

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
P.P.G. BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – UNESP**

**PÂMELA ALEGRANCI**

**Análise dos macrófagos M1 e M2 durante a infecção por  
*Sporothrix schenckii* em modelo murino**

**ARARAQUARA  
2013**

**PÂMELA ALEGRANCI**

**Análise dos macrófagos M1 e M2 durante a infecção por  
*Sporothrix schenckii* em modelo murino**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor(a) em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

ARARAQUARA  
2013

### **Ficha Catalográfica**

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

Alegranci, Pâmela

A366 Análise dos macrófagos M1 e M2 durante a infecção por *Sporothrix schenckii* em modelo murino / Pâmela Alegranci. – Araraquara, 2013  
97 f.

Tese (Doutorado) – 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. *Sporothrix schenckii*. 2. Macrófagos M1. 3. Macrófagos M2. 4. Exoantígeno. 5. Parede celular. 6. Fenótipo. I. Carlos, Iracilda Zeppone, orient. II. Título

**CAPES: 40300005**

**Comissão examinadora**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iracilda Zeppone Carlos**

---

**Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira**

---

**Prof. Dr. Alexander Batista Duharte**

---

**Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso**

---

**Prof. Dr. José Maurício Sforcin**

**Araraquara, 15 de Fevereiro de 2013.**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP) com apoio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), através do auxílio à pesquisa (Processo n° 2009/11442-9) e concessão de bolsa (Processo n° 2009/06519-2).

***DEDICATÓRIA***

***Aos meus pais, Jeni e Aparecido***

***Ao meu irmão, Winston***

***Aos meus filhos, Gustavo e Arthur***

***Ao meu esposo, José Adilson***

## ***AGRADECIMENTOS***

À **Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos**, por ter me recebido em sua equipe, pelos seus ensinamentos tanto na minha vida profissional quanto pessoal. Meus sinceros agradecimentos.

Aos colegas e amigos que fizeram parte desta jornada, em especial: **Lívia Carolina de Abreu (amiga, otimista)**, **Lucas Souza Ferreira (sensato)** e **Marisa Campos Polesi Placeres (amiga e segunda mãe)**, **Djamile Cordeiro de Matos (amiga)**.

Thais de Cássia Negrini, Danielle Cardoso Geraldo Maia, Jolindo Alencar Freitas, Amanda Costa Gonçalves, Mauro Jardim, Aline Tansini, Pedro Passos Sundfeld, Débora Sávio.

As amigas de risadas e desabafos: Rosemira, Rosângela, Gabriela.

Aos colegas do laboratório de micologia: Julianny, Aline, Haroldo, Liliane, todos de uma forma geral.

As vovós Jeni e Claudina, ao vovô Antônio e a tia Bia (Lidia Celli) pelas horas disponibilizadas para cuidar do Gustavo e do Arthur, para que eu pudesse escrever meus relatórios e tese.

As funcionárias da seção de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Cláudia, Sônia, Laura e Joyce por toda atenção e paciência.

A FAPESP pela concessão da bolsa (Processo: 2009/06519-2).

## SUMÁRIO

Índice de figuras.....	8
Índice de tabelas .....	9
Abreviaturas e siglas .....	10
Resumo.....	11
Abstract .....	12
CAPITULO I .....	13
1. Introdução .....	14
2. Revisão da literatura .....	15
2.1. <i>Sporothrix schenckii</i> .....	15
2.2. Macrófago .....	21
3. Objetivos.....	26
3.1. Objetivos específicos.....	26
4. Materiais e métodos.....	27
4.1. Delineamento experimental .....	27
4.2. Microrganismo.....	28
4.3. Animais.....	28
4.4. Reativação do fungo .....	28
4.5. Obtenção dos antígenos.....	29
4.5.1. Exoantígeno.....	29
4.5.2. Extrato lipídico.....	29
4.5.3. Dosagem proteica.....	29
4.6. Separação de proteínas (SDS-PAGE).....	30
4.7. Infecção.....	31
4.8. Obtenção das células do exsudato peritoneal .....	33
4.9. Avaliação da viabilidade celular (MTT).....	33

4.10. Fenotipagem.....	34
4.11. Determinação da produção de NO.....	34
4.12. Determinação da atividade da arginase .....	35
4.13. Determinação de citocinas .....	35
4.14. Análise estatística .....	36
5. Resultados.....	37
5.1. Viabilidade celular.....	37
5.2. Fenotipagem .....	38
5.3. Determinação da liberação de óxido nítrico.....	41
5.4. Determinação da atividade da enzima arginase .....	43
5.5. Determinação da produção de IL-12 .....	45
5.6. Determinação da produção de IL-23 .....	47
5.7. Determinação da produção de IL-10 .....	49
5.8. Determinação da produção de TGF- $\beta$ .....	51
6. Discussão .....	53
7. Conclusões .....	60
8. Referencias bibliográficas .....	61
9. APENDICE.....	73
CAPITULO II .....	79
Artigo submetido para publicação .....	80

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Morfologia microscópica da colônia de <i>Sporothrix schenckii</i> .....	16
<b>Figura 2.</b> Gel de SDS-PAGE corado com Coomassie Blue.....	31
<b>Figura 3.</b> Método de cultivo do fungo <i>Sporothrix schenckii</i> .....	32
<b>Figura 4.</b> Método de infecção pelo fungo <i>Sporothrix schenckii</i> .....	32
<b>Figura 5.</b> Fenotipagem de células do exsudato peritoneal (PECs) de camundongos Swiss não infectados e infectados com o fungo <i>S. schenckii</i> durante a 2 <sup>a</sup> , 4 <sup>a</sup> , 6 <sup>a</sup> e 8 <sup>a</sup> semanas.....	39
<b>Figura 6.</b> Fenotipagem dos marcadores para as populações M1 e M2 em células do exsudato peritoneal (PECs) de camundongos Swiss não infectados (A) e infectados (B) com o fungo <i>S. schenckii</i> durante a 2 <sup>a</sup> , 4 <sup>a</sup> , 6 <sup>a</sup> e 8 <sup>a</sup> semanas.....	40
<b>Figura 7.</b> Produção de NO em cultura de células aderentes do exsudato peritoneal (PECs) de camundongos <i>Swiss</i> não infectados (A) e infectados (B) com o fungo <i>S. schenckii</i> durante a 2 <sup>a</sup> , 4 <sup>a</sup> , 6 <sup>a</sup> e 8 <sup>a</sup> semanas.....	42
<b>Figura 8.</b> Atividade da enzima arginase em cultura de células do exsudato peritoneal (PECs) de camundongos <i>Swiss</i> não infectados (A) e infectados (B) com o fungo <i>S. schenckii</i> durante a 2 <sup>a</sup> , 4 <sup>a</sup> , 6 <sup>a</sup> e 8 <sup>a</sup> semanas.....	44
<b>Figura 9.</b> Concentração de IL-12 liberada em cultura de células aderentes do exsudato peritoneal (PECs) de camundongos <i>Swiss</i> não infectados (A) e infectados (B) com o fungo <i>S. schenckii</i> durante a 2 <sup>a</sup> , 4 <sup>a</sup> , 6 <sup>a</sup> e 8 <sup>a</sup> semanas.....	46
<b>Figura 10.</b> Concentração de IL-23 liberada em cultura de células aderentes do exsudato peritoneal (PECs) de camundongos <i>Swiss</i> não infectados (A) e infectados (B) com o fungo <i>S. schenckii</i> durante a 2 <sup>a</sup> , 4 <sup>a</sup> , 6 <sup>a</sup> e 8 <sup>a</sup> semanas.....	48
<b>Figura 11.</b> Concentração de IL-10 liberada em cultura de células aderentes do exsudato peritoneal (PECs) de camundongos <i>Swiss</i> não infectados (A) e infectados (B) com o fungo <i>S. schenckii</i> durante a 2 <sup>a</sup> , 4 <sup>a</sup> , 6 <sup>a</sup> e 8 <sup>a</sup> semanas.....	50
<b>Figura 12.</b> Concentração de TGF- $\beta$ liberado em cultura de células aderentes do exsudato peritoneal (PECs) de camundongos <i>Swiss</i> não infectados (A) e infectados (B) com o fungo <i>S. schenckii</i> durante a 2 <sup>a</sup> , 4 <sup>a</sup> , 6 <sup>a</sup> e 8 <sup>a</sup> semanas.....	52

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Viabilidade celular (%) em células aderentes do exsudato peritoneal em camundongos <i>Swiss</i> não infectados e infectados com o fungo <i>Sporothrix schenckii</i> .....	37
--	----

## ABREVIATURAS e SIGLAS

µg – Microgramas

µm – Micrometro

µmol – Micromol

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

CD – Cluster of Differentiation (Grupo de Diferenciação)

CO<sub>2</sub> – Gás Carbônico

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – Ensaio Imunoenzimático

ExoAg - Exoantígeno do fungo *Sporothrix schenckii*

EL – Extrato Lipídico do fungo *Sporothrix schenckii*

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IFN-γ – Interferon Gama

IL – Interleucina

kDa – Kilodaltons

LPS – Lipopolissacarídeo

mg – Miligrama

mL – Mililitros

nm – Nanômetros

NO- Óxido Nítrico

NOS – Óxido Nítrico Sintase

°C – Graus Celsius

PAMPS – Padrões Moleculares Associados ao Patógeno

PECs – Células do Exsudato Peritoneal

PRR - Receptores de Reconhecimento Padrão

pg – Picograma

pH – Potencial Hidrogeniônico

rpm – Rotação Por Minuto

SFB – Soro Fetal Bovino

TGF-β – Fator de Crescimento Transformante Beta

TLR – Toll Like Receptor

TNF-α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

## Resumo

A esporotricose é uma micose subcutânea causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenckii*, apresentando em geral, lesões cutâneas com proliferação via vasos linfáticos especialmente em pacientes imunocomprometidos, o que pode levar a doença sistêmica. Os macrófagos têm um papel importante na resposta imune inata contra diversos patógenos e dependendo do estímulo recebido podem ser polarizados em M1 e M2, os quais apresentam propriedades distintas, sendo que os primeiros possuem atividades pró-inflamatórias e o segundo anti-inflamatória. Desta forma, o objetivo do trabalho foi verificar a participação das populações de macrófagos M1 e M2 através da avaliação das citocinas IL-12, IL-23, IL-10 e TGF- $\beta$ , da produção de NO e da atividade da enzima arginase, juntamente com a avaliação fenotípica dessas populações durante todo período experimental. Os resultados revelaram que as células do exsudato peritoneal dos camundongos dos grupos infectados quando desafiadas *ex vivo* com o exoantígeno e o extrato lipídico foram capazes de levar a produção de IL-12, IL-10 e TGF- $\beta$  durante todo o período experimental. A produção de IL-23 ocorreu na 2ª e 4ª semana mediante o desafio com o exoantígeno e em todo período experimental com o EL. A fenotipagem revelou a presença de macrófagos tanto M1 quanto M2 durante todo o período experimental, com aumento da expressão do receptor CD206 (M2) no período tardio da infecção, o que explica a produção dos mediadores tanto inflamatórios (IL-12 e IL-23) quanto anti-inflamatórios (IL-10 e TGF- $\beta$ ) encontrados durante toda a cinética. Além das citocinas também foi observada a produção de óxido nítrico e a atividade da enzima arginase. Desta forma os resultados encontrados evidenciam a participação dos macrófagos M1 e M2 durante a esporotricose, uma vez que os M1 possuem atividade microbicida e são os responsáveis por liberar os mediadores inflamatórios na tentativa de eliminar o fungo *Sporothrix schenckii*, enquanto os M2 encontrados durante o processo infeccioso podem estar relacionados ao processo de resolução da inflamação desde o início da doença impedindo que o excesso de mediadores inflamatórios leve a destruição tecidual.

## Abstract

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis caused by the dimorphic fungus, *Sporothrix schenckii*, generally presenting skin lesions with spread via lymphatic vessels, especially in immunocompromised patients, what can lead to systemic disease. Macrophages play an important role in innate immune response against various pathogens and, depending on the eliciting signals, macrophage can be polarized in M1 and M2, which presents distinct proprieties, so macrophage activation can be either proinflammatory or antiinflammatory. Thereby, the aim of this study was to evaluate the role of macrophage populations M1 and M2, through the evaluation of IL-12, IL-23, IL-10 and TGF- $\beta$ , NO production and activity of the enzyme arginase, along with phenotypic evaluation of these populations throughout the experimental period. The results showed that peritoneal exudate cells of infected mice groups, when challenged *ex vivo* with exoantigen and lipid extract, were able to lead to production of IL-12, IL-10 and TGF- $\beta$  throughout the experimental period. The production of IL-23 occurred in the 2<sup>nd</sup> and 4<sup>th</sup> week through the challenge with exoantigen and throughout the experimental period with the lipid extract. Phenotyping revealed the presence of both macrophages, M1 and M2, throughout the experimental period, with increased expression of the receptor CD206 (M2) in the late infection period, which could explain the production of proinflammatory (IL-12 and IL-23) and anti-inflammatory (IL-10 and TGF- $\beta$ ) mediators found throughout the kinetic, and the nitric oxide production and activity of the arginase enzyme. M1 macrophages are important during sporotrichosis, they have microbicidal activity and are responsible for releasing inflammatory mediators in an attempt to eliminate the fungus *Sporothrix schenckii*, while the M2 found during the infection process may be linked to the process of resolution of inflammation since the beginning of the disease, preventing that excessive inflammatory mediators can led the tissue destruction.

