granulócitos e tímócitos. A CD62L é importante para direcionar linfócitos T virgens

para linfonodos periféricos e placas de Peyer e está envolvida no recrutamento de leucócitos para os sítios de inflamação. A molécula, expressa na superfície das células, é continuamente clivada da superfície de neutrófilos e linfócitos, um mecanismo conhecido como “shedding”. Após a ativação de linfócitos T, essa proteólise é aumentada, o que diminui a expressão de CD62L na superfície desses (Ley, Laudanna *et al.*, 2007). Por outro lado, enquanto células T de memória efetora (T_{EM}) também estão associadas a baixa expressão de CD62L, células T de memória central (T_{CM}) estão associadas com a alta expressão de CD62L (Wang e Plautz, 2010).

Alguns dados da literatura têm demonstrado o papel efetor e profilático das células CD4 e CD8 expressando os marcadores CD44 e CD62L em modelos experimentais de infecção bacteriana (Bonato, Lima *et al.*, 1998; Kipnis, Irwin *et al.*, 2005). Estes estudos demonstraram que as células efetoras expressando um fenótipo CD44^{hi}/CD62L^{lo} e apresentando, exclusivamente, uma vida curta eram capazes de proteger animais infectados com *Mycobacterium tuberculosis* (Roberts, Ely *et al.*, 2005). Por outro lado, Kipnis e cols. (2005) demonstraram que células T apresentando um fenótipo CD44^{lo}/CD62L^{hi}, característico de um estado memória ativada eram capazes de proteger os camundongos contra posterior desafio com *M. tuberculosis* (Kipnis, Irwin *et al.*, 2005). Assim, os resultados do presente estudo sugerem que a transferência adotiva de CDs previamente estimuladas com os diferentes tipos de antígenos fúngicos promove um aumento no número de células CD4 e CD8 efetoras ou de memória ativada, adequadas para conferir proteção ao fungo *S. schenckii*.

Na avaliação da carga fúngica por meio da determinação de Unidades Formadoras de Colônia (UFC), foi observada a ausência de crescimento no baço, resultado contraditório ao histopatológico aqui apresentado. Uma provável explicação para esse fato pode ser em decorrência da utilização do meio de cultura BHI de procedência Difco. Os dados das curvas de sobrevivência, da UFC e das análises histopatológicas dos animais infectados mostraram que esta cepa (1099-18) quando cultivada no meio Difco apresenta-se avirulenta quando comparada as células de levedura cultivadas no meio Oxoid, sugerindo que a variação no teor nutricional do meio de cultura foi determinante na modulação da virulência da cepa, ou seja, de células do *S. schenckii* com mesma carga genética (Teixeira, 2007). Em trabalho posterior, Teixeira e cols. (2010) demonstraram que a presença em maior quantidade de extrato de cérebro no BHI, observado para a marca Oxoid, permitia ao fungo um maior aporte de L-DOPA e conseqüentemente um aumento na expressão de melanina na parede da

levedura, o que, por fim, determina um aumento na virulência do fungo em termos de maior mortalidade, maior UFC e pior condição dos órgãos (Teixeira, De Castro *et al.*, 2010).

De maneira contrária, nossos resultados da histologia (Método Grocott) demonstraram a presença do fungo no baço dos animais do ensaio de proteção e nos possibilitou realizar uma correlação do tratamento com a diminuição da carga fúngica nesses animais.

Assim, de maneira interessante, os resultados do grupo RNAHifa e RNALevedura estão de acordo com um aumento significativo de células CD4/CD62Lhi e CD8/CD62Lhi, o que sugere a formação de memória central nesses grupos de tratamentos. Para o grupo Exo100, a melhora protetora está de acordo com um aumento significativo de células CD8/CD62Lhi, o que também sugere a formação de memória central nesse grupo.

Recentemente, Wuthrich e cols. (2011) demonstram que células Th17 conferem resistência em modelo vacinal para três fungos dimórficos: *Coccidioides posadasii*, *Histoplasma capsulatum*, e *Blastomyces dermatitidis*. Embora células Th17 foram eficientes de maneira independente de Th1 em conferir resistência vacinal para esses três fungos, uma resposta de perfil misto Th1/Th17 também foi capaz de promover proteção (Wuthrich, Gern *et al.*, 2011).

De maneira semelhante, o grupo de tratamento RNAHifa sugere que um modelo vacinal baseado na subpopulação Th17 é eficiente na indução da proteção à esporotricose sistêmica. Seguindo o raciocínio, o grupo Exo100, que sugere um modelo vacinal baseado nas subpopulações Th1/Th17, também demonstrou ser eficiente em diminuir a carga fúngica do animal. Por fim, o grupo RNALevedura, que sugere um modelo vacinal baseado na subpopulação Th1, apresentou atuação semelhante ao grupo Exo100.

Portanto, a indução de células Th17 parece estar associada com a proteção vacinal no modelo da esporotricose sistêmica. Estudos no sentido de avaliar a real relação entre as subpopulações de células T auxiliaadoras com a esporotricose sistêmica em modelo murino serão realizados em estudos posteriores.

CONCLUSÕES

- O protocolo de diferenciação para obtenção de CDs a partir de precursores da medula óssea apresentou um alto rendimento, com 70-80% das células sendo positivas para CD11c.
- As CDs diferenciadas a partir da medula óssea são capazes de reconhecer e modular positivamente a expressão das moléculas de MHCII e moléculas co-estimuladoras quando estimuladas em cultura com as formas leveduriformes, ou ExoA, ou RNA total das formas leveduriforme e miceliar do fungo *S. schenckii*
- As CDs foram capazes de reconhecer as células leveduriformes e o exoantígeno do fungo *S. schenckii*, com produção distinta de citocinas, e geraram respostas diferenciais com perfis mistos Th1/Th17 de resposta.
- As CDs foram capazes de reconhecer o RNA total de levedura do fungo *S. schenckii*, com grande produção de citocinas pró-inflamatórias, e promoveram ativação de células T com perfil Th1 de resposta.
- As CDs foram capazes de reconhecer o RNA total de hifa do fungo *S. schenckii*, com grande produção de TGF- β e IL-6, e promoveram ativação de células T com perfil Th17 de resposta.
- A citocina IL-12 foi essencial para a ativação de células T produtoras de IFN- γ , enquanto as citocinas TGF- β e IL-6 foram necessárias para ativação de células T produtoras de IL-17
- Os resultados da histologia e dos marcadores de ativação do linfócitos totais do baço sugerem efeito protetor no modelo da esporotricose sistêmica para os grupos de tratamento Exo100, RNA Hifa e RNA Levedura.
- A indução de células Th17 parece estar associada com a proteção vacinal no modelo da esporotricose sistêmica. A utilização das CDs *ex-vivo* como ferramentas protetoras para esporotricose exige estudos posteriores para melhor caracterização desse modelo vacinal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-TAWFIQ, J. A.; WOOLS, K. K. Disseminated Sporotrichosis and *Sporothrix schenckii* Fungemia as the Initial Presentation of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Clinical Infectious Diseases* [S.I.], v. 26, n. 6, p. 1403-1406, June 1, 1998.

ALBERT, M. L. *et al.* Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. *Nat Immunol* [S.I.], v. 2, n. 11, p. 1010-1017, 2001.

ALMEIDA-PAES, R. *et al.* Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. *Microbes Infect* [S.I.], v. 11, n. 5, p. 554-62, Apr 2009.

ALVIANO, C. S. *et al.* Sialic acids are surface components of *Sporothrix schenckii* yeast forms. *FEMS Microbiology Letters* [S.I.], v. 15, n. 3, p. 223-228, 1982.

ALVIANO, C. S. *et al.* Sialic acids in fungi: a minireview. *Glycoconj J* [S.I.], v. 16, n. 9, p. 545-54, Sep 1999.

AUSTYN, J. M. Dendritic cells. *Curr Opin Hematol* [S.I.], v. 5, n. 1, p. 3-15, Jan 1998.

BACCI, A. *et al.* Dendritic cells pulsed with fungal RNA induce protective immunity to *Candida albicans* in hematopoietic transplantation. *J Immunol* [S.I.], v. 168, n. 6, p. 2904-13, Mar 15 2002.

BAI, L. *et al.* Generation of dendritic cells from human bone marrow mononuclear cells: advantages for clinical application in comparison to peripheral blood monocyte derived cells. *Int J Oncol* [S.I.], v. 20, n. 2, p. 247-53, Feb 2002.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* [S.I.], v. 392, n. 6673, p. 245-252, 1998.

BARROS, M. B. *et al.* Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. *Clin Infect Dis* [S.I.], v. 38, n. 4, p. 529-35, Feb 15 2004.

BARROS, M. B. *et al.* [Sporotrichosis: development and challenges of an epidemic]. *Rev Panam Salud Publica* [S.I.], v. 27, n. 6, p. 455-60, Jun 2010.

BASHYAM, H. Ralph Steinman: dendritic cells bring home the Lasker. *J Exp Med* [S.I.], v. 204, n. 10, p. 2245-8, Oct 1 2007.

BECKER, Y. Immunological and regulatory functions of uninfected and virus infected immature and mature subtypes of dendritic cells--a review. *Virus Genes* [S.I.], v. 26, n. 2, p. 119-30, 2003.

BELL, A. A.; WHEELER, M. H. Biosynthesis and Functions of Fungal Melanins. *Annual Review of Phytopathology* [S.I.], v. 24, n. 1, p. 411-451, 1986.

BETTELLI, E. *et al.* Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* [S.I.], v. 453, n. 7198, p. 1051-7, Jun 19 2008.

BIONDO, C. *et al.* MyD88 and TLR2, but not TLR4, are required for host defense against *Cryptococcus neoformans*. *Eur J Immunol* [S.I.], v. 35, n. 3, p. 870-8, Mar 2005.

BONATO, V. L. *et al.* Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect Immun* [S.I.], v. 66, n. 1, p. 169-75, Jan 1998.

BOURGUIN, I. *et al.* Murine dendritic cells pulsed in vitro with *Toxoplasma gondii* antigens induce protective immunity in vivo. *Infect Immun* [S.I.], v. 66, n. 10, p. 4867-74, Oct 1998.

BOWERS, W. E.; BERKOWITZ, M. R. Differentiation of dendritic cells in cultures of rat bone marrow cells. *J Exp Med* [S.I.], v. 163, n. 4, p. 872-83, Apr 1 1986.

BOZZA, S. *et al.* Dendritic cell-based vaccination against opportunistic fungi. *Vaccine* [S.I.], v. 22, n. 7, p. 857-64, Feb 17 2004.