## CAPÍTULO I

## 1 INTRODUÇÃO

O fungo *Sporothrix schenckii* é responsável por levar ao desenvolvimento da doença conhecida como esporotricose, o qual é conhecido por ser oportunista acometendo pacientes imunocomprometidos (RAMOS-E-SILVA et al., 2007; ROMERO-CABELLO et al., 2011). Nos últimos anos tem-se voltado à atenção aos componentes deste fungo que possam estar envolvidos no reconhecimento e na indução da resposta imune, uma vez que os mecanismos envolvidos no controle e na disseminação do mesmo ainda permanecem desconhecidos (SASSA et al., 2009; BARROS et al., 2011; VERDAN et al., 2012; NEGRINI et al., 2013).

Dentre as células efectoras que participam do reconhecimento aos fungos têm-se os macrófagos que desempenham um importante papel durante a resposta imune inata e vem sendo cada vez mais estudados devido sua plasticidade funcional em resposta ao microambiente e aos estímulos antigênicos (MANTOVANI et al., 2004).

Os macrófagos são classificados como M1 e M2, onde os primeiros são ativados pelos sinais considerados clássicos, como IFN- $\gamma$  e LPS, levando a produção de mediadores envolvidos na resposta próinflamatória. Já os M2 podem ser ativados pela IL-4, IL-13, complexos imunes, entre outros, sendo sua principal característica a produção de altos níveis de IL-10 que atua inibindo a inflamação e promovendo a reparação e remodelação tecidual. Ambas as populações produzem enzimas que degradam a L-arginina, sendo a NOS (óxido nítrico sintase) produzida pelos M1 e a arginase pelos M2, no entanto os produtos finais são funcionalmente distintos (BENOIT et al., 2008; MANTOVANI et al., 2009).

A participação dos macrófagos M1 e M2 é associada a evolução ou resolução de várias infecções, no entanto em relação a esporotricose até o presente momento não havia nenhum relato na literatura o que levou a realização do presente estudo, cujo objetivo foi avaliar a participação dos macrófagos M1 e M2 na esporotricose em modelo murino na tentativa de compreender os papéis que estas células desempenhavam durante o processo inflamatório.

Os resultados obtidos estão divididos em dois capítulos, sendo o primeiro composto pela revisão da literatura, objetivos, materiais e métodos, resultados e referencias bibliográficas, e o segundo capítulo o artigo científico submetido para publicação cujos resultados obtidos não foram apresentados no primeiro capítulo.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Sporothrix schenckii*

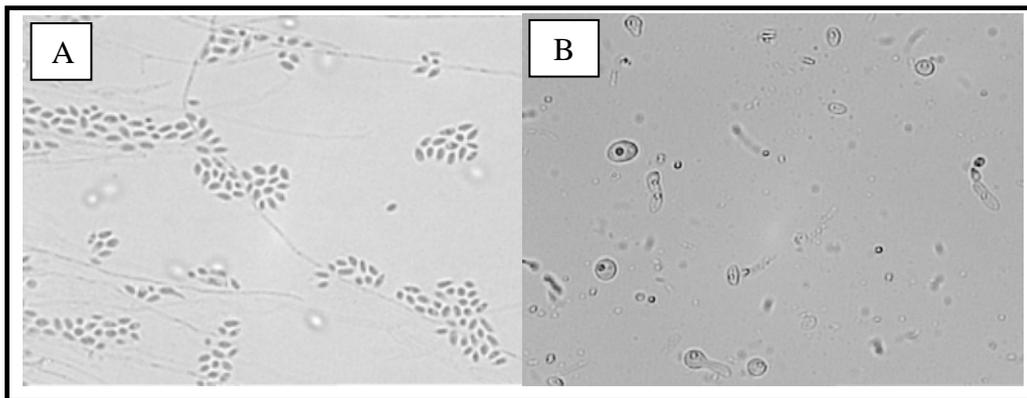
A esporotricose foi descrita pela primeira vez por Benjamin Schenck no ano de 1898, quando foi isolado o microrganismo responsável pela doença de uma amostra de abscesso de tecido subcutâneo no Hospital John Hopkins em Baltimore (SCHENCK, 1898). Este microrganismo foi posteriormente identificado pelo micologista Erwin F. Smith como pertencente ao gênero *Sporotrichum*. Outros relatos foram surgindo e o agente responsável pela doença foi denominado *Sporothrix schenckii* (HEKTOEN e PERKINS, 1900).

A forma miceliar saprofítica do fungo cresce em temperaturas que variam de 25°C a 30°C, sendo encontrada no meio ambiente e podendo ser manipulada em laboratório em condições favoráveis para o seu crescimento. O microrganismo cresce prontamente em meios de cultura padrão, como o ágar dextrose *Sabouraud*, em semanas ou meses, formando colônias de cor branca ao creme que se tornam escuras a negras e subseqüentemente enrugadas com o passar das semanas (KAUFFANN, 1999).

Esta forma é caracterizada por hifas hialinas e septadas de 1 a 2 µm de diâmetro, contendo conidióforos estreitos, cujo ápice forma uma pequena vesícula com os conídios organizados em grupos lembrando pétalas de uma flor (Figura 1A) (MENDES-GIANINNI e MELHEM, 2001; CARLOS et al., 2009).

A forma leveduriforme é encontrada *in vivo*, a 37°C, onde se reproduz por brotamento e não forma conídios. Tipicamente a forma de levedura tem de 4 a 6 µm de diâmetro e frequentemente apresenta forma de charuto (Figura 1B). No laboratório, *in vitro* a 37°C, o fungo é convertido à forma de levedura em meios suplementados, como o caldo infusão de cérebro coração (BHI, do inglês *Brain Heart Infusion*), cuja colônia apresenta coloração creme (DE ARAÚJO et al., 2001; MORRIS-JONES, 2002).

O habitat do *S. schenckii* é o solo onde vive em associação com restos vegetais, bolor e madeira, sendo este encontrado principalmente em regiões de climas temperado e tropical úmido (DA ROSA et al., 2005). Fatores geoclimáticos, como elevada altitude, alta quantidade de chuvas, alta umidade do ar e temperaturas amenas são favoráveis para o crescimento do fungo (AGARWAL et al., 2008).



**Figura 1.** Morfologia microscópica da colônia de *Sporothrix schenckii*. A) Hifas septadas com conídios organizados em grupos. B) Leveduras com aspecto de charuto.

A esporotricose é tradicionalmente conhecida como a “doença dos jardineiros”, uma vez que acomete principalmente estes indivíduos pela alta exposição aos espinhos e , as quais podem lhes causar traumas e arranhões levando a inoculação do fungo via subcutânea. Horticultores, floristas, fazendeiros, pescadores são exemplos de atividades ocupacionais e de lazer que podem facilitar a exposição ao fungo (BELKNAP, 1989; MORRIS-JONES, 2002; ENGLE et al. 2007).

A transmissão zoonótica também tem sido relatada na literatura através de picadas ou arranhões de roedores, papagaios, cães, gatos, cavalos e tatus (MORRIS-JONES, 2002; SCHUBACH et al., 2003, SCHUBACH et al., 2008). Em 2010, Alves e colaboradores relataram casos de esporotricose associados aos caçadores de tatus no sul do Brasil. A transmissão por inalação já foi descrita na literatura, mas esta forma de contaminação é considerada rara (BELKNAP, 1989).

No Brasil, a primeira epidemia zoonótica de esporotricose foi relatada no Rio de Janeiro, sendo que de acordo com a revisão realizada por Barros e colaboradores (2011) de 1998 a 2009 foram relatados 3000 casos em gatos e 2000 casos em humanos, os quais foram diagnosticados pelo Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC)/Fiocruz. Muitos autores acreditam que os felinos são os únicos animais com potencial zoonótico de transmissão, devido a grande quantidade de leveduras encontradas nas lesões (SCHUBACH et al., 2003; SCHUBACH et al., 2005).

Durante uma epidemia zoonótica na cidade do Rio de Janeiro foram relatados 5 casos de esporotricose em gestantes, onde quatro haviam entrado em contato com gatos

doentes e uma relatou ter contato com gato, mas aparentemente sadio. No caso da esporotricose em gestante o tratamento para a doença localizada é o calor local e para a sistêmica tem sido utilizada a anfotericina B, pois não há relatos de efeitos nocivos para o feto (COSTA et al., 2011). De acordo com os autores não está claro até o momento se há qualquer interferência da infecção fúngica sobre o feto, e a transmissão placentária ainda é desconhecida.

Na cidade do Rio de Janeiro foi realizada a fenotipagem de 247 amostras isoladas de pacientes no período de 1998 a 2008 com o objetivo de diferenciar as espécies encontradas, uma vez que em 2007 haviam sido incorporadas três novas espécies ao gênero *Sporothrix*, os resultados obtidos revelaram que 6% se tratavam do fungo *S. schenckii*, sendo predominante a espécie *S. brasiliensis* (83,4%) (OLIVEIRA et al., 2011).

A esporotricose não é uma doença de notificação na maioria dos países, por essa razão pouco se sabe sobre a sua incidência. Um levantamento feito nos últimos 10 anos de publicações científicas demonstrou que no Brasil existem 39 relatos de casos em humanos, 11 em animais e 48 estudos laboratoriais. No entanto, como mencionam os próprios autores, por se tratar de dados encontrados em publicações científicas nada se pode dizer sobre a prevalência da esporotricose (BARROS et al., 2011).

Diferenças nos genótipos do *S. schenckii* podem estar associadas à distribuição geográfica, à virulência e às diferentes formas clínicas da infecção (ISHIZAKI et al., 1996; ISHIZAKI et al., 1998; MESA-ARANGO et al., 2002).

Em relação às diferentes formas clínicas da doença, estas estão relacionadas ao estado imunológico do hospedeiro, a carga fúngica e a profundidade da inoculação, sendo que a capacidade da resposta imune celular é que irá determinar o grau de invasão pelo fungo (DE ALBORNOZ et al., 1986; CARLOS et al., 1992). A forma clínica mais freqüente (cerca de 80% dos casos) é a linfocutânea, a qual se inicia como uma lesão nodular ou ulcerada no local da inoculação do fungo e segue via vasos linfáticos regionais, caracterizados por lesões nodulares que ulceram (LOPES-BEZERRA et al., 2006).

Outra forma que pode ser encontrada é a cutânea fixa, onde o fungo permanece confinado ao local de inoculação, o que geralmente reflete alta imunidade do hospedeiro e é mais comum em áreas endêmicas (BELKNAP, 1989). As formas cutânea

disseminada e extracutânea têm sido observadas principalmente em pacientes imunocomprometidos, com doenças hematológicas, diabetes mellitus, uso de drogas imunossupressoras, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou em indivíduos com histórico de abuso do álcool. Entre as formas extracutâneas, as mais comuns são a osteoarticular e a pulmonar, mas há relatos de disseminação hematogênica com envolvimento de múltiplos órgãos (KAUFFMAN et al., 1999; ROCHA et al., 2001; CARVALHO et al., 2002; SILVA-VERGARA et al., 2005; LOPES-BEZERRA et al., 2006; ROMERO-CABELLO et al., 2011).

As formas mais graves da esporotricose têm sido associadas a pacientes imunocomprometidos, sugerindo que o *S. schenckii* é um patógeno oportunista (DE ARAÚJO et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2005; LÓPEZ-ROMERO et al., 2011; ROMERO-CABELLO et al., 2011).

Kong e colaboradores (2006) demonstraram que cepas de *S. schenckii* isoladas de esporotricose disseminada quando inoculadas em camundongos levam ao início da doença mais cedo e lesões mais graves do que as cepas isoladas de esporotricose linfocutânea. Por sua vez, as lesões linfocutâneas induzem a doença mais cedo e lesões mais graves do que as observadas em cepas da doença cutânea fixa.

A termo tolerância também parece ser um fator importante para o desenvolvimento de algumas formas clínicas. Estudos *in vitro* demonstraram que amostras isoladas de lesões cutâneas localizadas foram capazes de crescer a 35°C, mas não a 37°C. Enquanto as amostras isoladas de lesões linfocutâneas, extra cutâneas e disseminadas apresentaram termo tolerância e cresceram a 37°C (DE ALBORNOZ et al., 1986; TACHIBANA et al., 1998). Mesa-Arango e colaboradores (2002) realizaram um estudo na Colômbia, onde observaram que os isolados obtidos das lesões superficiais da pele causadas pelo fungo *S. schenckii* apresentavam baixa termo-tolerância a 35°C e 37°C.

Algumas características do fungo são responsáveis pelo seu desenvolvimento e por isso tem sido alvo de estudo para melhor compreensão dos seus mecanismos de virulência. Em 1971, isolou-se o peptídeo-ramnomanana, o qual é composto por D-manose (50%), L-ramnose (33%), galactose (1%) e aproximadamente 16% de peptídeos. Dentre estes constituintes, os resíduos de ramnose ficaram conhecidos por

serem os principais epítomos antigênicos presentes na superfície da célula fúngica (LLOYD e BITOON, 1971, CASTILLO et al., 1990).

Fernandes e colaboradores (1999) observaram que de acordo com o tempo de cultura em ágar Saboraud havia diferença na composição da parede celular fúngica, sendo que os conídios de culturas mais recentes apresentavam maior teor de ramnose, sendo estes mais virulentos e capazes de induzir a doença sistêmica aguda. As diferenças na composição da parede celular parecem influenciar também em outras infecções fúngicas clinicamente importantes como aquelas causadas pela *Candida albicans* (MENCACCI et al., 1994; LEWIS et al., 2012), *Paracoccidioides brasiliensis* (ALBUQUERQUE et al., 2012) e *Cryptococcus neoformans* (KOZEL, 1995).

As enzimas extracelulares podem contribuir para a virulência do *S. schenckii*, a capacidade do fungo de invadir a pele e tecidos cutâneos sugere a presença de proteases como fatores para a invasão. Neste sentido, Tsuboi e colaboradores (1987) observaram que duas proteases (protease I e II) eram secretadas pelo *S. schenckii* no meio de cultura e estas eram capazes de hidrolisar o colágeno tipo I e elastina, componentes naturais da pele. Posteriormente foi observada uma resposta de anticorpos dirigidos contra estas duas proteases (YOSHIKE et al., 1993).

Existem relatos da participação da proteína fosfatase ácida na interação entre o fungo e o macrófago, a sua atividade foi associada a membrana do fagolisossomo e a células fúngicas parcialmente degradadas (GARRISON e ARNOLD, 1983; HOGAN et al., 1996).

O ergosterol isolado da membrana do fungo *S. schenckii* na forma de levedura pode estar relacionado à sua virulência como um mecanismo de evasão das espécies reativas do oxigênio durante a fagocitose, através da formação do ergosterol peróxido (SGARBI et al., 1997).

Outras moléculas, como as que possuem ácido siálico, podem contribuir para a virulência do *S. schenckii*. Estudos demonstraram que as células leveduriformes estavam protegidas da fagocitose por macrófagos peritoneais na presença de resíduos deste ácido. Os mesmos podem ainda ser liberados formando agregados que interagem com os anticorpos e outros elementos do sistema imune deixando o fungo livre para proliferar e invadir os tecidos (ODA et al., 1983; ALVIANO et al., 1999).

Lima e colaboradores (2001) demonstraram que o fungo possui integrinas e moléculas adesinas para lectina que são capazes de reconhecer várias moléculas humanas. As fibronectinas estão localizadas na parede da levedura e estas podem estar relacionadas à sua virulência (LIMA et al., 2001; TEIXEIRA et al. 2009). A proteína de 70 KDa da parede celular também foi caracterizada como uma mediadora da adesão subendotelial e da matriz extracelular da derme (NASCIMENTO et al., 2008; RUIZ-BACA et al. 2008)

A presença de melanina tem sido relacionada à virulência de vários fungos patogênicos. Estudos *in vitro* demonstraram que a produção de melanina pelo *S. schenckii* pode estar relacionada a vários fatores, tais como: temperatura, pH e condições nutricionais do meio (ALMEIDA-PAES et al., 2009). A melanina produzida parece proteger os conídios fúngicos de danos oxidativos por radicais livres e conferir alta resistência à fagocitose pelos macrófagos (ROMERO-MARTINEZ et al., 2000).

A presença de melanina nos fungos *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum* pode estar relacionada a redução da suscetibilidade destes à anfotericina B (VAN DUIN et al., 2002). Alguns casos de esporotricose, especialmente na doença extracutânea ou em pacientes infectados pelo vírus HIV, também foram associados a redução na eficácia do tratamento quando o fungo produzia melanina (MORRIS-JONES et al., 2003).

O componente lipídico da superfície celular desempenha papel importante na patogênese desta micose inibindo o processo fagocítico e induzindo a liberação de óxido nítrico (NO) e de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) em cultura de macrófagos (CARLOS et al., 2003).

Os mecanismos imunológicos envolvidos no controle e na prevenção da infecção ainda permanecem desconhecidos, sabe-se que tanto a resposta mediada por células como a humoral são capazes de responder aos antígenos fúngicos. A resposta imune inata apresenta um papel na patogênese da doença, como o observado em resposta aos lipídios presentes na parede celular que foram capazes de inibir a fagocitose (SGARBI et al., 1997; CARLOS et al., 2003). Além disso, também foi observada a resposta humoral induzida por proteínas fúngicas secretadas, como o exoantígeno (MAIA et al., 2006).

O fato é que apesar de se conhecer a participação dos macrófagos na infecção por *S. schenckii* ainda existem lacunas para melhor compreender o seu papel, uma vez que desempenham importantes funções na contenção de agentes agressores, sendo um dos principais constituintes do sistema imune inato envolvido na defesa do hospedeiro.

## 2.2 Macrófagos

Os macrófagos foram descritos pela primeira vez por Metchnikoff em 1908, o qual descreveu a importância desta célula na resposta imune inata através do processo de fagocitose, mais tarde Paul Ehrlich ganhou o prêmio Nobel por relacionar os macrófagos a resposta imune humoral (GORDON, 2007). Desde então, a participação dos macrófagos na resposta imune vem sendo estudada e relacionada a diversas doenças (HE et al., 2009; SIERRA-FILARDI et al., 2010; HAO et al., 2012).

Os macrófagos são caracterizados por um fenótipo heterogêneo, consequência de sua ampla distribuição tecidual e da diferenciação celular resultante das adaptações aos microambientes onde se localizam, além da responsividade a muitos estímulos endógenos e exógenos (GORDON, 2003). O primeiro evento durante a resposta imune inata nos mamíferos é a ativação destas células, que fagocitam os patógenos invasores e secretam citocinas que medeiam outros eventos da resposta imune (GORDON, 2007; ABBAS et al., 2008).

A resposta imune é iniciada através do reconhecimento de produtos microbianos denominados PAMPs (do inglês, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) que interagem com receptores específicos para componentes microbianos, como os “Toll Like Receptors” (TLR), sendo estes os principais receptores de reconhecimento padrão (PRR) envolvidos na imunidade inata (TAYLOR et al., 2005; AKIRA et al., 2006).

Os PAMPs são expostos na superfície de microrganismos como vírus, bactérias, fungos e parasitas, apresentando características comuns: são expressos normalmente por microrganismos e não por células do hospedeiro, mostram pouca variação entre os microrganismos e a sua expressão é essencial para a sobrevivência destes patógenos (TEIXEIRA et al., 2002). Uma efetiva resposta imune depende do reconhecimento dos PAMPs pelos macrófagos que distinguem o agente infeccioso do “próprio”. Após esse reconhecimento, os TLRs ativados sinalizam componentes que ativam respostas imunes

apropriadas necessárias para defesa do hospedeiro (KAWAI e AKIRA, 2007; CARLOS et al., 2009; SASSÁ et al., 2009).

Alem disso, os macrófagos são mediadores imprescindíveis entre a imunidade inata e a adaptativa através do processamento e apresentação de antígeno às células T e liberação de moléculas moduladoras, direcionando desta maneira a imunidade adaptativa para uma resposta celular (Th1) ou humoral (Th2) (IONTCHEVA et al., 2004).

Antígenos microbianos, produtos tumorais, células T efectoras Th1 e Th2 e seus produtos secretados, influenciam a heterogeneidade e o estado de ativação das populações de macrófagos (MUNDER et al., 1998). Dependendo do padrão de ativação, os macrófagos são classificados em M1 ou M2.

A ativação “clássica” pode ocorrer em presença dos mediadores IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , após o reconhecimento de PAMPs (LPS, lipoproteínas, etc.), ou por meio de sinais endógenos (proteínas de choque térmico, etc.). Macrófagos ativados pela via clássica, chamados M1, em geral produzem níveis elevados de interleucina 12 (IL-12) e baixos níveis de IL-10, participando como indutores e efetores de resposta imune Th1. Estas células apresentam ainda atividades citotóxicas, resultado de sua capacidade de secretar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (óxido nítrico, peroxinitrito, peróxido de hidrogênio e superóxido) e pró-inflamatórias, com liberação de citocinas como o TNF, IL-1 e IL-6 (MANTOVANI et al., 2004; HAO et al., 2012).

A persistência do processo inflamatório frequentemente resulta em danos teciduais e ao DNA, podendo contribuir para o desenvolvimento do câncer (DE VISSER et al., 2006). Por essa razão, no decorrer da resposta imune, a inflamação deve ser combatida através do desenvolvimento de mecanismos anti-inflamatórios (RAUH et al., 2005).

Mediadores distintos foram reportados como inibidores do desenvolvimento das células M1, atribuindo propriedades anti-inflamatórias aos macrófagos, os quais são coletivamente designados M2, provenientes de uma ativação “alternativa”. Dependendo do estímulo recebido os M2 podem ainda ser subdivididos em M2a, M2b e M2c (MANTOVANI et al., 2004; MARTINEZ et al., 2009).

A exposição a IL-4 e IL-13 induzem a polarização M2a que está envolvida na produção de quimiocinas responsáveis por acelerar o recrutamento de eosinófilos,

basófilos e células Th2. Os M2b são induzidos por complexos imunes, LPS, TLRs e receptor antagonista da IL-1 (IL-1ra), sendo que as quimiocinas liberadas por esta população em combinação com seus receptores promovem a infiltração de eosinófilos, células Th2 e células T regulatórias, responsáveis pela imuno-regulação. Por fim, os M2c são induzidos pela IL-10, TGF- $\beta$  ou glicocorticoides, neste caso a IL-10 liberada pelos macrófagos é conhecida por estimular a liberação de quimiocinas que também levam ao acúmulo de eosinófilos e células T *naive*, os quais tem um importante papel na supressão da resposta imune e promovem o remodelamento tecidual (MANTOVANI et al., 2004; MARTINEZ et al., 2009).

Os receptores F4/80 e CD11b tem sido considerados marcadores para população de macrófagos (ZHANG et al., 2008) e para fenotipagem das subpopulações tem-se utilizado os receptores de superfície CD197 (M1), CD23 e CD206 (M2) (BENOIT et al., 2008; DE PÁDUA-QUEIROZ et al., 2010; MUELLER e SCHULTZE-MOSGAU, 2011).

A principal via efetora de macrófagos é mediada por produção de óxido nítrico (NO) através da enzima “inducible NO synthase” (iNOS), usando L-arginina como substrato. A via metabólica alternativa utiliza arginase para converter L-arginina em L-ornitina, tendo como produto final uréia (MUNDER et al., 1999).

A iNOS é pertencente à uma família de enzimas conhecidas como NOS. Três isoformas distintas de NOS foram descritas como produto de três diferentes genes, apresentando diferenças na localização intracelular, regulação e propriedades catalíticas. NOS1 (também denominada nNOS) é prevalente em neurônios; NOS2 (conhecida com iNOS) está presente em várias células do sistema imune; e NOS3 (também chamada eNOS) é encontrada em células endoteliais (BRONTE e ZANOVELO, 2005).

Anfíbios e mamíferos expressam duas isoformas de arginase, a I e II, ambas isoformas catalisam a mesma reação com uréia como produto final. Contudo, são codificadas por diferentes genes, além de possuírem diferentes distribuições celulares (JENKINSON et al., 1996). Arginase I é uma enzima citosólica, expressa exclusivamente no fígado (KANYO et al., 1996). Arginase II é mitocondrial, distribuída em vários tecidos, principalmente rim, glândulas mamárias, próstata, intestino e cérebro (JENKINSON et al., 1996).

A regulação do balanço iNOS/arginase por mediadores Th1, como IFN- $\gamma$  e LPS, e por citocinas Th2, como IL-4 e IL-13, sugere que a análise do nível de NO e atividade da arginase em populações distintas de macrófagos refletem seu estado de ativação (BRONTE e ZANOVELLO, 2005). Contudo, o LPS, comumente conhecido como indutor de citocinas Th1, pode ativar a expressão de ambos, arginase e iNOS, em macrófagos e outras células imunes (MILLS et al., 2000; BRONTE e ZANOVELO, 2005).

Ao contrário da iNOS, pouco é conhecido sobre a regulação e função das arginases no sistema imune. Acredita-se que a arginase participa da regulação da síntese de NO por competição pelo substrato. Outras funções incluem o envolvimento em processos de reparação e remodelação tecidual e em ações anti-inflamatórias (JENKINSON et al., 1996).

A interleucina 12 é um heterodímero composto por duas subunidades, a p40 e a p35, a qual apresenta vários efeitos na resposta imune que induzem a diferenciação Th1 e levam a produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral (TNF) pelos linfócitos T e células *natural killer* (NK) (WIEKOWSKI et al., 2001; TRINCHIERI et al., 2003). A IL-23 é um heterodímero da família da IL-12, formado pela subunidade p40 e por uma subunidade menor, a p19, esta citocina tem sido correlacionada a ativação de células T de memória levando a secreção de elevados níveis de IL-17, gerando um perfil Th17 (AGGARWAL et al., 2003; IVANOV et al., 2007). Estudos mais recentes têm associado a IL-23 a modelos de autoimunidade (CROXFORD et al., 2012).

A IL-10 é uma citocina produzida principalmente por macrófagos e monócitos, que apresenta efeitos pleiotrópicos na inflamação e na imunoregulação (MOORE et al., 2001; DEEPE e GIBBONS, 2003). A IL-10 atua nas células T limitando a produção de IFN- $\gamma$ , uma vez que suprime a produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas, desta forma modula as reações da imunidade inata e da imunidade mediada por células (CLEMONS, 2000; ZHOU et al., 2005). A IL-10 produzida por linfócitos B pode ser a responsável por promover a proliferação de macrófagos M2 que favorecem o crescimento tumoral, uma vez que estes estimulam a angiogênese (SICA et al., 2010).

O TGF- $\beta$  apresenta três isoformas, a TGF $\beta$ 1,  $\beta$ 2 e  $\beta$ 3, as quais apresentam propriedades similares *in vitro*, mas *in vivo* estudos tem demonstrado que as isoformas

apresentam funções distintas, provavelmente devido a expressão temporal e espacial diferentes observadas durante o desenvolvimento em camundongos (MILLAN et al., 1991; ISEKI et al., 1995). É uma citocina multifuncional que regula a proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência celular, apresentando efeitos regulatórios em vários tipos celulares, incluindo células hematopoiéticas e epiteliais (BLOBE et al., 2000).