BOZZA, S. *et al.* A dendritic cell vaccine against invasive aspergillosis in allogeneic hematopoietic transplantation. *Blood* [S.I.], v. 102, n. 10, p. 3807-14, Nov 15 2003.

BUTLER, M. J.; DAY, A. W. Fungal melanins: a review. *Canadian Journal of Microbiology* [S.I.], v. 44, n. 12, p. 1115-1136, 1998.

CARLOS, I. Z. *et al.* Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. *Mycopathologia* [S.I.], v. 168, n. 1, p. 1-10, Jul 2009.

CARLOS, I. Z. *et al.* Host organism defense by a peptide-polysaccharide extracted from the fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia* [S.I.], v. 144, n. 1, p. 9-14, 1999.

CARLOS, I. Z. *et al.* Sporothrix schenckii lipid inhibits macrophage phagocytosis: involvement of nitric oxide and tumour necrosis factor-alpha. *Scand J Immunol* [S.I.], v. 57, n. 3, p. 214-20, Mar 2003.

CARLOS, I. Z. *et al.* Disturbances in the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor in disseminated murine sporotrichosis. *Mycopathologia* [S.I.], v. 127, n. 3, p. 189-94, Sep 1994.

CAUX, C. *et al.* GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* [S.I.], v. 360, n. 6401, p. 258-61, Nov 19 1992.

CHAMILOS, G. *et al.* Generation of IL-23 producing dendritic cells (DCs) by airborne fungi regulates fungal pathogenicity via the induction of T(H)-17 responses. *PLoS One* [S.I.], v. 5, n. 9, p. e12955, 2010.

CLAUDIA, M. *et al.* The interaction of fungi with dendritic cells: implications for Th immunity and vaccination. *Curr Mol Med* [S.I.], v. 2, n. 6, p. 507-24, Sep 2002.

CONTI DIAZ, I. A. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. *Mycopathologia* [S.I.], v. 108, n. 2, p. 113-6, Nov 1989.

D'OSTIANI, C. F. *et al.* Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *J Exp Med* [S.I.], v. 191, n. 10, p. 1661-74, May 15 2000.

DAN, J. M. *et al.* Cooperative stimulation of dendritic cells by *Cryptococcus neoformans* mannoproteins and CpG oligodeoxynucleotides. *PLoS One* [S.I.], v. 3, n. 4, p. e2046, 2008.

DE ARAUJO, T. *et al.* Sporotrichosis. *Int J Dermatol* [S.I.], v. 40, n. 12, p. 737-42, Dec 2001.

DE LIMA BARROS, M. B. *et al.* Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [S.I.], v. 96, n. 6, p. 777-9, Aug 2001.

DEEPE, G. S., JR.; GIBBONS, R. S. Interleukins 17 and 23 influence the host response to *Histoplasma capsulatum*. *J Infect Dis* [S.I.], v. 200, n. 1, p. 142-51, Jul 1 2009.

DOERING, T. L. *et al.* Melanin as a potential cryptococcal defence against microbicidal proteins. *Medical mycology (Oxford)* [S.I.], v. 37, n. 3, p. 175-81, 1999.

DUDZIAK, D. *et al.* Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* [S.I.], v. 315, n. 5808, p. 107-11, Jan 5 2007.

ELSON, C. O. *et al.* Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. *Gastroenterology* [S.I.], v. 132, n. 7, p. 2359-70, Jun 2007.

ESCHE, C. *et al.* The use of dendritic cells for cancer vaccination. *Current Opinion in Molecular Therapeutics* [S.I.], v. 1, p. 72-81, 1999.

FERNANDES, K. S. *et al.* Differences in virulence of *Sporothrix schenckii* conidia related to culture conditions and cell-wall components. *J Med Microbiol* [S.I.], v. 48, n. 2, p. 195-203, Feb 1999.

FERRANTINI, M. *et al.* Dendritic cells and cytokines in immune rejection of cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* [S.I.], v. 19, n. 1, p. 93-107, Feb 2008.

FIGUEIREDO, C. C. *et al.* The in vitro interaction of *Sporothrix schenckii* with human endothelial cells is modulated by cytokines and involves endothelial surface molecules. *Microbial Pathogenesis* [S.I.], v. 36, n. 4, p. 177-188, 2004.

FIGUEIREDO, C. C. *et al.* TGF-beta1 induces transendothelial migration of the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii* by a paracellular route involving extracellular matrix proteins. *Microbiology* [S.I.], v. 153, n. Pt 9, p. 2910-21, Sep 2007.

FUJII, S. *et al.* The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *J Exp Med* [S.I.], v. 199, n. 12, p. 1607-18, Jun 21 2004.

FUJIMURA, T. *et al.* Local expression of migration inhibitory factor and Th1 type cytokine mRNA in sporotrichosis lesions. *Acta Derm Venereol* [S.I.], v. 76, n. 4, p. 321-2, Jul 1996.

GAUTIER, G. *et al.* A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J Exp Med* [S.I.], v. 201, n. 9, p. 1435-46, May 2 2005.

GOCKE, A. R. *et al.* T-bet regulates the fate of Th1 and Th17 lymphocytes in autoimmunity. *J Immunol* [S.I.], v. 178, n. 3, p. 1341-8, Feb 1 2007.

GONZALEZ-JUARRERO, M. *et al.* Florid pulmonary inflammatory responses in mice vaccinated with Antigen-85 pulsed dendritic cells and challenged by aerosol with *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Immunol* [S.I.], v. 220, n. 1, p. 13-9, Nov 2002.

GORI, S. *et al.* Pulmonary sporotrichosis with hyphae in a human immunodeficiency virus-infected patient. A case report. *Acta Cytol* [S.I.], v. 41, n. 2, p. 519-21, Mar-Apr 1997.

GROCOTT, R. G. A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. *Am J Clin Pathol* [S.I.], v. 25, n. 8, p. 975-9, Aug 1955.

HANNA, S. A. *et al.* Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. *Microbes Infect* [S.I.], v. 2, n. 8, p. 877-84, Jul 2000.

HARRINGTON, L. E. *et al.* Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* [S.I.], v. 6, n. 11, p. 1123-32, Nov 2005.

HEKTOEN, L.; PERKINS, C. F. Refractory Subcutaneous Abscesses Caused by *Sporothrix Schenckii*. A New Pathogenic Fungus. *J Exp Med* [S.I.], v. 5, n. 1, p. 77-89, Oct 1 1900.

HOGAN, L. H. *et al.* Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev* [S.I.], v. 9, n. 4, p. 469-88, Oct 1996.

HUANG, W. *et al.* Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis* [S.I.], v. 190, n. 3, p. 624-31, Aug 1 2004.

IDE, F. *et al.* Peptide-loaded dendritic-cell vaccination followed by treatment interruption for chronic HIV-1 infection: a phase 1 trial. *J Med Virol* [S.I.], v. 78, n. 6, p. 711-8, Jun 2006.

INABA, K. *et al.* Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 90, n. 7, p. 3038-42, Apr 1 1993.

INABA, K. *et al.* Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* [S.I.], v. 176, n. 6, p. 1693-702, Dec 1 1992.

INABA, K. *et al.* Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J Exp Med* [S.I.], v. 188, n. 11, p. 2163-73, Dec 7 1998.

ITOH, M. *et al.* Survey of 200 cases of sporotrichosis. *Dermatologica* [S.I.], v. 172, n. 4, p. 209-13, 1986.

JOFFRE, O. *et al.* Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev* [S.I.], v. 227, n. 1, p. 234-47, Jan 2009.

KAJIWARA, H. *et al.* Impaired host defense against *Sporothrix schenckii* in mice with chronic granulomatous disease. *Infect Immun* [S.I.], v. 72, n. 9, p. 5073-9, Sep 2004.

KAPLAN, D. H. In vivo function of Langerhans cells and dermal dendritic cells. *Trends in Immunology* [S.I.], v. 31, n. 12, p. 446-451, 2010.

KIPNIS, A. *et al.* Memory T Lymphocytes Generated by Mycobacterium bovis BCG Vaccination Reside within a CD4⁺ CD44^{lo} CD62⁺ Ligandhi Population. *Infect. Immun.* [S.I.], v. 73, n. 11, p. 7759-7764, November 1, 2005 2005.

KLECHEVSKY, E. *et al.* Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14⁺ dermal dendritic cells. *Immunity* [S.I.], v. 29, n. 3, p. 497-510, Sep 19 2008.

KLEINSCHEK, M. A. *et al.* IL-23 enhances the inflammatory cell response in *Cryptococcus neoformans* infection and induces a cytokine pattern distinct from IL-12. *J Immunol* [S.I.], v. 176, n. 2, p. 1098-106, Jan 15 2006.

KOGA, T. *et al.* Immunohistochemical detection of interferon-gamma-producing cells in granuloma formation of sporotrichosis. *Med Mycol* [S.I.], v. 40, n. 2, p. 111-4, Apr 2002.

KORN, T. *et al.* IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* [S.I.], v. 27, p. 485-517, 2009.

LANGERHANS, P. Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Archiv* [S.I.], v. 44, n. 2, p. 325-337, 1868.

LEY, K. *et al.* Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* [S.I.], v. 7, n. 9, p. 678-89, Sep 2007.

LIMA, O. C. *et al.* Immunofluorescence and flow cytometry analysis of fibronectin and laminin binding to *Sporothrix schenckii* yeast cells and conidia. *Microb Pathog* [S.I.], v. 37, n. 3, p. 131-40, Sep 2004.

LIMA, O. C. *et al.* Adhesion of the human pathogen *Sporothrix schenckii* to several extracellular matrix proteins. *Braz J Med Biol Res* [S.I.], v. 32, n. 5, p. 651-7, May 1999.

LIMA, O. C. *et al.* Involvement of fungal cell wall components in adhesion of *Sporothrix schenckii* to human fibronectin. *Infect Immun* [S.I.], v. 69, n. 11, p. 6874-80, Nov 2001.

LIU, Y.-J. IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors. *Annual Review of Immunology* [S.I.], v. 23, n. 1, p. 275-306, 2005.

LLOYD, K. O.; BITOON, M. A. Isolation and purification of a peptido-rhamnomannan from the yeast form of *Sporothrix schenckii*. Structural and immunochemical studies. *J Immunol* [S.I.], v. 107, n. 3, p. 663-71, Sep 1971.

LOPES-BEZERRA, L. M. *et al.* *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *An Acad Bras Cienc* [S.I.], v. 78, n. 2, p. 293-308, Jun 2006.

LOPES, J. O. *et al.* Filamentous forms of *Sporothrix schenckii* in material from human lesions. *J Med Vet Mycol* [S.I.], v. 30, n. 5, p. 403-6, 1992.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* [S.I.], v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov 1951.

LU, L. *et al.* Generation of DC from mouse spleen cell cultures in response to GM-CSF: immunophenotypic and functional analyses. *Immunology* [S.I.], v. 84, n. 1, p. 127-34, Jan 1995.

LU, W. *et al.* Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat Med* [S.I.], v. 10, n. 12, p. 1359-65, Dec 2004.

LUTZ, A.; SPLENDORE, A. Sobre uma mycose observada em homens e ratos: contribuição para o conhecimento das assim chamadas esporotricoses. *Rev Med São Paulo* [S.I.], v. 21, p. 433-450, 1907.

LUTZ, M. B. IL-3 in dendritic cell development and function: a comparison with GM-CSF and IL-4. *Immunobiology* [S.I.], v. 209, n. 1-2, p. 79-87, 2004.

LUTZ, M. B. *et al.* An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* [S.I.], v. 223, n. 1, p. 77-92, Feb 1 1999.

LUTZ, M. B.; ROSSNER, S. Factors influencing the generation of murine dendritic cells from bone marrow: the special role of fetal calf serum. *Immunobiology* [S.I.], v. 212, n. 9-10, p. 855-62, 2007.

LUTZ, M. B. *et al.* Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur J Immunol* [S.I.], v. 30, n. 7, p. 1813-22, Jul 2000.

LYON, G. M. *et al.* Population-based surveillance and a case-control study of risk factors for endemic lymphocutaneous sporotrichosis in Peru. *Clin Infect Dis* [S.I.], v. 36, n. 1, p. 34-9, Jan 1 2003.

MACATONIA, S. E. *et al.* Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* [S.I.], v. 154, n. 10, p. 5071-9, May 15 1995.

MAIA, D. C. *et al.* Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia* [S.I.], v. 161, n. 1, p. 11-9, Jan 2006.

MALDONADO-LOPEZ, R. *et al.* Cytokines regulate the capacity of CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells to prime Th1/Th2 cells in vivo. *J Immunol* [S.I.], v. 167, n. 8, p. 4345-50, Oct 15 2001.

MANEL, N. *et al.* The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat. *Nat Immunol* [S.I.], v. 9, n. 6, p. 641-9, Jun 2008.

MANSOUR, M. K. *et al.* Cryptococcus neoformans glycoantigens are captured by multiple lectin receptors and presented by dendritic cells. *J Immunol* [S.I.], v. 176, n. 5, p. 3053-61, Mar 1 2006.

MATTER, S. E. *et al.* Immune deficiency presenting as disseminated sporotrichosis. *J Okla State Med Assoc* [S.I.], v. 77, p. 114-7, 1984.

MEIER, A. *et al.* Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for Aspergillus-induced activation of murine macrophages. *Cell Microbiol* [S.I.], v. 5, n. 8, p. 561-70, Aug 2003.

MENDES-GIANNINI, M. J. *et al.* Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* [S.I.], v. 8, n. 6, p. 1550-9, May 2006.

MENDEZ TOVAR, L. J. *et al.* [Unknown fixed cutaneous sporotrichosis]. *Rev Iberoam Micol* [S.I.], v. 21, n. 3, p. 150-2, Sep 2004.

MENGES, M. *et al.* IL-4 supports the generation of a dendritic cell subset from murine bone marrow with altered endocytosis capacity. *J Leukoc Biol* [S.I.], v. 77, n. 4, p. 535-43, Apr 2005.

MENGES, M. *et al.* Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med* [S.I.], v. 195, n. 1, p. 15-21, Jan 7 2002.

MERAD, M.; MANZ, M. G. Dendritic cell homeostasis. *Blood* [S.I.], v. 113, n. 15, p. 3418-27, Apr 9 2009.

MOLL, H. Dendritic cells as a tool to combat infectious diseases. *Immunology Letters* [S.I.], v. 85, n. 2, p. 153-157, 2003.

MONTELEONE, I. *et al.* Interleukin-23 and Th17 cells in the control of gut inflammation. *Mediators Inflamm* [S.I.], v. 2009, p. 297645, 2009.

MORRIS-JONES, R. *et al.* Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. *Infect Immun* [S.I.], v. 71, n. 7, p. 4026-33, Jul 2003.

MOSER, M.; MURPHY, K. M. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol* [S.I.], v. 1, n. 3, p. 199-205, Sep 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* [S.I.], v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983.

MUIR, D. B.; PRITCHARD, R. C. Sporothrix schenckii--incidence in the Sydney region. *Australas J Dermatol* [S.I.], v. 25, n. 1, p. 27-8, Apr 1984.

NAPOLITANI, G. *et al.* Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol* [S.I.], v. 6, n. 8, p. 769-76, Aug 2005.

NASCIMENTO, R. C.; ALMEIDA, S. R. Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* [S.I.], v. 43, n. 2, p. 241-7, Feb 1 2005.

NASCIMENTO, R. C. *et al.* Passive immunization with monoclonal antibody against a 70-kDa putative adhesin of Sporothrix schenckii induces protection in murine sporotrichosis. *Eur J Immunol* [S.I.], v. 38, n. 11, p. 3080-9, Nov 2008.

NETEA, M. G. *et al.* Toll-like receptor 2 suppresses immunity against Candida albicans through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol* [S.I.], v. 172, n. 6, p. 3712-8, Mar 15 2004.

NEYRA, E. *et al.* Epidemiology of human sporotrichosis investigated by amplified fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* [S.I.], v. 43, n. 3, p. 1348-52, Mar 2005.

NOBRE, M. O. *et al.* Virulence differences between albino and pigmented Sporothrix schenckii isolates. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology* [S.I.], v. 18, n. 4, p. 191-197, 2008.

O'GARRA, A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* [S.I.], v. 8, n. 3, p. 275-83, Mar 1998.

O'NEILL, H. C. *et al.* Dendritic cell development in long-term spleen stromal cultures. *Stem Cells* [S.I.], v. 22, n. 4, p. 475-86, 2004.

ODA, L. M. *et al.* Ingestion of yeast forms of Sporothrix schenckii by mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun* [S.I.], v. 39, n. 2, p. 497-504, Feb 1983.

PALMA, M. *et al.* Development of a dendritic cell-based vaccine for chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Immunol Immunother* [S.I.], v. 57, n. 11, p. 1705-10, Nov 2008.

PAPPAS, P. G. *et al.* Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity. *Clin Infect Dis* [S.I.], v. 30, n. 1, p. 65-70, Jan 2000.

PARK, H. *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* [S.I.], v. 6, n. 11, p. 1133-41, Nov 2005.

PIETRELLA, D. *et al.* *Candida albicans* mannoprotein influences the biological function of dendritic cells. *Cell Microbiol* [S.I.], v. 8, n. 4, p. 602-12, Apr 2006.

POLONELLI, L.; MORACE, G. Exoantigen Studies of *Sporothrix schenckii*, *Ceratocystis minor*, and *Graphium penicilliodes* cultures. *J. Clin. Microbiol.* [S.I.], v. 15, n. 3, p. 362-365, March 1, 1982 1982.

PONTA, H. *et al.* CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* [S.I.], v. 4, n. 1, p. 33-45, Jan 2003.

PULENDRAN, B. *et al.* Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *J Immunol* [S.I.], v. 159, n. 5, p. 2222-31, Sep 1 1997.

REICHARDT, V. L. *et al.* Dendritic cells in vaccination therapies of human malignant disease. *Blood Rev* [S.I.], v. 18, n. 4, p. 235-43, Dec 2004.

RIPPON, J. W. *Medical Mycology: The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes*. Philadelphia: WB Saunders Co, 1988.

ROBERTS, A. D. *et al.* Differential contributions of central and effector memory T cells to recall responses. *The Journal of Experimental Medicine* [S.I.], v. 202, n. 1, p. 123-133, July 4, 2005 2005.

ROMAGNOLI, G. *et al.* The interaction of human dendritic cells with yeast and germ-tube forms of *Candida albicans* leads to efficient fungal processing, dendritic cell maturation, and acquisition of a Th1 response-promoting function. *J Leukoc Biol* [S.I.], v. 75, n. 1, p. 117-26, Jan 2004.

ROMANI, L. Cell mediated immunity to fungi: a reassessment. *Med Mycol* [S.I.], v. 46, n. 6, p. 515-29, Sep 2008.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* [S.I.], v. 11, n. 4, p. 275-88, Apr 2011.

ROMANI, N. *et al.* Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* [S.I.], v. 180, n. 1, p. 83-93, Jul 1 1994.

ROMERO-MARTINEZ, R. *et al.* Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect Immun* [S.I.], v. 68, n. 6, p. 3696-703, Jun 2000.

RUIZ-BACA, E. *et al.* Isolation and some properties of a glycoprotein of 70 kDa (Gp70) from the cell wall of *Sporothrix schenckii* involved in fungal adherence to dermal extracellular matrix. *Med Mycol* [S.I.], v. 47, n. 2, p. 185-96, Mar 2009.

SASSA, M. F. *et al.* Response of macrophage Toll-like receptor 4 to a *Sporothrix schenckii* lipid extract during experimental sporotrichosis. *Immunology* [S.I.], v. 128, n. 2, p. 301-9, Oct 2009.

SCHEICHER, C. *et al.* Dendritic cells from mouse bone marrow: in vitro differentiation using low doses of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol Methods* [S.I.], v. 154, n. 2, p. 253-64, Oct 2 1992.

SCHREURS, M. W. *et al.* Generation and functional characterization of mouse monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* [S.I.], v. 29, n. 9, p. 2835-41, Sep 1999.

SCHUBACH, T. M. *et al.* Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). *Med Mycol* [S.I.], v. 44, n. 1, p. 87-92, Feb 2006.

SCOTT, E. N.; MUCHMORE, H. G. Immunoblot analysis of antibody responses to *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol* [S.I.], v. 27, n. 2, p. 300-4, Feb 1989.

SHANKARAN, V. *et al.* IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* [S.I.], v. 410, n. 6832, p. 1107-11, Apr 26 2001.

SHIMONAKA, H. *et al.* Immunochemical Studies on the Human Pathogen *Sporothrix schenckii*: Effects of Chemical and Enzymatic Modification of the Antigenic Compounds upon Immediate and Delayed Reactions. *Infect. Immun.* [S.I.], v. 11, n. 6, p. 1187-1194, June 1, 1975 1975.

SHKLOVSKAYA, E. *et al.* Epidermal and Dermal Dendritic Cells Display Differential Activation and Migratory Behavior While Sharing the Ability to Stimulate CD4⁺ T Cell

Proliferation In Vivo. *The Journal of Immunology* [S.I.], v. 181, n. 1, p. 418-430, July 1, 2008.