Estudos sobre a polarização de macrófagos em doenças bacterianas demonstraram que os macrófagos M1 geralmente estão associados à proteção durante a fase aguda. Shaughnessy e Swanson (2007) verificaram que indivíduos imunocomprometidos e mulheres grávidas afetados pela *Listeria monocytogenes* apresentavam um perfil M1, o que impedia a bactéria de evadir do fagossomo contribuindo para sua destruição tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

O agente etiológico da gastroenterite, *Salmonella typhimurium*, também induziu a polarização M1 em macrófagos murinos o que provavelmente estava associado ao controle da infecção (JOUANGUY et al, 1999). Entretanto, outros estudos demonstraram que a ativação excessiva e prolongada da população M1 pode levar a dano tecidual e falência múltipla de órgãos (LIANG et al., 2005; PINHEIRO DA SILVA et al., 2007)

O perfil M2 associado à alta produção de IL-10 em pacientes leproso mostrou uma supressão no mecanismo de defesa inato do hospedeiro (BLEHARSKI et al., 2003). Benoit e colaboradores (2008) demonstraram que quando os monócitos infectados com *Coxiella burnetii* eram tratados com IL-10, IL-4 ou TGF- $\beta$ 1, estes assumiam um perfil M2 o que permitia uma intensa replicação bacteriana e poderia explicar a persistência da doença.

O fato é que há muito que se conhecer sobre a participação das células do sistema imune em infecções, incluindo as infecções fúngicas, em termos do fenótipo e função que elas assumem em cada momento. Quando se trata do fungo *S. schenckii*, este ainda é pouco estudado, portanto o conhecimento das populações celulares de macrófagos envolvidos na resposta imune à esporotricose poderá auxiliar no esclarecimento sobre as células efetoras que estão envolvidas na eliminação ou favorecimento desta infecção.

### 3 OBJETIVO GERAL

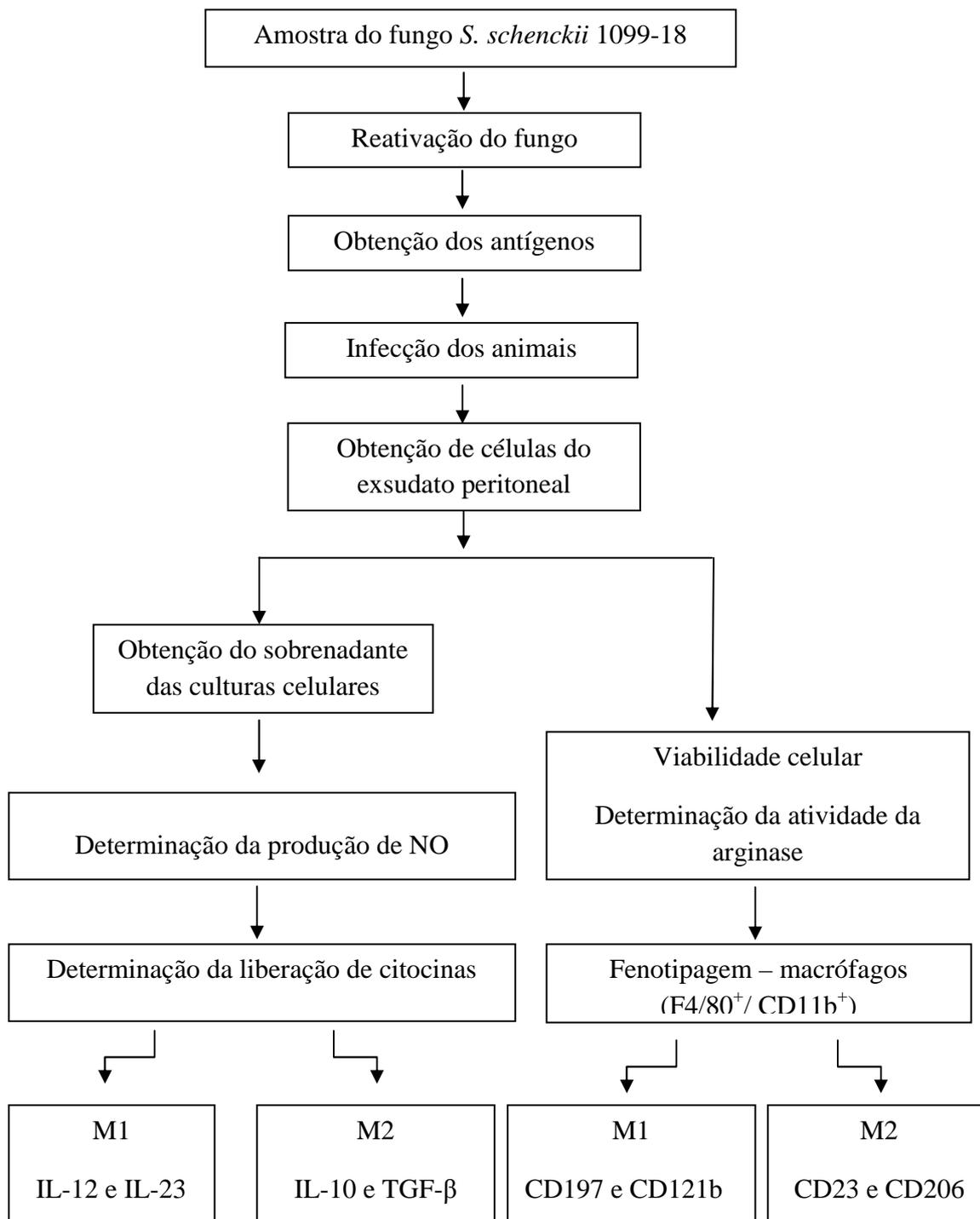
Avaliar o perfil fenotípico e a participação das subpopulações M1 e M2 durante a infecção induzida por *S. schenckii* em modelo murino.

#### 3.1 Objetivos específicos:

- a) Avaliar a expressão dos receptores CD11b e F4/80 para macrófagos e os receptores de superfície específicos para as sub-populações M1 (CD197 e CD121b) e M2 (CD23 e CD206).
- b) Avaliar o estado funcional dos macrófagos peritoneais quanto à produção de óxido nítrico pelas células M1 e determinação da atividade da arginase pelas células M2.
- c) Avaliar o perfil M1 (IL-12 e IL-23) e M2 (IL-10 e TGF- $\beta$ ) das citocinas produzidas em sobrenadantes de cultura de macrófagos estimuladas com exoantígeno e extrato lipídico do fungo *S. schenckii*.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento experimental



## 4.2 Microrganismo

Foi utilizada a cepa 1099-18 do fungo *Sporothrix schenckii* isolada de um caso de esporotricose humana na seção de Micologia do Departamento de Dermatologia da Columbia University, New York, NY, EUA. Essa cepa foi gentilmente cedida pela Dra. Celuta Sales Alviano do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

## 4.3 Animais

Todos os procedimentos realizados nesse trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP-Araraquara-SP) (Protocolo n° 13/2009). Foram utilizadas linhagens de camundongos *Swiss* machos, pesando entre 18-25g, com idade entre 45 e 60 dias procedentes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) – UNICAMP (Campinas-SP). Os animais foram separados em cinco e mantidos em mini-isoladores em um ambiente com temperatura ( $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade (65-75%) e ciclos de luz (12h claro-12h escuro) controlados, alimentados com água e ração estéreis *ad libitum* e acondicionados em um ambiente “germ-free”. Os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>.

## 4.4 Reativação do fungo *Sporothrix schenckii*

Foi realizada a reativação da cepa 1099-18 do fungo *Sporothrix schenckii* de acordo com a metodologia descrita por Lacaz e colaboradores (2008), para isso foram utilizados 3 camundongos da linhagem C57BL/6 os quais foram inoculados via intratesticular com 0,5 mL de uma suspensão densa de *Sporothrix schenckii* na forma miceliar em solução de PBS. Após quatro semanas, os animais foram eutanasiados para remoção do testículo, baço e nódulos linfáticos, os quais foram macerados e plaqueados em placas contendo BHI Agar (*Brain Heart Infusion*, Difco). As placas foram mantidas a 37°C por 15 dias em estufa contendo tensão constante de 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, o fungo foi cultivado para dar prosseguimento às demais etapas do projeto. Então, cinco isolados fúngicos foram semeados em meio ágar dextrose *Sabouraud* (Difco) para que fosse obtido o tapete de células fúngicas na forma miceliar em

temperatura ambiente. Esse tapete foi removido e imerso em meio BHI caldo para a obtenção do fungo na forma leveduriforme.

## **4.5 Obtenção dos antígenos**

### **4.5.1 Exoantígeno (ExoAg)**

A obtenção do exoantígeno do fungo foi feita de acordo com a metodologia descrita por Carlos et al. (2003). O fungo cultivado 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, novamente submetida à radiação UV por mais uma hora. Em seguida, acrescentou-se timerosal na concentração final de 1/5000. A suspensão celular foi, então, congelada a -20°C por 48 h. Após esse período, foi realizado teste de esterilidade em Ágar Dextrose Sabouraud (Difco). A suspensão celular obtida foi centrifugada e o sobrenadante filtrado. O filtrado obtido foi concentrado 50 a 100 vezes em polietilenoglicol 2000 (Fluka). A dosagem de proteínas no exoantígeno obtido foi feita pelo método de Lowry e colaboradores (1951).

### **4.5.2 Extrato lipídico (EL)**

Os lipídeos foram extraídos a partir da massa de células obtidas por centrifugação da cultura do fungo na forma leveduriforme. Através de extrações sucessivas por sonicação com 10 volumes (ml/g de peso úmido) dos seguintes sistemas solventes: clorofórmio: metanol (C:M) (2:1, v/v) e (1:1) e C:M:H<sub>2</sub>O (C:M:H) (4:8:3, v/v) e concentrados até a secura a vácuo. Os testes foram realizados com o extrato bruto obtido na concentração de 57,6 ug/mL (CARLOS et al., 1999).

### **4.5.3 Dosagem proteica**

As proteínas presentes no exoantígeno foram dosadas de acordo com o método de Lowry et al. (1951). Segundo o qual em uma primeira etapa há a formação de complexos de cobre-proteína, que são reduzidos após a adição do reagente de Folin. A máxima formação de cor ocorre quando a redução se dá em pH 10, no qual o reagente se mantém reativo por um curto tempo (razão pela qual a agitação deve ser rápida após sua adição). A queda da reatividade se dá provavelmente pela formação de ácido

fosfórico devido a dissociação do fosfomolibdato, o que reduz o pH do meio reacional. Por esta razão, adiciona-se  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  para tamponar o meio e limitar a queda do pH.

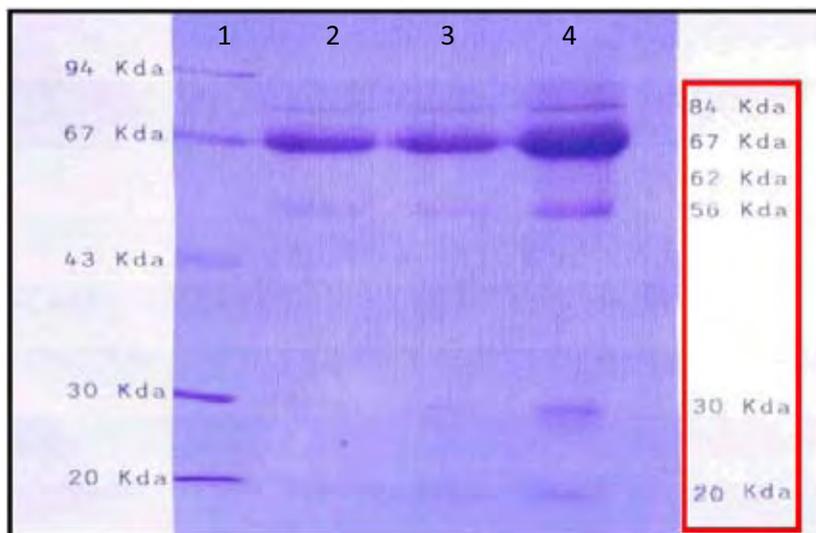
Para essa dosagem, foi preparada uma curva padrão com BSA 0,1% (albumina de soro bovino) nas seguintes concentrações 0,01 mg/mL, 0,02 mg/mL, 0,04 mg/mL, 0,08 mg/mL e 0,16 mg/mL e, como branco foi utilizada a água destilada. O teste foi realizado em duplicata. A amostra-teste foi diluída 1:50, logo após foram adicionados 3 mL da mistura reativa ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% em NaOH 0,1N,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1%, tartarato de Na 2%) em cada um dos tubos e estes foram incubados por 10 min a temperatura ambiente. Em seguida, acrescentou-se 300  $\mu\text{l}$  do líquido de Folin diluído e os tubos foram rapidamente homogeneizados e incubados a temperatura ambiente por 30 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Genesys 2 (Spectronic Unicam, EUA) em filtro de 660 nm. Os testes foram realizados na concentração 50  $\mu\text{g/mL}$  para ExoAg (CARLOS et al., 1992; CARLOS et al., 1994; MAIA et al., 2006).

#### **4.6 Separação de proteínas (SDS-PAGE)**

A separação de proteínas do exoantígeno por SDS-PAGE foi utilizada para mostrar a presença da fração protéica de aproximadamente 67 kDa relacionada à virulência (TEIXEIRA et al., 2009; NASCIMENTO e ALMEIDA, 2005; NASCIMENTO et al., 2008, SCOTT e MUCHMORE, 1989) tal como observada em estudos anteriores realizados no laboratório (MAIA et al., 2006, SASSÁ et al., 2009).