SHORTMAN, K.; NAIK, S. H. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* [S.I.], v. 7, n. 1, p. 19-30, Jan 2007.

SRIVASTAVA, P. K. Therapeutic cancer vaccines. *Curr Opin Immunol* [S.I.], v. 18, n. 2, p. 201-5, Apr 2006.

STEINMAN, R. M. Lasker Basic Medical Research Award. Dendritic cells: versatile controllers of the immune system. *Nat Med* [S.I.], v. 13, n. 10, p. 1155-9, Oct 2007.

STEINMAN, R. M. *et al.* Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. *J Exp Med* [S.I.], v. 141, n. 4, p. 804-20, Apr 1 1975.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* [S.I.], v. 137, n. 5, p. 1142-62, May 1 1973.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med* [S.I.], v. 139, n. 2, p. 380-97, Feb 1 1974.

STEINMAN, R. M. *et al.* Dendritic cells are the principal stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *J Exp Med* [S.I.], v. 157, n. 2, p. 613-27, Feb 1 1983.

STEINMAN, R. M. *et al.* TOLEROGENTIC DENDRITIC CELLS*. *Annual Review of Immunology* [S.I.], v. 21, n. 1, p. 685-711, 2003.

STEINMAN, R. M.; HEMMI, H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* [S.I.], v. 311, p. 17-58, 2006.

STEINMAN, R. M. *et al.* Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J Exp Med* [S.I.], v. 149, n. 1, p. 1-16, Jan 1 1979.

STEINMAN, R. M. *et al.* Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. *J Exp Med* [S.I.], v. 139, n. 6, p. 1431-45, Jun 1 1974.

STEVENS, D. A. *et al.* Virulent isolates and mutants of *Blastomyces* in mice: a legacy for studies of pathogenesis. *Semin Respir Infect* [S.I.], v. 12, n. 3, p. 189-95, Sep 1997.

TEIXEIRA, P. A. *et al.* L-DOPA accessibility in culture medium increases melanin expression and virulence of *Sporothrix schenckii* yeast cells. *Med Mycol* [S.I.], v. 48, n. 5, p. 687-95, Aug 2010

TEIXEIRA, P. A. *et al.* Cell surface expression of adhesins for fibronectin correlates with virulence in *Sporothrix schenckii*. *Microbiology* [S.I.], v. 155, n. Pt 11, p. 3730-8, Nov 2009.

TEIXEIRA, P. A. C. *ESTUDO COMPARATIVO ENTRE A VIRULÊNCIA E A ADESIVIDADE, E MODULAÇÃO DA VIRULÊNCIA DO FUNGO SPOROTHRIX SCHENCKII*. Rio de Janeiro. 2007

TORCHINSKY, M. B. *et al.* Infection and apoptosis as a combined inflammatory trigger. *Curr Opin Immunol* [S.I.], v. 22, n. 1, p. 55-62, Feb 2010.

TORCHINSKY, M. B. *et al.* Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation. *Nature* [S.I.], v. 458, n. 7234, p. 78-82, Mar 5 2009.

UENOTSUCHI, T. *et al.* Differential induction of Th1-prone immunity by human dendritic cells activated with *Sporothrix schenckii* of cutaneous and visceral origins to determine their different virulence. *Int Immunol* [S.I.], v. 18, n. 12, p. 1637-46, Dec 2006.

VREMEC, D. *et al.* The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J Exp Med* [S.I.], v. 176, n. 1, p. 47-58, Jul 1 1992.

WANG, L.-X.; PLAUTZ, G. E. Tumor-Primed, In Vitro-Activated CD4+ Effector T Cells Establish Long-Term Memory without Exogenous Cytokine Support or Ongoing Antigen Exposure. *The Journal of Immunology* [S.I.], v. 184, n. 10, p. 5612-5618, May 15, 2010 2010.

WASYLNKA, J. A.; MOORE, M. M. Adhesion of *Aspergillus* species to extracellular matrix proteins: evidence for involvement of negatively charged carbohydrates on the conidial surface. *Infect Immun* [S.I.], v. 68, n. 6, p. 3377-84, Jun 2000.

WUTHRICH, M. *et al.* Vaccine-induced protection against 3 systemic mycoses endemic to North America requires Th17 cells in mice. *J Clin Invest* [S.I.], v. 121, n. 2, p. 554-68, Feb 1 2011.

YAROVINSKY, F. *et al.* TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* [S.I.], v. 308, n. 5728, p. 1626-9, Jun 10 2005.

YE, P. *et al.* Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* [S.I.], v. 194, n. 4, p. 519-27, Aug 20 2001.

ZHANG, F. *et al.* Interactions among the transcription factors Runx1, ROR γ and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* [S.I.], v. 9, n. 11, p. 1297-306, Nov 2008.

CAPÍTULO II

Manuscript Number:

Title: DENDRITIC CELL ARE ABLE TO DIFFERENTIALLY RECOGNIZE SPOROTHRIX SCHENCKII ANTIGENS AND PROMOTE TH1/TH17 RESPONSE IN VITRO

Article Type: Research Paper

Keywords: DCs; Immunomodulation; Tcell; *S. schenckii*; Exoantigen.

Corresponding Author: Mr Felipe Fortino Verdan, M.S

Corresponding Author's Institution: São Paulo State University - UNESP

First Author: Felipe Fortino Verdan, M.S

Order of Authors: Felipe Fortino Verdan, M.S; Josana C Faleiros, Graduate Degree; Lucas S Ferreira, M.S; Luis Gustavo S Monnazzi, Postdoc; Danielle C Maia, Postdoc; Aline Tansini, PhD; Marisa C Placeres; Iracilda Z Carlos, Postdoc professor; Rubens R Santos-Junior, Postdoc Professor

Abstract: Sporotrichosis is a disease caused by the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*. The main clinical manifestations occur on the skin, however the number of systemic and visceral cases has increased, especially in immunocompromised patients. Dendritic cells are highly capable of recognizing the fungus associated data and translate it into differential T cells responses both in vivo and in vitro. Although, the mechanisms involved in the interaction between DCs and *S. schenckii* are not fully elucidated. The study aimed to investigate the phenotypic and functional changes in bone marrow dendritic cells stimulated in vitro with the yeast form or exoantigen from *S. schenckii* and its ability to trigger a cellular immune response. Our results demonstrated that live yeast-form from *S. schenckii* and exoantigen, on its higher dose, were able to activate BMDC and made them fully capable of triggering T cell responses in vitro. Whereas the Yeast group promoted a more enunciated IFN- γ production than IL-17, the Exo100 group generated a similar production of both cytokines. The exoantigen stimulus suggest an ability in deviating the immune response from an effector Th1 to inflammatory Th17 response. Interestingly, only Exo100 group was capable to promote the production of IL-6 and a significant increase on TGF- β , in addition with IL-23 detection. Our data demonstrated the plasticity of DC on translating the data associated with the fungus *S. schenckii* and ExoAg into differential T cells response in vitro. The possibility of using ex vivo-generated DCs as vaccinal and therapeutic tools for sporotrichosis is a challenge for the future.

Suggested Reviewers: Luigina Romani
Has a world recognized knowledge on antifungal immunity.

Lucy A. Gildea
Has experience in DC translating the fungus associated data and the whole interaction between both.

DENDRITIC CELL ARE ABLE TO DIFFERENTIALLY RECOGNIZE *SPOROTHRIX SCHENCKII* ANTIGENS AND PROMOTE TH1/TH17 RESPONSE IN VITRO

Verdan, F.F.^{a1}; Faleiros, J.C.^a; Ferreira, L.S.^a; Monnazzi, L.G.S.^b; Maia, D.C.G.^a; Tansine, A.^a; Placeres, M.C.P.^a; Carlos, I.Z.^{a2}; Santos-Junior, R.R.^{a†}

a. *Department of Clinical Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University, Araraquara, São Paulo, Brazil. Postal code 14801-902*

b. *Department of Biologic Science, Faculty of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University, Araraquara, São Paulo, Brazil. Postal code 14801-901*

1. Corresponding first author - felipefortino@yahoo.com.br

2. Corresponding supervisor - carlosiz@fcar.unesp.br

†. In Memory

Keywords: DCs, Immunomodulation, Tcell, *S. schenckii* and *Exoantigen*.

Abbreviations list:

APC – Antigen presenting cell

BMDC – Bone Marrow dendritic cell

CD-80 – Cluster of differentiation 80

CD-86 – Cluster of differentiation 86

CD4 – Cluster of differentiation 4

DC – Dendritic cell

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay

GM-CSF - granulocyte–macrophage colony-stimulating factor

LPS - Lipopolysaccharide

IFN- γ – Interferon γ

IL – Interleukin

mAbs – monoclonal antibodies

MHC – Major histocompatibility complex

PAMP – Pathogen associated molecular patterns

PRR – Pattern recognition receptors

TGF- β – Transforming growth factor β

Th – T helper cell

TNF- α – Tumor necrosis factors α

1. Introduction

Sporothrix schenckii is a thermally dimorphic fungus that causes sporotrichosis, a sub acute or chronic mycosis characterized by nodular lesions of cutaneous or subcutaneous tissues associated with localized lymphangitis and lymphadenopathy (Rafal and Rasmussen 1991). Sporotrichosis is the most common subcutaneous mycosis in South America and lately Japan and North America are already considered endemic areas (Barros, Schubach Ade et al. 2004). The extent of disease varies according to the immune status of the host. As sporotrichosis has a more severe behavior in nude mice (Dickerson, Taylor et al. 1983) and in patients with acquired immune deficiency syndrome, T-cell mediated immunity appears to have a main role in limiting the progression of infection (Aarestrup, Guerra et al. 2001; Losman and Cavanaugh 2004).

The peptide-polysaccharide readily extracted from the fungus, known as exoantigen (ExoAg), has shown its importance as a virulence factor for sporotrichosis (Nascimento, Espindola et al. 2008; Teixeira, de Castro et al. 2009). One of the most studied *S. schenckii* antigen, a fractioned protein of 70KDa was recently described by two different groups as a putative adhesin protein (Nascimento, Espindola et al. 2008; Ruiz-Baca, Toriello et al. 2009). Moreover, Carlos and co-workers have demonstrated ExoAg mitogenic activity in lymphocyte culture (Carlos, Sgarbi et al. 1998).

The pathogens presents molecular signatures, highly conserved, described as pathogens associated molecular patterns (PAMP). Through a vast repertoire of pathogen recognition receptors (PRR), dendritic cells are able to translate the pathogen associated data and enter profound phenotypical and functional changes and acquire an activated status. The activated status are represented by three typical signs, high levels of MHC, co-stimulatory molecules as

CD80 and CD86, and cytokine production, which make these cells capable to present antigens to T cells and promote the differentiation and expansion of them (Joffre, Nolte et al. 2009).

Dendritic cells (DC) play a key role in regulating the balance between the pro- and anti-inflammatory responses that are required to augment or attenuate cellular immunity (Segal 2007). The cytokines profiles released by DC initiate a cellular immunity through different pathways. Each pathway orchestrates specific responses through new cytokines profiles and effectors cells. The most known pathways are Th1 and Th2 but recently a new pathway have being described, known as Th17(Zhu, Yamane et al. 2010).

Recent data demonstrated that DC are able to translate fungus associated data and coordinate an inflammatory response and protection against fungal infection (d'Ostiani, Del Sero et al. 2000; Bacci, Montagnoli et al. 2002; Bozza, Perruccio et al. 2003). The acquired cellular response to *S. schenckii* antigens is associated with the immune mechanisms which controls the infection, although the specific role of DC in sporotrichosis is not fully understood. Uenotsuchi and cols. demonstrated that human monocyte-derived DC promoted a differential cellular response when stimulated with *S. schenckii* fungus derived from patients with two distinct clinical manifestations, visceral and cutaneous. The immature DC stimulated with the cutaneous origin fungus were more potent on activating a Th1 response when compared with DC stimulated with the visceral origin fungus (Uenotsuchi, Takeuchi et al. 2006).

Considering that, our study aimed to investigate the phenotypic and functional changes in bone marrow dendritic cells (BMDC) stimulated in vitro with the yeast form or ExoAg from *S. schenckii* and its ability to trigger a cellular immune response in vitro.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Female 6-12 week old C57BL/6 mice were purchased from Multidisciplinary Center for Biological Research (CEMIB), University of Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brazil. They were kept under specific pathogen-free (SPF) conditions on our own animal facilities. All procedures were approved by our Institutional Ethics Committee (Protocol CEP/FCF/CAr n° 10/2009) and were in accordance with the National Institutes of Health Animal Care Guidelines.

2.2. The fungus

Sporothrix schenckii, strain 1099-18, was kindly provided by Dr. Celuta Sales Alviano, Institute of Microbiology, Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil. This strain was isolated from a human case of sporotrichosis at the Mycology Section of the Department of Dermatology, Columbia University, New York, NY, USA. The fungus was cultured at 37 °C for 7 days in brain heart infusion (BHI) broth (DIFCO) with constant orbital shaking at 150 cycles/min, resulting in a suspension of yeast cells.

2.3. Infection method

A yeast suspension was prepared containing 1×10^8 cells/mL in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. A volume of 0.1 mL was inoculated intraperitoneally into each animal.

2.4. Preparation of ExoAg

The ExoAg was obtained as described previously by Carlos and cols. (Carlos, Sgarbi et al. 2003) with minor modifications. The yeast phase fungal culture was subjected to UV radiation for 1 h. Then the culture was shaken at 37 °C for 24 h and UV-irradiated again for 1 h. After this procedure, thimerosal was added to the culture medium at 1/ 5000 concentration and the culture was shaken at 37 °C for 48 h. Next the culture sterility was tested by Sabouraud agar test. The

cellular suspension was then centrifuged and the supernatant was filtered on cellulose ester membrane 0.45 μm size pore (Millipore) and concentrated from 50 up to 100 folds by polyethyleneglicol. The protein concentration (9.5 mg/mL) was measured by the Lowry method (Lowry, Rosebrough et al. 1951) . The exoantigen was tested for cytotoxicity against murine cells and the higher dose (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) had a surviving rate of more than 80% (Mosmann 1983).

2.5. Bone marrow preparation and generation of bone marrow-derived dendritic cells (BMDC)

Femurs and tibiae of C57BL/6 mice were removed aseptically and were left in 70% ethanol for 2–5 min for disinfections and washed two times with RPMI-1640 (SIGMA). Then both bones ends were cut with scissors and the marrow was flushed with RPMI-1640 using a 10 mL syringe (BD Bioscience) with a 0.45 mm diameter needle. Clusters within the marrow cells suspension were disintegrated by vigorous pipetting. The bone marrow cells suspension was depleted of red blood cells (RBC) using ACK lysing buffer and washed with RPMI-1640. The bone marrow cells were adjusted and cultured in RPMI-1640 containing 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, 50 μM β -mercaptoethanol, 1 mM sodium pyruvate, as well as 30 $\eta\text{g}/\text{mL}$ recombinant murine granulocyte–macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and 10 $\eta\text{g}/\text{mL}$ recombinant murine IL-4 (BD Bioscience). Two and four days after initial culture, cells were replenished with fresh medium supplemented with GM-CSF and IL-4. On day six, the DC were washed and replenished with fresh medium plus yeast fungus at DC:yeast cells ratio of 1:1, or ExoAg (10 or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), or LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), or only medium by 24h at 37 $^{\circ}\text{C}$. For the live yeast stimulus 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of amphotericin was added in the culture 2 hours after the live yeast stimulus itself for blockade of fungus overgrowing. The nine day differentiation assay was only performed for comparison of efficiency and the protocol were similar, where the

addition of GM-CSF and IL-4 was made on day zero, two, four, six and eight. At the end of incubation, the supernatant were collected for cytokine measurement by ELISA and all DC were harvested, washed three times with PBS, phenotypically analyzed by flow cytometry or co-cultured with primed T cells from C57BL/6 at DC/Tcell ratio of 1:9 for 72 hours at 37 °C.

2.6. Flow Cytometry analysis

The phenotypical changes of stimulated DC were determined with mAbs specific for DC activation surface markers. We evaluated the expression of CD11c, MHCII, CD80 and CD86 molecules. The unspecific binding sites were blocked by Fc Block™ and all antibodies were analyzed against their specific isotype controls. Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled mAbs: CD11c (clone: HL3). Phycoerythrin (PE)-labeled mAbs were also used: MHC II (I-A^b) (clone: AF6-120.1), CD80 (clone: 16-10A1) and CD86 (clone: GL1). All mAbs were purchased from BD Bioscience PharMingen and were used according to manufacturer instructions. Thirty thousand events were acquired per tube on a FACSCanto™ flow cytometry (Becton & Dickinson, San Diego, CA, USA) and analyzed on FACSDiva™ software.

2.7. Cytokine assay

The cytokines profiles released into the supernatant of stimulated DC cultures and DC/Tcell co-culture was analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) performed in 96-well plates. It was measured the concentration of IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-12p70, IL-23 and TGF- β on supernatant of stimulated DC and IFN- γ , IL-17, IL-5 and IL-4 on supernatant of DC/Tcell co-culture. The IL-17 and IL-23 Elisa kit was acquired from e-Bioscience, whereas the others kits was from PharMingen. The assay was performed as described by the manufacturer (PharMingen and eBioscinces). Briefly, the 96 well plates (Corning: NY,USA) were coated overnight at room temperature with 100 μ L/well of a purified rat anti-mouse cytokine capture antibody. After wash,

the plates were incubated with 200 μL /well of blocking solution (PBS 10% FBS) for one hour. A new wash was performed and standard murine cytokines or samples (supernatant of culture) were added to appropriate wells and incubated at room temperature for two hours. After incubation time, the plates were washed again and 100 μL /well of working detector (detection antibody plus streptavidin-horseradish peroxidase conjugate) was added. One hour later the plate was washed and incubated with 100 μL /well of substrate solution, tetramethylbenzidine (PharMingen), for 30 minutes. At this time the plate was protected from light and the reaction was stopped with the addition of 50 μL /well of stop solution (H_2SO_4 2N). The absorbance was read at 450nm on a Multiskan Ascent ELISA microplate reader (Multiskan Ascent, Labsystems), and the results were expressed in picograms/mL.

2.8. Cytokines release in DC/Tcell co-culture assay

To evaluate the immunomodulation effect of stimulated DC on T cells from mice previously challenged with 1×10^7 yeast cells of *S. schenckii* i.p., the spleen was removed and the cells were incubated for 2 hours for macrophage adherence. The non adherent cells were collected and the resulting total lymphocytes suspension were co-cultured with DC previously stimulated with the yeast (1:1), or 10 or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ExoAg, or 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LPS, or only medium, in round-bottom 96-well plates at DC:T-cell ratio of 1:9 for 72 hour at 37 °C. The supernatants were harvested after 72 hours of co-culture and the cytokines IFN- γ , IL-17, IL-5 and IL-4 were assessed by ELISA assay.

2.9. Statistical analysis

Results are representative of three independent experiments and are presented as the mean \pm SD of duplicate observations. Statistical significance was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test, and values of $p < 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1. Bone Marrow DC acquired an activated state after fungal antigens stimulation

3.1.1. Morphological changes on differentiation process and CD11c surface marker

The morphological changes of the precursor cells on differentiation process were accompanied daily on an inverted optical microscope. On the first day of culture the cells presented typical precursors cells morphology, with small size, globular shape and smooth surface (Fig. 1A). On day three cells had differentiated into elongated cells and dendrites were already observed on most cells, generally as a single dendrite (Fig. 1 B). On day six and nine the cells had already acquired dendritic cells morphology, with the typical stellar aspect and bigger size (Fig. 1C and 1D). The expression of CD11c surface marker was evaluated to measure the differentiation process efficiency. On day six approximately 80% of differentiated cells expressed the typical DC surface marker CD11c (Fig. 1E) and on day nine it increased to approximately 90% of the cells (Fig. 1E). However, although the nine day had better efficiency on generating dendritic cells, the number of viable cells on the sixth day of differentiation was higher than the number of viable cells obtained on the ninth day as analyzed by Trypan exclusion method (data not shown). On day nine most cells presented a granular cytoplasm indicating suffering cells (Fig. 1 D).

3.1.2. Activation markers were upregulated on DC after stimulation

The DC was stimulated with live yeasts of the fungus *Sporothrix schenckii* and its ExoAntigen (ExoAg) on low (10µg/mL) and high (100µg/mL) doses. The viability test (MTT) was performed as described by Mosman (Mosmann 1983) for exoantigen on both doses, live yeast and with surviving rate higher than 80% in DC. Initially, intending to evaluate the

phenotypical changes of DC upon stimulation the expression of MHC and co-stimulatory molecules CD80 and CD86 was assessed. Both live yeast (Yeast group) and ExoAg (Exo10 and Exo100 group) were capable to promote an increase on the percentage of cells expressing high levels of MHC molecules when compared with non-stimulated-DC (RPMI group) (Fig. 1 F). The ExoAg stimulus on its higher dose was more potent to induce an increase on the expression of co-stimulatory molecules than live yeast. While Exo100 group promoted a significant augment on the percentage of cells expressing high levels of CD80 and CD86 (Fig. 1 G and H), Yeast group only promoted a significant augment on the percentage of cells expressing high levels of CD86, both when compared with RPMI group (Fig. 1 H).