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada na presença de agente desnaturante SDS e agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol, segundo a técnica descrita por Laemmli (1970). Para a preparação do gel foi utilizado acrilamida/bis-acrilamida na proporção de 30:0,8% e preparado um gel de empilhamento a 5% pH 6,8, contendo 0,5M de Tris-HCl (pH 6,8) e 0,1% de SDS e um gel de separação a 13,5% pH 8,8 e 0,1% de SDS. As amostras dos antígenos foram diluídas no tampão de amostra contendo SDS (0,2g), azul de bromofenol (0,0001g), Tris-HCl (1,25 pH 6,8 0,5M), glicerol (1mL) e água Milli-Q (q.s.q. 10mL), sendo que a redução foi realizada com o acréscimo de  $\beta$ -mercaptoetanol. As amostras foram fervidas a 100°C por 5 minutos. As corridas foram acompanhadas com padrão de peso molecular de proteínas (GE Healthcare) empregando uma fonte de corrente contínua (Power pac 300 – Bio-Rad) ajustada a 25mA e 100V até que as amostras atingissem 1,5cm do final do gel. Os géis

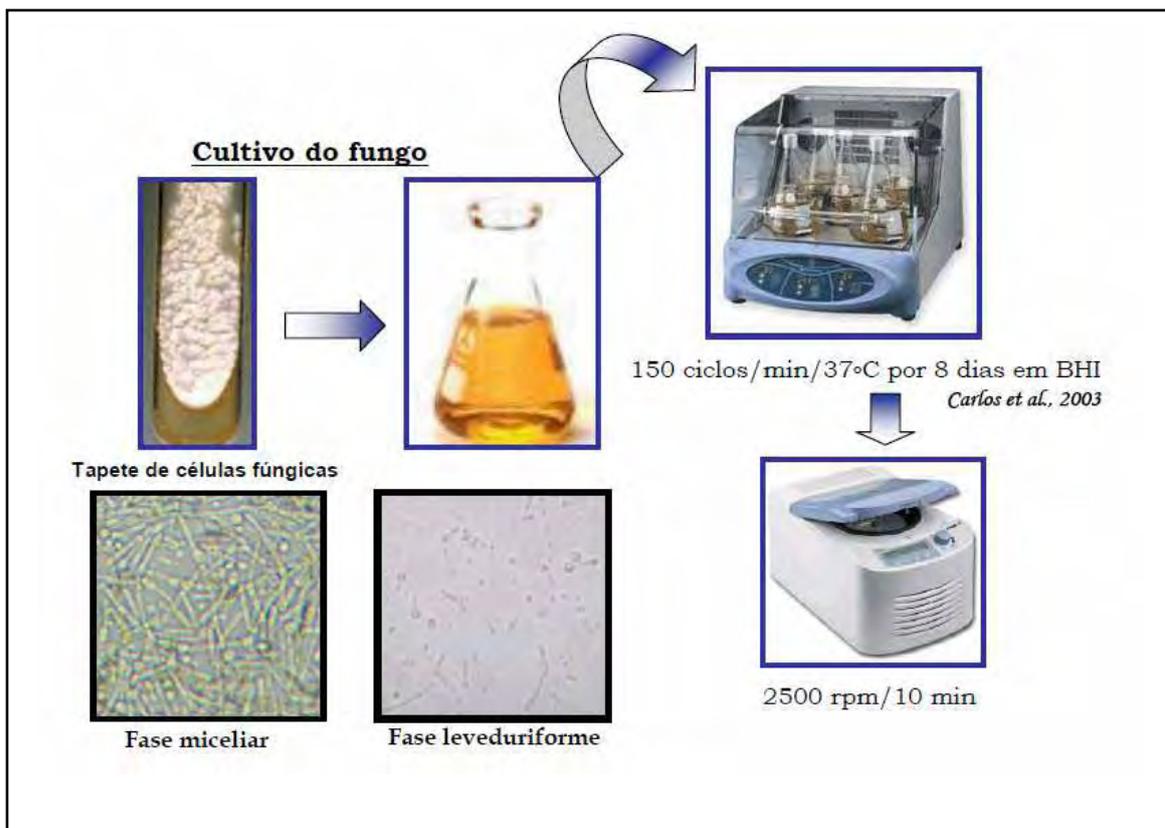
foram corados com Coomassie Brilliant Blue R 250 (Sigma Chemical Co, St Louis/USA) a 0,25% para conferir o padrão de separação eletroforética. O padrão eletroforético está apresentado a seguir (Figura 2):



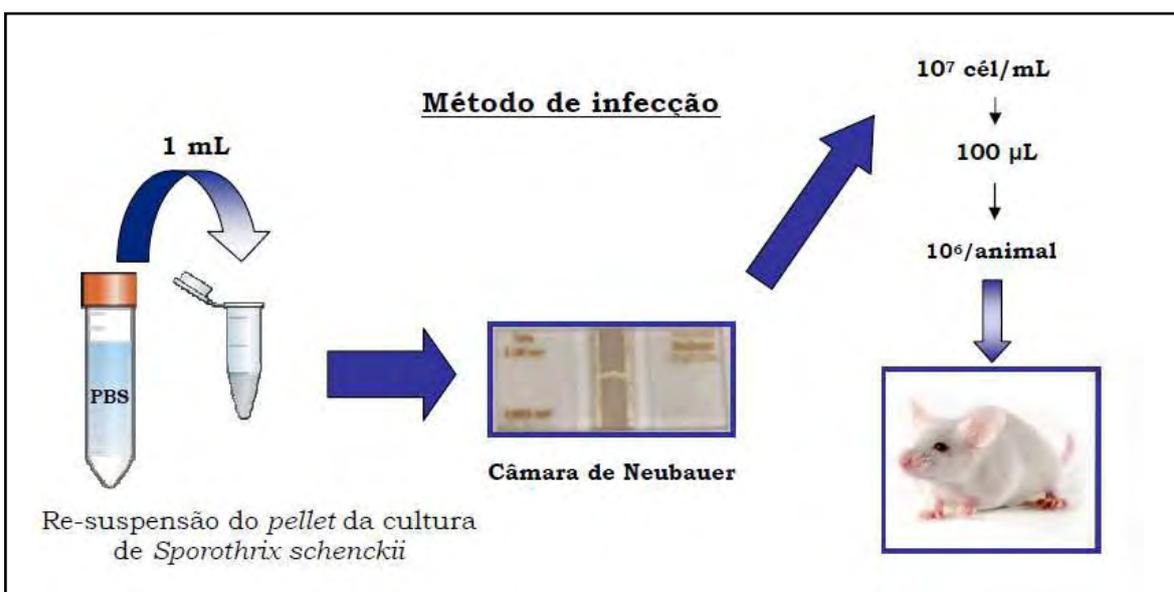
**Figura 2.** Gel de SDS-PAGE corado com Coomassie Blue.  
 Posição 1- Marcador de baixo peso molecular (GE Healthcare).  
 Posições 2, 3 e 4- Amostras do exoantígeno (diluídas 1:100; 1:50 e 1:10, respectivamente).

#### 4.7 Infecção

O método de infecção foi realizado cultivando-se o fungo à 37°C por 20 dias em BHI caldo (Difco) com constante agitação 150 ciclos/min (CARLOS et al., 2003). Uma alíquota desta cultura foi centrifugada (Centrífuga Fanem, INd. Bras.) a 2500 rpm por 10 min (Figura 3) e o *pellet* obtido foi ressuscitado em 1 mL de PBS para a contagem em câmara de Neubauer (Boeco, Germany). A suspensão foi ajustada à concentração de  $10^7$  células/ml e, cada animal, foi inoculado intraperitonealmente, com 0,1mL desta suspensão contendo  $10^6$  células leveduriformes (MAIA et al., 2006) (Figura 4). Os períodos analisados foram a 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas de infecção, as quais foram escolhidas de acordo com estudo já realizado em nosso laboratório (MAIA et al., 2006).



**Figura 3.** Método de cultivo do fungo *Sporothrix schenckii*.



**Figura 4.** Método de infecção pelo fungo *Sporothrix schenckii*.

#### **4.8 Obtenção das células do exsudato peritoneal**

Foram obtidas células do exsudato peritoneal (PECs), onde os animais foram previamente estimulados com 3,0 mL de tioglicolato de sódio 3% envelhecido (três meses) (Difco Lab. Ltda) através de inoculação intraperitoneal três dias antes de serem eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>. Os animais tiveram a pele da região abdominal retirada assepticamente em câmara de fluxo laminar Classe 100 e o peritônio exposto. Foram inoculados 5 mL de solução PBS gelado a pH 7,2 na cavidade abdominal. O líquido peritoneal resultante foi coletado e transferido para um tubo cônico estéril e centrifugado a 2500 rpm durante 5 min. O sedimento celular foi lavado três vezes com 3 mL de PBS. Após a última lavagem as células foram ressuspendidas em 1 mL de meio de cultura RPMI-1640 completo (RPMI-1640-C, Sigma) para a contagem de células. O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica tipo Neubauer e a suspensão celular ajustada à concentração final de  $5 \times 10^6$  células para realização dos testes propostos, sendo que as placas com as PECs foram incubadas por 1 h em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C para a formação do “tapete” e após este período foi desprezado o sobrenadante e acrescentado o mesmo volume inicial de RPMI-C.

#### **4.9 Avaliação da viabilidade celular – método MTT**

Para o ensaio de viabilidade celular, utilizou-se o método baseado na capacidade que têm as células viáveis de clivar o anel tetrazólico presente no MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa, formando cristais de formazana (MOSMANN, 1983).

A uma placa de microtitulação de 96 cavidades de fundo plano (Corning, Inc.) foram distribuídos 100 µL por cavidade das suspensões de células do exsudato peritoneal de animais infectados e não infectados, ajustadas à concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL em meio de cultura RPMI-1640-C em presença de 100 µL de cada composto, sendo exoantígeno na concentração final de 50 µg/mL, extrato lipídico na concentração final de 57,6 µg/mL, LPS a 1 µg/mL ou somente meio de cultura RPMI-1640-C, em triplicata. As placas foram incubadas por 24 h, a 37°C, em estufa contendo tensão constante de 5% de CO<sub>2</sub> (Forma Scientific). As células aderentes foram tratadas com 100 µL de uma solução de MTT (Across Organics) a 1 mg/mL em RPMI-1640. A placa foi incubada por mais 3 hs nas mesmas condições anteriores. Após esta incubação,

os sobrenadantes foram descartados e as células aderentes tratadas com 100 µL de isopropanol (Mallinckrodt Chemical) para solubilizar os cristais de formazana formados. A leitura da densidade ótica foi determinada em espectrofotômetro (Multiskan Ascent, Labsystems) em UV/visível, a 540 nm, com filtro de referência de 620 nm.

#### **4.10 Fenotipagem**

A suspensão dos macrófagos peritoneais foi lavada com solução salina tamponada de fosfatos (PBS) contendo 1% de albumina bovina (BSA), em seguida a suspensão foi ajustada para  $1 \times 10^6$  células/mL e incubadas com concentrações ótimas dos anticorpos monoclonais de interesse em tampão de ligação (PBS contendo 1% de BSA) durante 30 min no gelo ao abrigo da luz. Foram realizadas quatro marcações por tubo utilizando-se anticorpos monoclonais para os receptores de superfície: F4/80 (BM8; conjugado com PE/Cy7; BioLegend), CD11b (M1/70; conjugado com FITC; BD Pharmingen), CD197 (4B12; conjugado com 647; BD Pharmingen), CD121b (4E2; conjugado com PE; BD Pharmingen), CD23 (B3B4; conjugado com PE; BD Pharmingen) e CD206 (MR5D3; conjugado com Alexa Fluor 647; BioLegend). Após a incubação, as suspensões celulares foram lavadas novamente em tampão de ligação e foram adquiridos 10000 eventos em citômetro de fluxo (FACSCanto™ flow cytometer, BD Biosciences), analisados pelo programa FACSDiva™. A população de macrófagos foi identificada pela dupla marcação F4/80<sup>+</sup> / CD11b<sup>+</sup>, cujo *gate* foi utilizado para a análise dos receptores das subpopulações de macrófagos. Os resultados foram apresentados em porcentagem (%).

#### **4.11 Determinação da produção de óxido nítrico (NO)**

O NO foi quantificado espectrofotometricamente pela Reação de Griess (GREEN et al., 1982). A partir da cultura de células aderentes do exsudato peritoneal ajustadas como descrito anteriormente no item 4.8., foram retirados 100 µL e colocados em placa de cultura de células de 96 cavidades. Em seguida foram adicionados 100 µL das soluções antigênicas (ExoAg e EL) a serem testadas. A placa foi incubada por 24 hs em estufa incubadora de CO<sub>2</sub> a 37°C (Thermo Electron Hepa Class 100). Alíquotas de 50 µL do sobrenadante de cada amostra em triplicata foram transferidas para uma placa

de cultura de células não estéril contendo 96 cavidades de fundo plano e acrescidas de igual volume de reagente de Griess. Após 10 min de incubação em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a absorvância foi determinada com filtro de 540 nm em espectrofotômetro. A concentração de NO liberado no sobrenadante das culturas celulares foi calculada a partir de uma curva padrão, previamente estabelecida e os valores foram expressos em  $\mu\text{mols}$  de nitrito/ $5 \times 10^6$  células.

#### **4.12 Determinação da atividade da arginase**

A mensuração da uréia foi realizada mediante a observação de ocorrência da reação de hidrólise de L-arginina pela enzima arginase em lisado de células (CORRALIZA et al., 1994). As células foram obtidas após a cultura, ajustadas a  $2 \times 10^6$  células/mL e lisadas com 100  $\mu\text{L}$  de Triton X-100 0,1%. Após 30 min sobre um agitador foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 25 mM e 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{MnCl}_2$  100 mM e incubados por 10 min a  $56^\circ\text{C}$  para ativação da enzima. A hidrólise da L-arginina foi conduzida por incubação de 100  $\mu\text{L}$  do lisado com 100  $\mu\text{L}$  de L-arginina 0,5 M (pH 9,7) a  $37^\circ\text{C}$  por 60 min. A reação foi paralisada com 900  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (96%),  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85%) e  $\text{H}_2\text{O}$  na proporção 1:3:7. A concentração de uréia foi mensurada a 540 nm, após adição de 40  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -isonitrosopropiofenona 9% (Sigma), dissolvido em etanol 100%, seguido de incubação a  $95^\circ\text{C}$  por 30 min. A placa foi lida após um período de 10 minutos em temperatura ambiente em espectrofotômetro a 540 nm. A concentração de uréia foi calculada através de uma curva padrão previamente estabelecida com quantidades conhecidas de uréia. Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1  $\mu\text{mol}$  de uréia por minuto.

#### **4.13 Determinação de citocinas**

As citocinas IL-12, IL-23, IL-10 e TGF- $\beta$  foram quantificadas nos sobrenadantes de células aderentes do exsudato peritoneal obtidas e ajustados como descrito no item 4.8 após 24 hs na presença dos antígenos fúngicos, o doseamento foi realizado através do teste imunoenzimático ELISA de captura para cada citocina (BD OptEIA e EBioscience), de acordo com as instruções do fabricante. As absorvâncias foram lidas a 450 nm em espectrofotômetro UV/visível para microplacas (Multiskan Ascent,

Labsystems), as concentrações de cada citocina foram determinadas utilizando-se uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas dos padrões de cada citocina e os resultados foram expressos em pg/mL.

#### **4.14 Análise estatística**

O dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão das médias e submetidos a análise de variância (one-way ANOVA) com pós teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) utilizando-se o programa GrafPad InStat 3.0.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Viabilidade celular – MTT

A determinação da viabilidade celular foi previamente realizada em células do exsudato peritoneal (PECs) após estímulo prévio com tioglicolato de sódio 3% em camundongos *Swiss* não infectados e infectados com o fungo *S. schenckii*, em diferentes períodos da infecção, a fim de observarmos se a infecção no animal ou os antígenos utilizados como estímulo poderiam ser tóxicos para as culturas celulares.

Os resultados obtidos demonstraram que a viabilidade celular nos camundongos *Swiss* não infectados manteve-se acima de 90% e nos animais infectados acima de 80% mediante os desafios com o ExoAg e o EL (Tabela 1).

Quando comparadas as viabilidades celulares entre os grupos de animais infectados e não infectados mediante cada estímulo e sua respectiva semana de infecção foi observado que a diminuição no primeiro grupo foi estatisticamente significativa em relação ao não infectado ( $p < 0,001$ ) (Tabela 1).

O teste de viabilidade celular mostrou que os antígenos avaliados, assim como as condições de cultura e a infecção não foram tóxicos às culturas celulares, uma vez que a viabilidade dos grupos manteve-se acima de 80%. A questão da viabilidade é fundamental durante o desenvolvimento das manipulações experimentais, assegurando, dessa forma, a capacidade de uma determinada população celular responder às substâncias a serem testadas (FRESHNEY, 1994).

**Tabela 1.** Viabilidade celular (%)<sup>#</sup> em células aderentes do exsudato peritoneal em camundongos *Swiss* não infectados e infectados com o fungo *Sporothrix schenckii*.

Semanas	Não ifectados				Infectados			
	LPS	ExoAg	EL	RPMI	LPS	ExoAg	EL	RPMI
2 <sup>a</sup>	94±0,3	92,1±0,2	95,8±0,9	100±0	91±1,9	85,5±2,1***	87,6±1,8***	100±0
4 <sup>a</sup>	97±0,7	94,3±0,2	91,7±0,5	100±0	93±1,3	86,4±0,5***	87,5±2,1***	100±0
6 <sup>a</sup>	96±0,5	96±0,3	97,9±0,2	100±0	93±1	88,2±0,9***	84,9±3,2***	100±0
8 <sup>a</sup>	98,6±0,4	97,5±0,4	98,9±0,7	100±0	94±0,9	92,9±1,2***	88,2±3,9***	100±0

# média ± desvio padrão

\*\*\*  $p < 0,001$  comparando-se o estímulo dos animais infectados aos não infectados na mesma semana.

## 5.2 Fenotipagem

A expressão das proteínas F4/80, CD11b, CD197, CD121b, CD23 e CD206 foi quantificada na superfície das células do exsudato peritoneal (PECs) em grupos de camundongos infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii*. Os resultados estão representados nas Figuras 5 e 6 e Tabela 2 como média  $\pm$  desvio padrão dos percentuais de expressão de cada proteína.

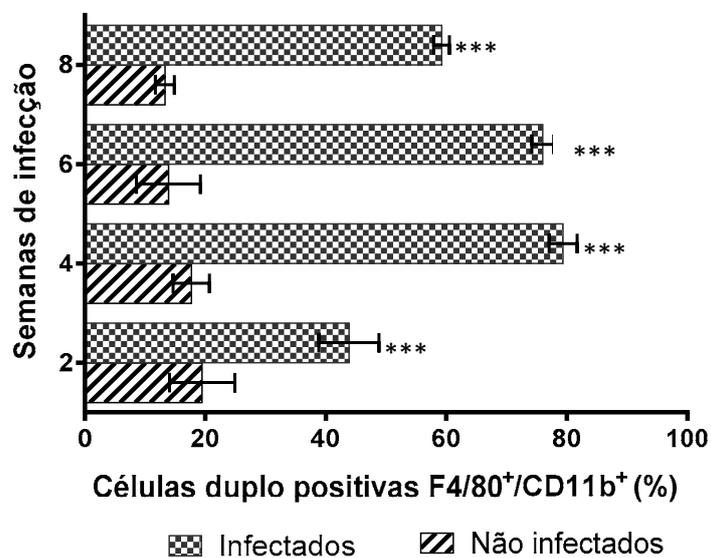
A partir das PECs foi analisada a população duplo positiva para os receptores F4/80 e CD11b, os quais foram utilizados para se identificar o *gate* correspondente a população de macrófagos e quantificar a população durante a cinética.

Os resultados demonstraram que o número de células F4/80<sup>+</sup> e CD11b<sup>+</sup> nos grupos infectados foi estatisticamente significativo ( $p < 0,001$ ) durante toda a cinética quando comparados aos grupos não infectados durante a mesma semana.

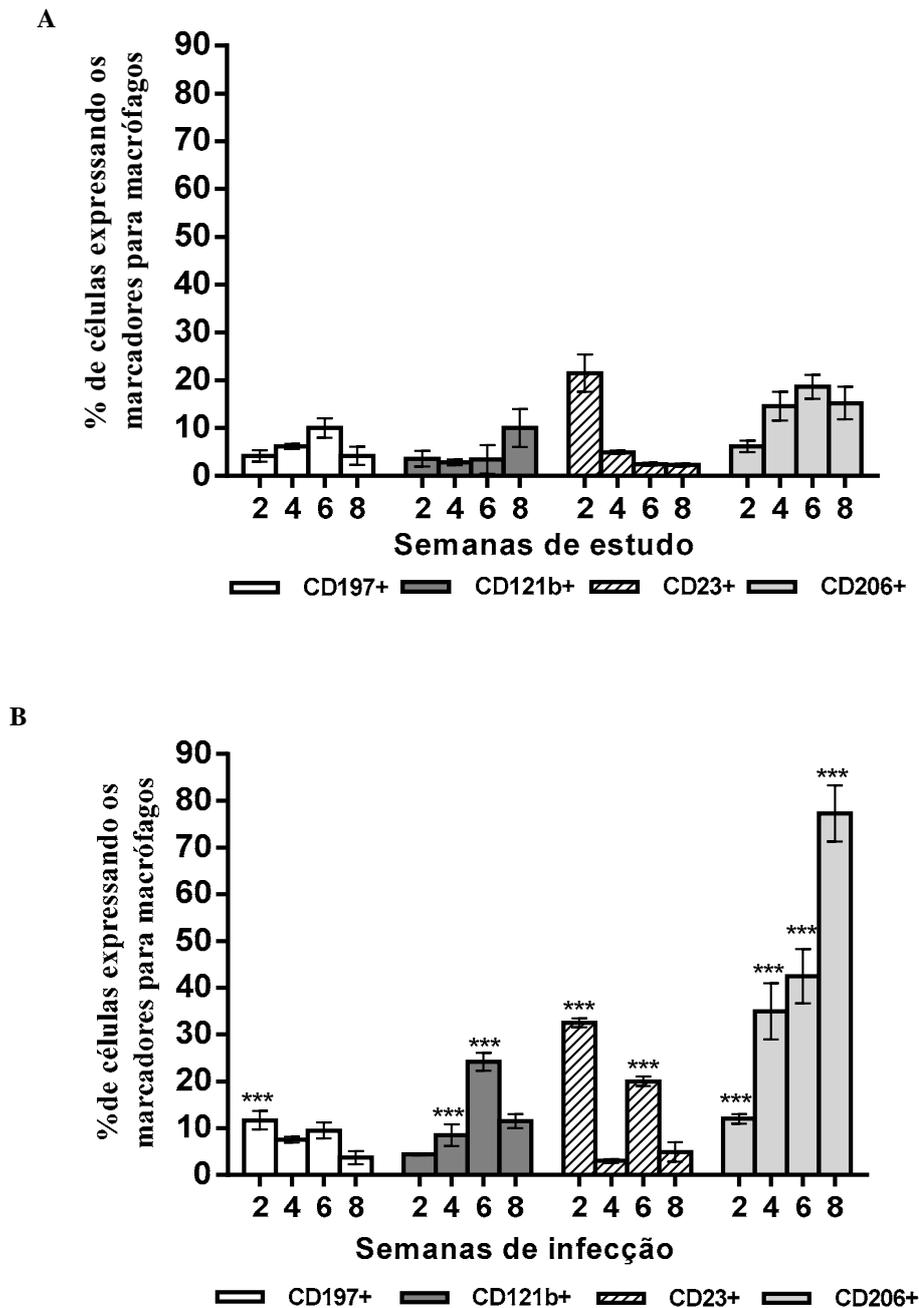
Foi observado um aumento da população de macrófagos, em média quatro vezes maior, a partir da 4<sup>a</sup> semana de infecção quando comparados aos grupos não infectados (Figura 5; Tabela 2), sendo evidente um maior número de células F4/80<sup>+</sup> e CD11b<sup>+</sup> durante a 4<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semana de infecção (79,4% e 76%, respectivamente).

A fenotipagem dos marcadores para as subpopulações revelou que houve aumento na expressão dos receptores de superfície tanto para a população M1 quanto M2, sendo estatisticamente significantes durante a 2<sup>a</sup> (CD197<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup> e CD206<sup>+</sup>,  $p < 0,001$ ), 4<sup>a</sup> (CD121b<sup>+</sup> e CD206<sup>+</sup>,  $p < 0,001$ ) e 6<sup>a</sup> (CD121b<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup> e CD206<sup>+</sup>,  $p < 0,001$ ) semanas de infecção quando comparados ao grupo não infectado na mesma semana da cinética. Na 8<sup>a</sup> semana de infecção houve aumento significativo da expressão do CD206 ( $p < 0,001$ ) comparado ao grupo não infectado (Figura 6B; Tabela 2).

Em suma, no grupo infectado em relação aos não infectados foi observado que na 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semana de infecção há a participação de macrófagos tanto M1 quanto M2. Durante a 8<sup>a</sup> semana, período de resolução da infecção fúngica, o marcador de superfície CD206 indicou a predominância da população M2.



**Figura 5. Fenotipagem de células do exsudato peritoneal (PECs) de camundongos *Swiss* não infectados e infectados com o fungo *S. schenckii* durante a 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas.** Foi realizada análise do *gate* para dupla marcação com F4/80<sup>+</sup> e CD11b<sup>+</sup>. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 5 experimentos independentes por semana de infecção (\*\*\*) $p < 0,001$  comparando o grupo infectado e não infectado na mesma semana da cinética).