3.1.3 Pro-inflammatory cytokines were secreted by stimulated-DC

Further, the cytokine production was assessed to evaluate the functional changes of DC upon stimulation. Live Yeast and Exo100 groups promoted a significant augment of IL-12 and IL-6 cytokines when compared with RPMI group, although live yeast was a more potent inducer (Fig. 2A and B). The production of IL-12 on Yeast group was also significantly higher than ExoAg groups and even than LPS positive control group (Fig. 2A), while IL-6 production by yeast group was significantly higher than Exo10 group only (Fig. 2B). The LPS group values for IL-6 cytokines were detached from the graph (Fig. 2B) for better comparisons between Yeast and Exo groups to RPMI group, as the LPS values were exaggerated high.

The Yeast group was also a strong inducer of both TNF- α and IL-1 β pro-inflammatory cytokines, promoting a significant increase of both when compared with RPMI and ExoAg groups (Fig. 2C and D). The ExoAg groups were only capable to induce an increase of TNF- α production when compared with RPMI group (Fig. 2C) and no production of IL-1 β was detected

(Fig. 2D). The production of IL-10 was also measured and the Yeast group was the only one to induce its production (data not shown).

In general, live yeast was a more potent stimulus to induce pro-inflammatory cytokines release than ExoAg stimulus. However the ExoAg on its higher dose was a potent stimulus and promoted high production of IL-12, IL-6 and TNF- α . Together, phenotypical and functional changes of DC upon fungal antigens stimulation suggest an activated state of these cells.

3.2. Stimulated-DC were able to activate T cells in vitro

In order to confirm the activation status of stimulated-DC, the ability of these cells to activate T cells was tested in vitro. A co-culture assay was performed between stimulated-DC and primed T cells for 72 hours and the cytokines released in supernatant were measured. The Yeast group was able to induce a significant increase on production of Th1 signature cytokine IFN- γ by T cells when compared with all others groups (Fig. 3A). This result could be explained once Yeast stimulated-DC produced the highest amount of IL-12 (Fig. 2A). Nevertheless, the Exo100 group was also able to induce a high production of IFN- γ by T cells, on a level similar to LPS group and significantly higher than RPMI group (Fig.3A). Interestingly, both Yeast and Exo100 groups was capable to induce a significant augment on the production of Th17 signature cytokine IL-17 by T cells when compared with RPMI group (Fig. 3B) and the IL-17 release promoted by Exo100 group was even significantly higher than Yeast group (Fig. 3B). The Th2 profile cytokines IL-4 and IL-5 was analyzed but none was detected (data not shown). These data confirm the activated state of stimulated-DC and demonstrate the ability of DC to translate the fungal antigens associated data into differential T cell response. On the other side, as observed in figure 3, the Exo10 group wasn't capable to activate T cells, at least the Th1, Th2, Treg or Th17 profiles, and consequently demonstrated incapacity to activate DC.

3.3. ExoAg group was able to produce TGF- β and IL-23

It's already known that certain cytokines are essential for the development and expansion of Th17 cells. The differentiation of Th17 pathway requires a pro-inflammatory cytokine, IL-6 and an anti-inflammatory cytokine, TGF- β , whilst the maintenance and expansion of these cells require the cytokine IL-23 (Manel, Unutmaz et al. 2008). Therefore, as the IL-6 was measured initially, the TGF- and IL-23 cytokines were evaluated in supernatants of fungal antigens stimulated-DC. Interestingly, the Exo100 group was the only one capable to promote the augment on the production of TGF- β by DC, being significantly higher than all others groups (Fig. 4A). Additionally, the production of IL-23 was detected on Yeast and Exo100 group, with the second being a little higher (Fig.4B). The amount of TGF- β corroborate with the priority of IL-17 producing cells than IFN- γ producing cells on Exo100 group and the presence of IL-23 for both groups that induce IL-17 production, Yeast and Exo100, indicate that these stimuli trigger Th17 cells responses. These data could explain the differential effect of DC over T cells in vitro, with the Exo100 group prioritizing Th17 cells whereas Yeast group give priority to Th1 cells.

4. Discussion

Although few are know about the interaction between DCs and the fungus *Sporothrix schenckii* (Uenotsuchi, Takeuchi et al. 2006), the role of DC in fungal infections are extensively being studied (d'Ostiani, Del Sero et al. 2000; Gildea, Morris et al. 2001; Newman and Holly 2001; Buentke and Scheynius 2003; Bozza, Montagnoli et al. 2004; Serrano-Gomez, Leal et al. 2005). Maturation of DC is characterized by profound phenotypic and functional transformation, which involves decreased antigen processing capacity, increased cell surface expression of MHCII and co-stimulatory molecules, and the secretion of cytokines (Banchereau, Briere et al.

2000). Our results showed that both live yeasts and the exoantigen were capable to mature bone marrow derived dendritic cells, as shown by the upregulation of MHC antigen presenting molecules, co-stimulatory molecules CD-80 and CD-86 and production of cytokines. As we can see in the figures, the maturation promoted by the live yeasts was more enunciated than by ExoAg, even on its higher dose. These differences, however, are not surprising, considering that fungal PAMP possibly involved in Yeast-driven DC maturation are much more than protein fractions as ExoAg.

The immunological mechanisms involved in the prevention and control of sporotrichosis are not fully understood. Previous studies have suggested that cell mediated and humoral immunity plays an important role in the protection of the host against this fungus (Scott and Muchmore 1989; Carlos, Sgarbi et al. 1992; Tachibana, Matsuyama et al. 1999; Nascimento and Almeida 2005). DCs are the most potent APC of the immune system and are vital for the initiation of primary T cell-mediated immune responses (Banchereau, Briere et al. 2000). In the current study we demonstrated that live yeast-form from *S. schenckii* and its exoantigen, on its higher dose, were able to activate BMDC and made them fully capable of triggering T cell responses in vitro. As shown by the presence of IL-17 and IFN- γ producing cells in co-culture assay, both Yeast and Exo100 group triggered a mixed Th1/Th17 response, although the proportions were different. Whereas the Yeast group promoted a more enunciated IFN- γ production than IL-17, the Exo100 group generated a similar production of both cytokines. Thus, assuming that BMDC are activating CD4⁺ T cells into Th1/Th17 profiles, since the T cells wasn't characterized, the exoantigen stimulus suggest an ability in deviating the immune response from an effector Th1 to inflammatory Th17 response. The Exo10 group wasn't capable to activate BMDC and consequently trigger T cells responses. Initially, we thought about a regulatory effect, since the

Exo10 group matured BMDC, but we didn't detect IL-10 in co-culture supernatants and the levels of TGF- β wasn't significantly augmented than RPMI control group (data not shown). Traditionally, responses by IFN- γ -producing Th1 cells are considered to confer protective immunity against fungi, whereas Th2 responses mediated by IL-4 lead to increased susceptibility to fungal infections (Romani 2011). Interleukin-17 producing Th17 cells comprise a newly recognized T cell subset with an emerging role in adaptive immunity to a variety of fungi (Romani 2011). The development of Th1 cells is believed to be crucial for protective immunity against pathogenic fungi, whereas a role of Th17 cells is vigorously debated (Huang, Na et al. 2004; Kleinschek, Muller et al. 2006; Deepe and Gibbons 2009; Chamilos, Ganguly et al. 2010). Recently, Wuthrich and cols demonstrated that Th17 cells can be engaged by vaccination to confer resistance against multiple dimorphic fungi: *Coccidioides posadasii*, *Histoplasma capsulatum*, and *Blastomyces dermatitidis*. Although Th17 conferred vaccine resistance in these fungal models by Th1-independent mechanisms, wild type cells expressed a balanced Th1/Th17 profile and also protected mice (Wuthrich, Gern et al. 2011). Accordingly, the involvement of Th17 cells in *S. schenckii* are not described and our laboratory are putting efforts on describing the involvement of Th17 in systemic sporotrichosis and intend to use DC-derived vaccines to evaluate the importance of Th1/Th17 balance on conferring protection.

The triggering of IFN- γ producing cells on co-culture assays was expected as the BMDC produced high levels of IL-12, the Th1 signature cytokine (Bettelli, Korn et al. 2008), but the IL-17 producing cells became a question to be solved. Since the Th17 cells differentiation in murine models are dependent on TGF- β and IL-6 cytokines, and the maintenance and expansion of Th17 population are dependent on IL-23 cytokine (Korn, Bettelli et al. 2009), we evaluated the production of these by stimulated-BMDC. Interestingly, only Exo100 group was capable to

promote the production of IL-6 and a significant increase on TGF- β , in addition with IL-23 detection. Therefore, we thought about two reasons for the more enunciated Th17 response on Exo100 group: (i) the production of IL-12 cytokine was significantly higher on Yeast group than Exo100 group and this high levels could be inhibiting the generation of IL-17 producing cells, since IL-12 is a well known inhibitory cytokine of Th17 differentiation (Gocke, Cravens et al. 2007); (ii) the higher amounts of TGF- β associated with IL-6 were capable to promote a more enunciated generation of IL-17 producing cells, possibly maintained by the production of IL-23.

For the first time IL-17 producing cells was associated with *S. schenckii* fungus and its antigen ExoAg. Our results demonstrated the plasticity of DC on translating the data associated with the fungus *S. schenckii* and ExoAg into differential T cells response in vitro. Our laboratory are investigating the mixed Th1/Th17 responses in vivo and the importance of this balance to the host defense and understanding how the *S. schenckii* antigens dictate this cellular response. The possibility of using ex vivo-generated DCs as vaccinal and therapeutic tools for sporotrichosis is a challenge for the future.

Acknowledgement

This work is in memory of professor Dr. Rubens Rodrigues dos Santos-Junior. This work was supported by FAPESP, CAPES, PADC-FCFAR-Unesp and CNPq.

5. References

- Aarestrup, F. M., R. O. Guerra, et al. (2001). "Oral manifestation of sporotrichosis in AIDS patients." Oral Dis **7**(2): 134-136.
- Bacci, A., C. Montagnoli, et al. (2002). "Dendritic cells pulsed with fungal RNA induce protective immunity to *Candida albicans* in hematopoietic transplantation." J Immunol **168**(6): 2904-2913.
- Banchereau, J., F. Briere, et al. (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu Rev Immunol **18**: 767-811.

Barros, M. B., O. Schubach Ade, et al. (2004). "Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases." Clin Infect Dis **38**(4): 529-535.