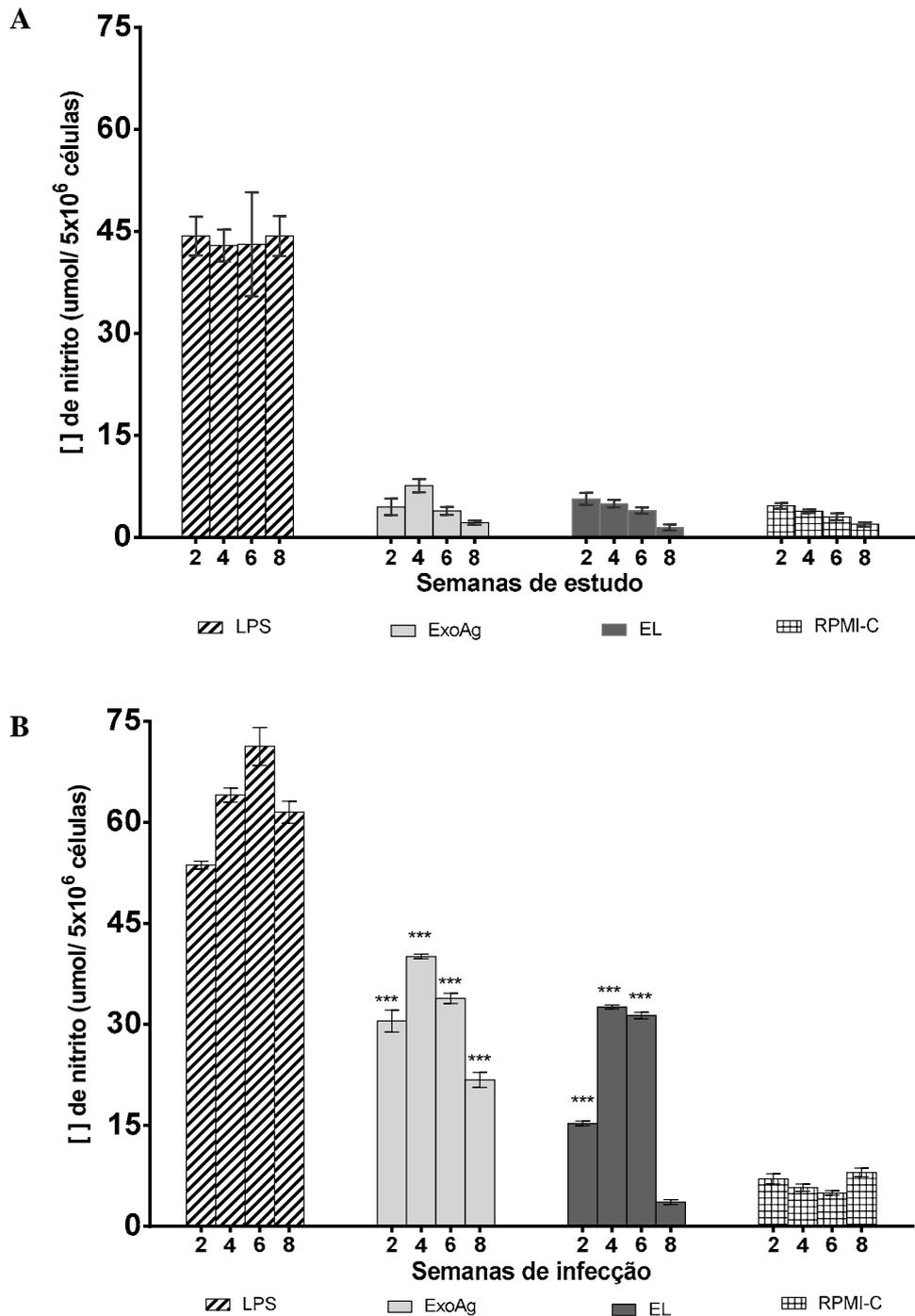
**Figura 6.** Fenotipagem dos marcadores para as populações M1 e M2 em células do exsudato peritoneal (PECs) de camundongos *Swiss* não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* durante a 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas. Foi realizada análise dos receptores CD197, CD121b, CD23 e CD206 a partir do *gate* F4/80<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 5 experimentos independentes por semana de infecção (\*\*\*) $p < 0,001$  comparando-se o grupo infectado ao não infectado na mesma semana da cinética).

### 5.3 Determinação da liberação de óxido nítrico

A determinação da liberação de óxido nítrico (NO) foi realizada em sobrenadantes de culturas de células do exsudato peritoneal (PECs) de camundongos infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii*, mediante o desafio com os antígenos fúngicos: ExoAg e EL, e os controles LPS (controle positivo) ou meio RPMI-1640-C (controle negativo).

A produção de óxido nítrico (NO) pelas PECs revelou que no grupo de animais não infectados não houve a produção de NO em níveis significativos frente os estímulos testados (Figura 7A). Enquanto no grupo de animais infectados com o fungo *S. schenckii* houve produção estatisticamente significativa mediante o desafio com ExoAg, quando comparado ao controle negativo da mesma semana, durante todo o período de infecção ( $p < 0,001$ ). Foram observados picos de produção deste mediador frente o ExoAg na 4ª e 6ª semana.

Em relação ao desafio com EL, a produção de NO foi estatisticamente significativa durante a 2ª, 4ª e 6ª semana de infecção quando comparadas aos controles negativos ( $p < 0,001$ ) (Figura 7B), apresentando o perfil de produção semelhante ao ExoAg com picos na 4ª e 6ª semana.



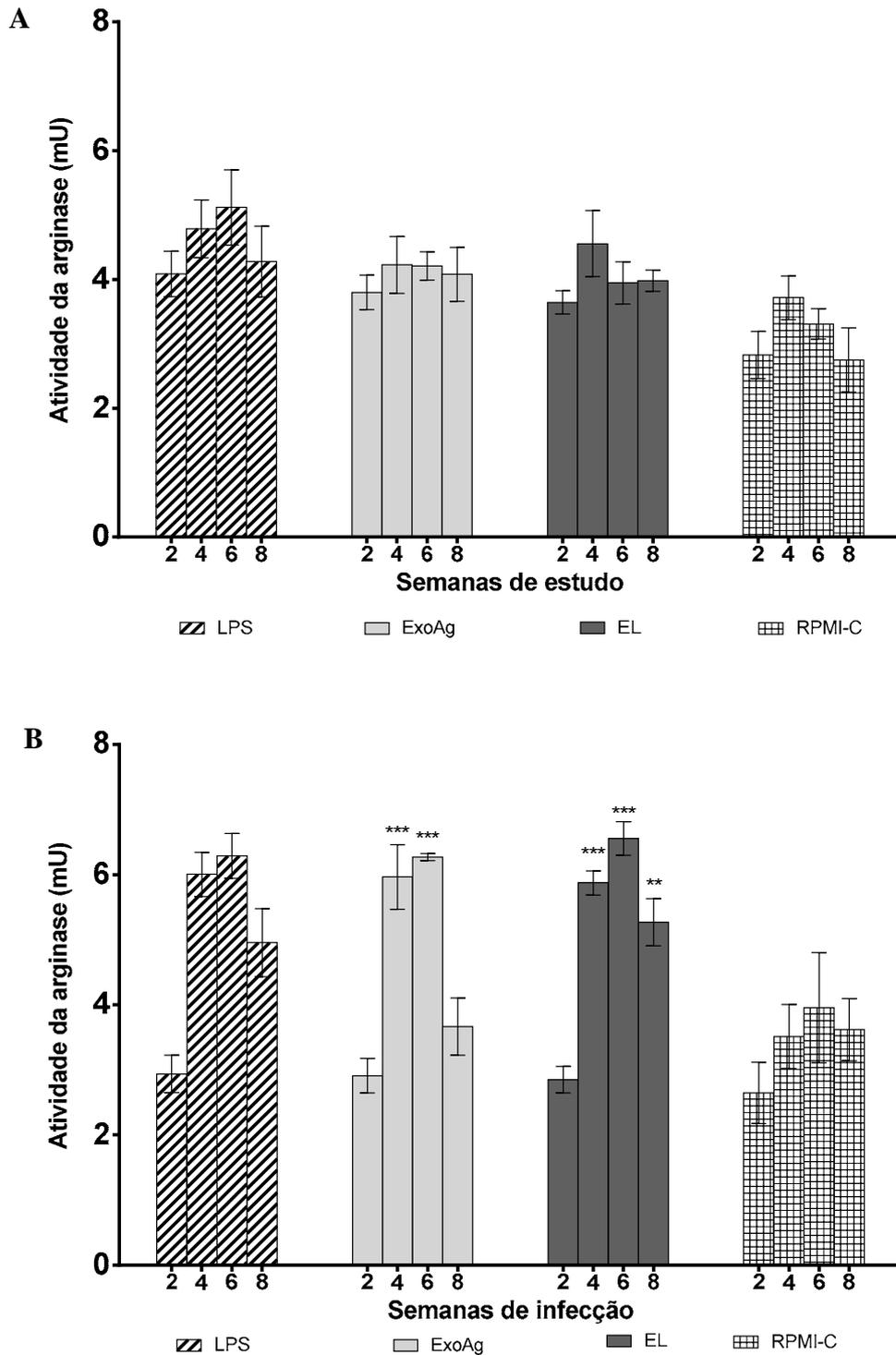
**Figura 7. Produção de NO em cultura de células do exsudato peritoneal (PECs) de camundongos *Swiss* não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* durante a 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas.** Os macrófagos dos camundongos não infectados e animais infectados foram cultivados em presença de exoantígeno (ExoAg), extrato lipídico (EL), LPS e meio RPMI-1640-C. Cada animal estudado foi avaliado em triplicata no momento de execução do teste. As concentrações de nitrito foram obtidas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) e os resultados expressos em μmols de nitrito/5x10<sup>6</sup> células, como média ± desvio padrão de 5 experimentos independentes por semana de infecção (\*\*\*p<0,001 em relação ao RPMI-C na mesma semana de infecção).

#### **5.4 Determinação da atividade da enzima arginase**

A determinação da atividade da arginase foi realizada em lisado de PECs obtidas de camundongos *Swiss* infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii*, em presença dos antígenos fúngicos (ExoAg e EL), LPS (controle positivo) ou meio RPMI-1640-C (controle negativo).

A atividade da arginase em lisado de PECs nos grupos de animais não infectados mostrou que não houve diferença estatística significativa mediante os estímulos testados e o controle negativo durante todo período experimental (Figura 8A).

Nos grupos de animais infectados foi observada a atividade da enzima arginase estatisticamente significativa mediante o desafio com o ExoAg na 4<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semana ( $p < 0,001$ ) quando comparadas aos seus controles negativos. Em relação ao EL a atividade foi estatisticamente significativa na 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> ( $p < 0,001$ ) e 8<sup>a</sup> ( $p < 0,01$ ) semana (Figura 8B). Ambos os estímulos apresentaram pico de atividade enzimática na 6<sup>a</sup> semana de infecção.



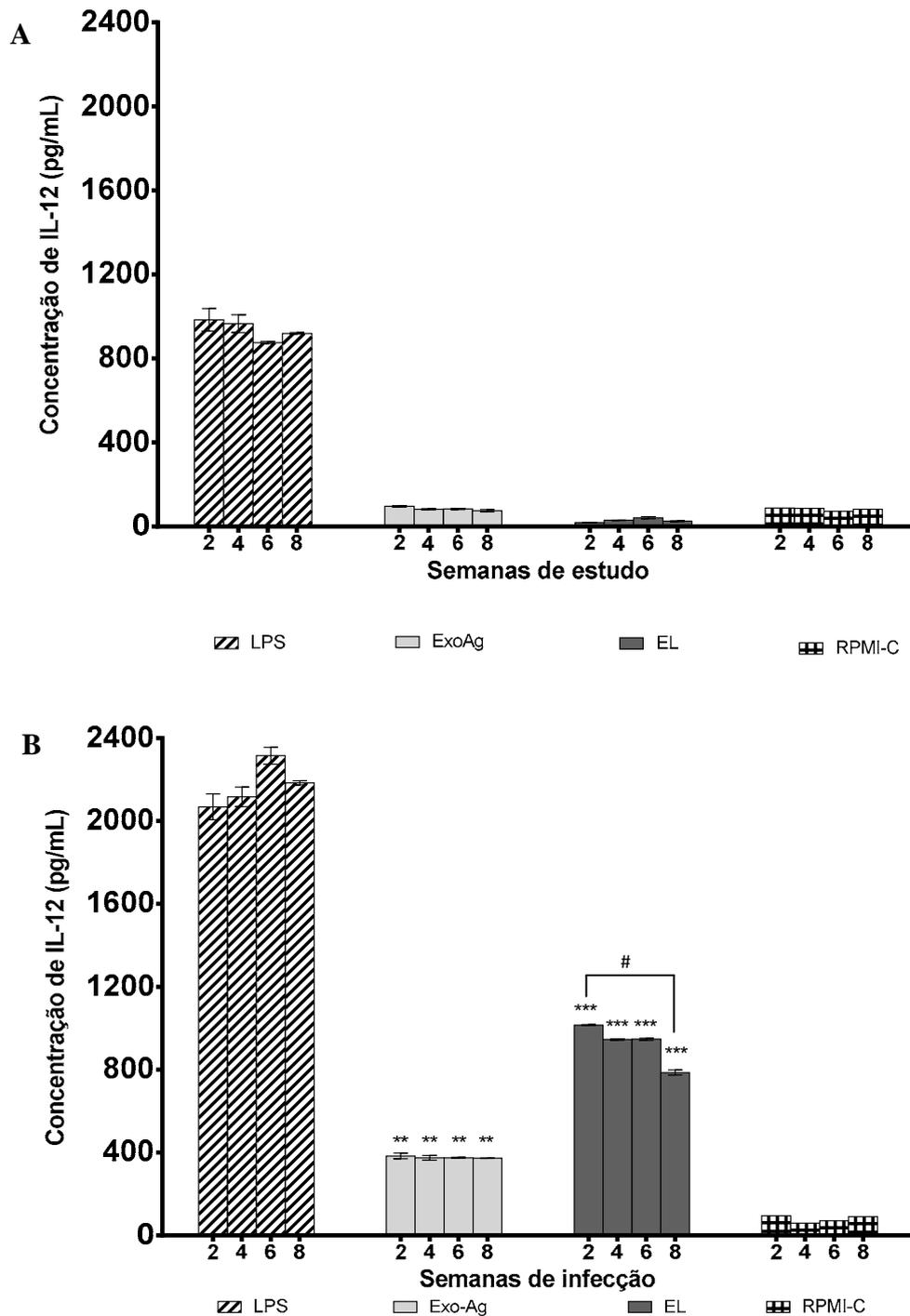
**Figura 8. Atividade da enzima arginase em cultura de PECs de camundongos Swiss não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* durante a 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas.** Os macrófagos dos animais infectados e não infectados foram incubados por 24 hrs a 37°C em presença de exoantígeno (ExoAg), extrato lipídico (EL), LPS e meio RPMI-1640C. A atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 µmol de uréia por minuto. Os resultados foram expressos como a média ± desvio-padrão de mU de atividade enzimática de duplicatas de 5 experimentos independentes por semana de infecção (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 em relação ao RPMI-C na mesma semana de infecção).