Bettelli, E., T. Korn, et al. (2008). "Induction and effector functions of T(H)17 cells." Nature **453**(7198): 1051-1057.

Bozza, S., K. Perruccio, et al. (2003). "A dendritic cell vaccine against invasive aspergillosis in allogeneic hematopoietic transplantation." Blood **102**(10): 3807-3814.

Bozza, S., C. Montagnoli, et al. (2004). "Dendritic cell-based vaccination against opportunistic fungi." Vaccine **22**(7): 857-864.

Buentke, E. and A. Scheynius (2003). "Dendritic cells and fungi." APMIS **111**(7-8): 789-796.

Carlos, I. Z., D. B. Sgarbi, et al. (1992). "Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the systemic form of the disease." Mycopathologia **117**(3): 139-144.

Carlos, I. Z., D. B. Sgarbi, et al. (1998). "Host organism defense by a peptide-polysaccharide extracted from the fungus *Sporothrix schenckii*." Mycopathologia **144**(1): 9-14.

Carlos, I. Z., D. B. Sgarbi, et al. (2003). "*Sporothrix schenckii* lipid inhibits macrophage phagocytosis: involvement of nitric oxide and tumour necrosis factor-alpha." Scand J Immunol **57**(3): 214-220.

Chamilos, G., D. Ganguly, et al. (2010). "Generation of IL-23 producing dendritic cells (DCs) by airborne fungi regulates fungal pathogenicity via the induction of T(H)-17 responses." PLoS One **5**(9): e12955.

d'Ostiani, C. F., G. Del Sero, et al. (2000). "Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo." J Exp Med **191**(10): 1661-1674.

Deepe, G. S., Jr. and R. S. Gibbons (2009). "Interleukins 17 and 23 influence the host response to *Histoplasma capsulatum*." J Infect Dis **200**(1): 142-151.

Dickerson, C. L., R. L. Taylor, et al. (1983). "Susceptibility of congenitally athymic (nude) mice to sporotrichosis." Infect Immun **40**(1): 417-420.

Gildea, L. A., R. E. Morris, et al. (2001). "*Histoplasma capsulatum* yeasts are phagocytosed via very late antigen-5, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells." J Immunol **166**(2): 1049-1056.

Gocke, A. R., P. D. Cravens, et al. (2007). "T-bet regulates the fate of Th1 and Th17 lymphocytes in autoimmunity." J Immunol **178**(3): 1341-1348.

- Huang, W., L. Na, et al. (2004). "Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice." J Infect Dis **190**(3): 624-631.
- Joffre, O., M. A. Nolte, et al. (2009). "Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity." Immunol Rev **227**(1): 234-247.
- Kleinschek, M. A., U. Muller, et al. (2006). "IL-23 enhances the inflammatory cell response in Cryptococcus neoformans infection and induces a cytokine pattern distinct from IL-12." J Immunol **176**(2): 1098-1106.
- Korn, T., E. Bettelli, et al. (2009). "IL-17 and Th17 Cells." Annu Rev Immunol **27**: 485-517.
- Losman, J. A. and K. Cavanaugh (2004). "Cases from the Osler Medical Service at Johns Hopkins University. Diagnosis: P. carinii pneumonia and primary pulmonary sporotrichosis." Am J Med **117**(5): 353-356.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.
- Manel, N., D. Unutmaz, et al. (2008). "The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma." Nat Immunol **9**(6): 641-649.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.
- Nascimento, R. C. and S. R. Almeida (2005). "Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis." FEMS Immunol Med Microbiol **43**(2): 241-247.
- Nascimento, R. C., N. M. Espindola, et al. (2008). "Passive immunization with monoclonal antibody against a 70-kDa putative adhesin of Sporothrix schenckii induces protection in murine sporotrichosis." Eur J Immunol **38**(11): 3080-3089.
- Newman, S. L. and A. Holly (2001). "Candida albicans is phagocytosed, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells." Infect Immun **69**(11): 6813-6822.
- Rafal, E. S. and J. E. Rasmussen (1991). "An unusual presentation of fixed cutaneous sporotrichosis: a case report and review of the literature." J Am Acad Dermatol **25**(5 Pt 2): 928-932.
- Romani, L. (2011). "Immunity to fungal infections." Nat Rev Immunol **11**(4): 275-288.
- Ruiz-Baca, E., C. Toriello, et al. (2009). "Isolation and some properties of a glycoprotein of 70 kDa (Gp70) from the cell wall of Sporothrix schenckii involved in fungal adherence to dermal extracellular matrix." Med Mycol **47**(2): 185-196.

- Scott, E. N. and H. G. Muchmore (1989). "Immunoblot analysis of antibody responses to *Sporothrix schenckii*." J Clin Microbiol **27**(2): 300-304.
- Segal, B. H. (2007). "Role of macrophages in host defense against aspergillosis and strategies for immune augmentation." Oncologist **12 Suppl 2**: 7-13.
- Serrano-Gomez, D., J. A. Leal, et al. (2005). "DC-SIGN mediates the binding of *Aspergillus fumigatus* and keratinophilic fungi by human dendritic cells." Immunobiology **210**(2-4): 175-183.
- Tachibana, T., T. Matsuyama, et al. (1999). "Involvement of CD4+ T cells and macrophages in acquired protection against infection with *Sporothrix schenckii* in mice." Med Mycol **37**(6): 397-404.
- Teixeira, P. A., R. A. de Castro, et al. (2009). "Cell surface expression of adhesins for fibronectin correlates with virulence in *Sporothrix schenckii*." Microbiology **155**(Pt 11): 3730-3738.
- Uenotsuchi, T., S. Takeuchi, et al. (2006). "Differential induction of Th1-prone immunity by human dendritic cells activated with *Sporothrix schenckii* of cutaneous and visceral origins to determine their different virulence." Int Immunol **18**(12): 1637-1646.
- Wuthrich, M., B. Gern, et al. (2011). "Vaccine-induced protection against 3 systemic mycoses endemic to North America requires Th17 cells in mice." J Clin Invest **121**(2): 554-568.
- Zhu, J., H. Yamane, et al. (2010). "Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)." Annu Rev Immunol **28**: 445-489.

Figure 1

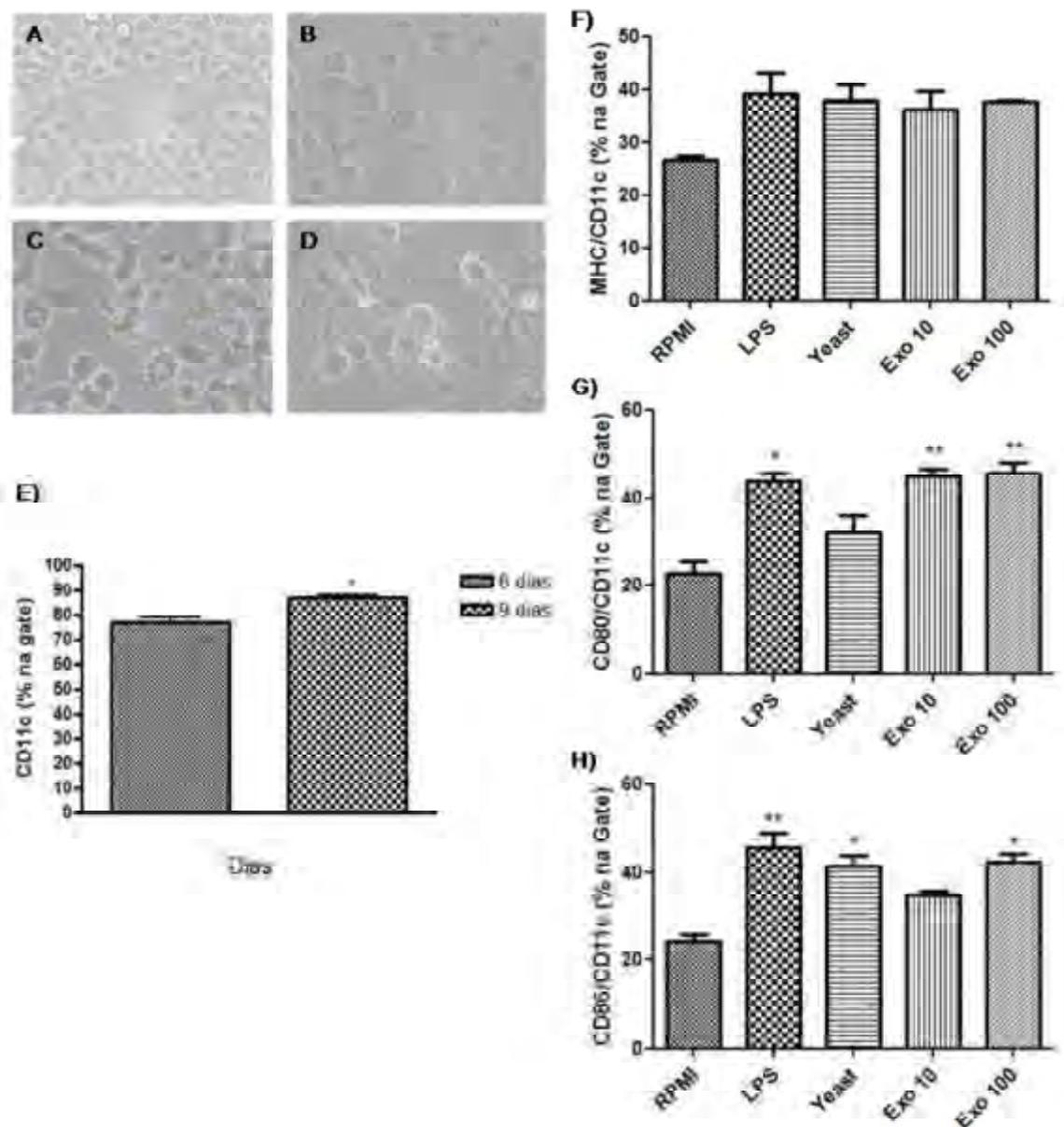


Figure 1: Morphological and phenotypical analyses of BMDC. Bone marrow precursors were differentiated on the presence of GM-CSF and IL-4 cytokines for six or nine days. The morphology of the cells on differentiation were accompanied daily on an inverted optical microscope. The photos were obtained at 400x magnitude on day 0 (A), 3 (B), 6 (C) and 9 (D). On day six and nine these cells were collected and analyzed for CD11c expression by flow cytometry (E). On day six BMDC were stimulated with yeast-form of *S. schenckii* at a DC:yeast cells ratio of 1:1 (Yeast group), or ExoAg with 10 (Exo10 group) or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Exo100 group),

or LPS (1 μ g/mL), or only medium (RPMI group) by 24h at 37 °C. After stimulation the cells were collected and analyzed for maturation surface markers MHC-II (F), CD80 (G) and CD86 (H). The results are the means of three independent experiments. Values are presented as means \pm SEM. Brackets indicate statistical comparisons: *p<0.05 and **p< 0.01.

Figure 2

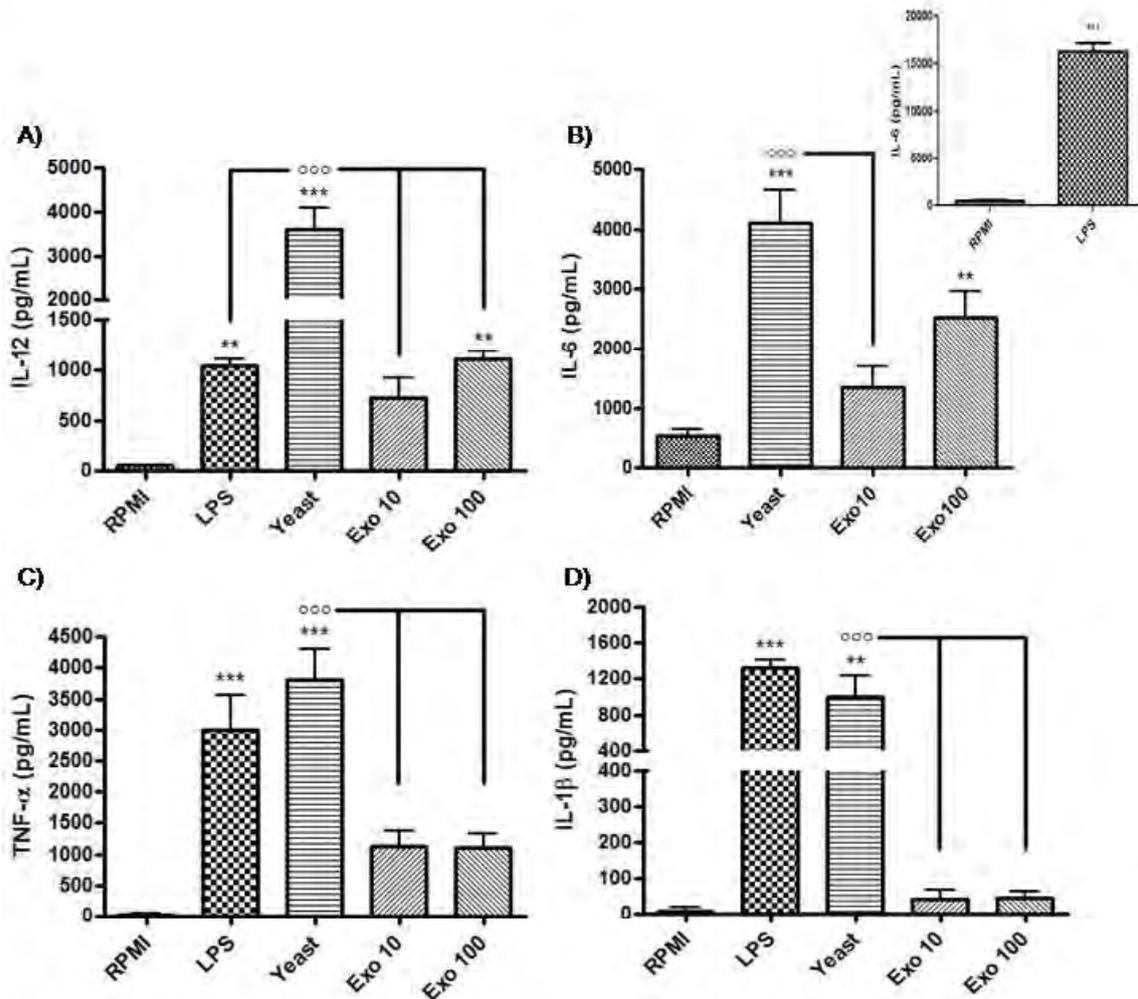


Figure 2: Functional analyses of BMDC. On day six BMDC were stimulated with yeast-form of *S. schenckii* at a DC:yeast cells ratio of 1:1 (Yeast group), or ExoAg with 10 (Exo10 group) or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Exo100 group), or LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), or only medium (RPMI group) by 24h at 37 °C. After stimulation the supernatant was collected and IL-12 (A), IL-6 (B), TNF- α (C) and IL-1 β (D) cytokines production were analyzed by ELISA assay. The results are the means of three independent experiments. Values are presented as means \pm SEM. Brackets indicate statistical comparisons: *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 when compared with control group RPMI. Open circles indicate statistical comparisons between groups indicated by the lines: °°°p < 0.001

Figure 3

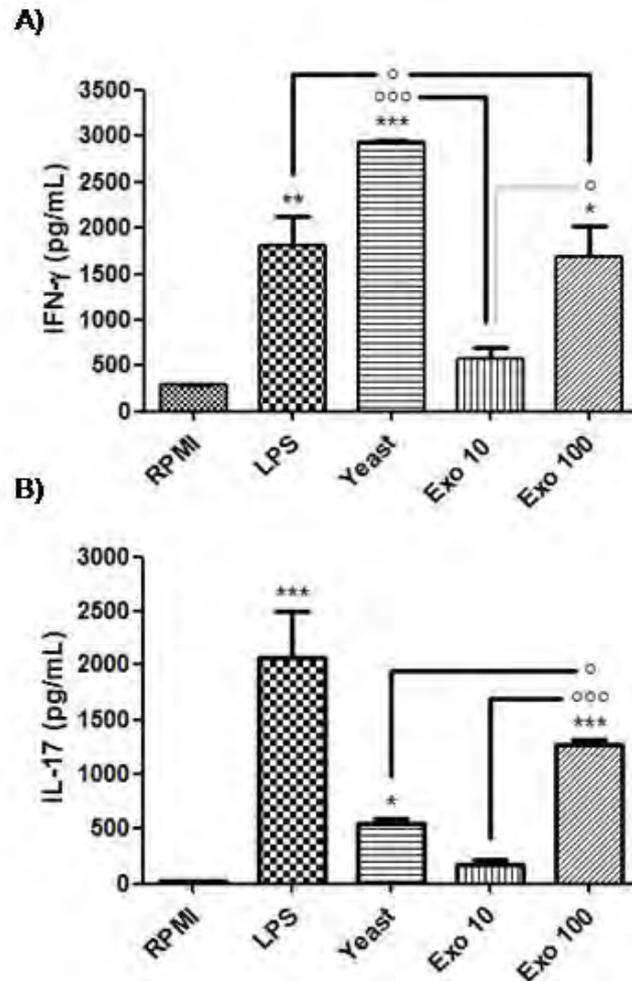


Figure 3: T cells were differentially activated by stimulated-BMDC. Stimulated-BMDC were co-cultured with primed Tcells at a BMDC/Tcell ratio of 1:9 by 72 hours at 37°C. After, the supernatant was collected and IFN- γ (A) and IL-17 (B) cytokines production were analyzed by Elisa assay. The results are the means of three independent experiments. Values are presented as means \pm SEM. Brackets indicate statistical comparisons: *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 when compared with control group RPMI. Open circles indicate statistical comparisons between groups indicated by the lines: °p < 0.05 °°°p < 0.001.

Figure 4

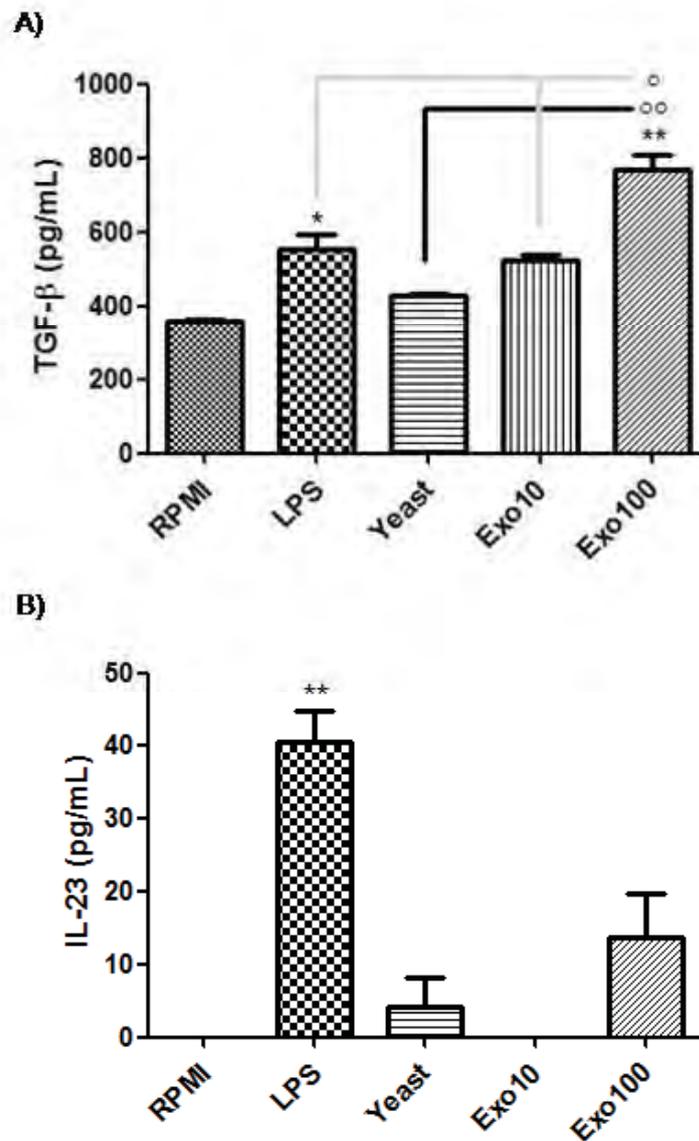


Figure 4: Exoantigen was able to stimulate the production of Th17 profile related cytokines by BMDC. On day six BMDC were stimulated with yeast-form of *S. schenckii* at a DC:yeast cells ratio of 1:1 (Yeast group), or ExoAg with 10 (Exo10 group) or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Exo100 group), or LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), or only medium (RPMI group) by 24h at 37 °C. After stimulation the supernatant was collected and TGF β (A) and IL-23 (B) cytokines production were analyzed by ELISA assay. The results are the means of three independent experiments. Values are presented

as means \pm SEM. Brackets indicate statistical comparisons: *p < 0.05 and **p < 0.01 when compared with control group RPMI. Open circles indicate statistical comparisons between groups indicated by the lines: ^op < 0.05 and ^{oo}p < 0.01