## 5.5 Determinação da produção de IL-12

A determinação da produção de IL-12 foi realizada em sobrenadantes de culturas de células do exsudato peritoneal (PECs) de camundongos infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii*, mediante o desafio com os antígenos fúngicos: ExoAg e EL, e os controles: LPS (controle positivo) ou meio RPMI-1640-C (controle negativo). Os resultados obtidos nas diferentes semanas de infecção foram calculados por meio de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IL-12, como média  $\pm$  desvio padrão de cinco animais por semana estudada.

A produção de IL-12 pelas PECs no grupo de animais não infectados não foi estatisticamente significativa quando desafiadas com os antígenos fúngicos (Figura 9A). No grupo de animais infectados com o fungo *S. schenckii* foi observado que produção de IL-12 mediante o desafio com o ExoAg manteve-se estável durante toda a cinética, sendo estatisticamente significativa quando comparada aos controles negativos na mesma semana de infecção ( $p < 0,01$ ). A produção mediante o desafio com EL também ocorreu durante toda a cinética mantendo-se estatisticamente significativa quando comparada aos controles negativos nas mesmas semanas de infecção ( $p < 0,001$ ), sendo possível observar uma diminuição no decorrer das semanas analisadas (Figura 9B).

Ao compararem-se as semanas mediante o desafio com EL a diminuição da produção de IL-12 foi estatisticamente significativa entre a 2ª semana e a 8ª semana de infecção.



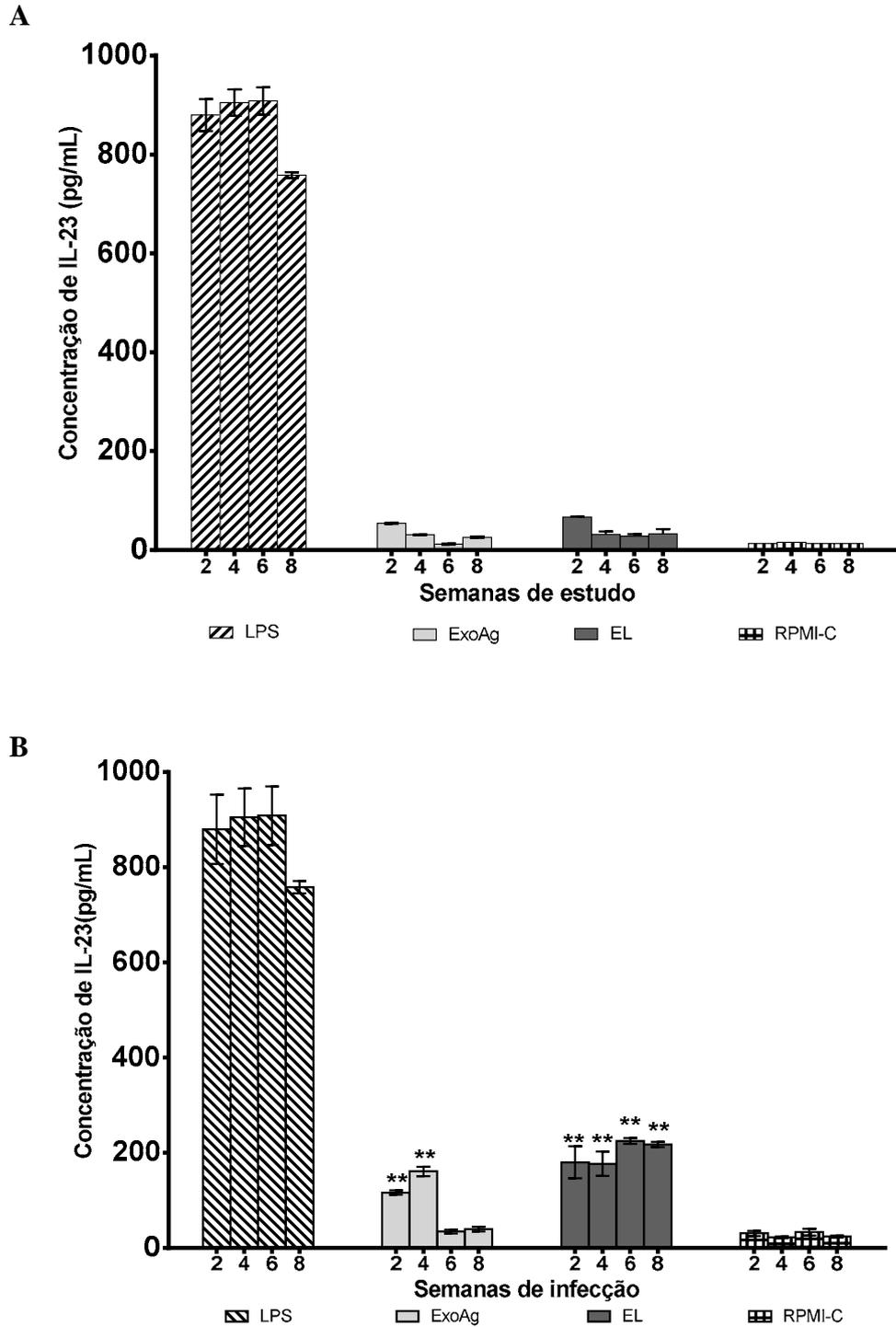
**Figura 9.** Concentração de IL-12 liberada em cultura de PECs tratadas com tioglicolato de sódio 3% de camundongos *Swiss* não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* durante a 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas. Os macrófagos dos animais infectados e não infectados foram cultivados em presença de exoantígeno (ExoAg), extrato lipídico (EL), LPS e somente meio RPMI-1640C. Cada animal estudado foi avaliado em triplicata no momento de execução do teste. As concentrações de IL-12 foram calculadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IL-12. Os resultados foram expressos em pg/mL, como média  $\pm$  desvio padrão de 5 experimentos independentes por semana de infecção (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao RPMI-C na mesma semana de infecção, #  $p < 0,01$  comparando se a 2<sup>a</sup> semana de infecção a 8<sup>a</sup> semana).

## 5.6 Determinação da produção de IL-23

A determinação da produção de IL-23 foi realizada em sobrenadantes de culturas de células aderentes do exsudato peritoneal (PECs) de camundongos infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii*, mediante o desafio com os antígenos fúngicos: ExoAg e EL, e os controles: LPS (controle positivo) ou meio RPMI-1640-C (controle negativo). Os resultados obtidos nas diferentes semanas de infecção foram calculados por meio de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IL-23, como média  $\pm$  desvio padrão de cinco animais por semana estudada.

A produção de IL-23 nas PECs nos grupos de animais não infectados não apresentou diferença estatística significativa quando desafiadas com os antígenos fúngicos durante todo o período experimental (Figura 10A).

Nos grupos de animais infectados com o fungo *S. schenckii* foi observado que houve produção de IL-23 por PECs aderentes estatisticamente significativas nas 2<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semanas quando desafiadas com o ExoAg ( $p < 0,01$ ), enquanto que mediante o desafio com o EL a produção foi estatisticamente significativa durante todo o período experimental ( $p < 0,01$ ), ambos comparados aos seus respectivos controles negativos (Figura 10B).



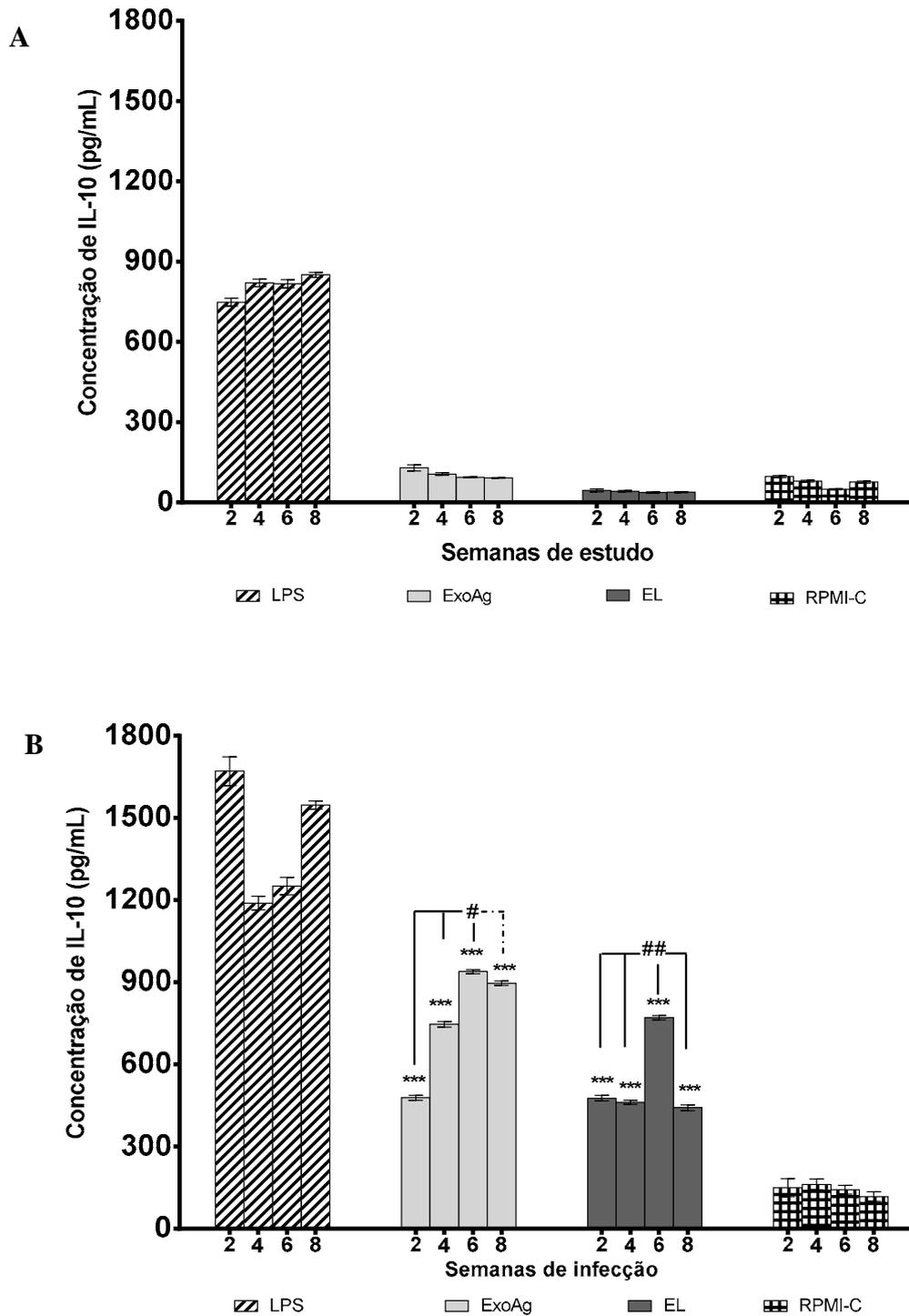
**Figura 10.** Concentração de IL-23 liberada em cultura de PECs tratadas com tioglicolato de sódio 3% de camundongos *Swiss* não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* durante a 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas. Os macrófagos dos animais infectados e não infectados foram cultivados em presença de exoantígeno (ExoAg), extrato lipídico (EL), LPS e meio RPMI-1640C. Cada animal estudado foi avaliado em triplicata no momento de execução do teste. As concentrações de IL-23 foram calculadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IL-23. Os resultados foram expressos em pg/mL, como média  $\pm$  desvio padrão de 5 experimentos independentes por semana de infecção (\*\* $p < 0,01$  em relação ao RPMI-C na mesma semana de infecção).

## 5.7 Determinação da produção de IL-10

A determinação da produção de IL-10 foi realizada em sobrenadantes de culturas de células do exsudato peritoneal (PECs) de camundongos infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii*, mediante o desafio com os antígenos fúngicos: ExoAg e EL, e os controles: LPS (controle positivo) ou meio RPMI-1640-C (controle negativo). Os resultados obtidos nas diferentes semanas de infecção foram calculados por meio de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IL-10, como média  $\pm$  desvio padrão de cinco animais por semana estudada.

A produção de IL-10 no sobrenadante de PECs de animais não infectados não foi estatisticamente significativa durante todo o período experimental quando desafiadas com os antígenos fúngicos (Figura 11A). Em relação ao grupo de animais infectados, a produção de IL-10 foi estatisticamente significativa pelas PECs aderentes quando desafiadas com os antígenos - ExoAg e EL - em comparação aos seus respectivos controle negativo ( $p < 0,001$ ) (Figura 11B).

No grupo infectado a produção de IL-10 mediante o ExoAg foi estatisticamente significante na 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semana quando comparadas a 2<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> ( $p < 0,001$ ) semana. Mediante o EL a 6<sup>a</sup> semana foi estatisticamente significante em relação às demais semanas da cinética ( $p < 0,001$ ).



**Figura 11. Concentração de IL-10 liberada em cultura de PECs de camundongos *Swiss* não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* durante a 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas.** Os macrófagos dos animais infectados e não infectados foram cultivados em presença de exoantígeno (ExoAg), extrato lipídico (EL), LPS e meio RPMI-1640C. Cada animal estudado foi avaliado em triplicata no momento de execução do teste. As concentrações de IL-10 foram calculadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IL-10. Os resultados foram expressos em pg/mL, como média  $\pm$  desvio padrão de 5 experimentos independentes por semana de infecção (\*\*\*)  $p < 0,001$  em relação ao RPMI-C na mesma semana de infecção; #  $p < 0,001$  comparando-se a sexta e oitava semana do ExoAg com a segunda e quarta semana; ## comparando-se a sexta semana do EL com as demais semanas da cinética).

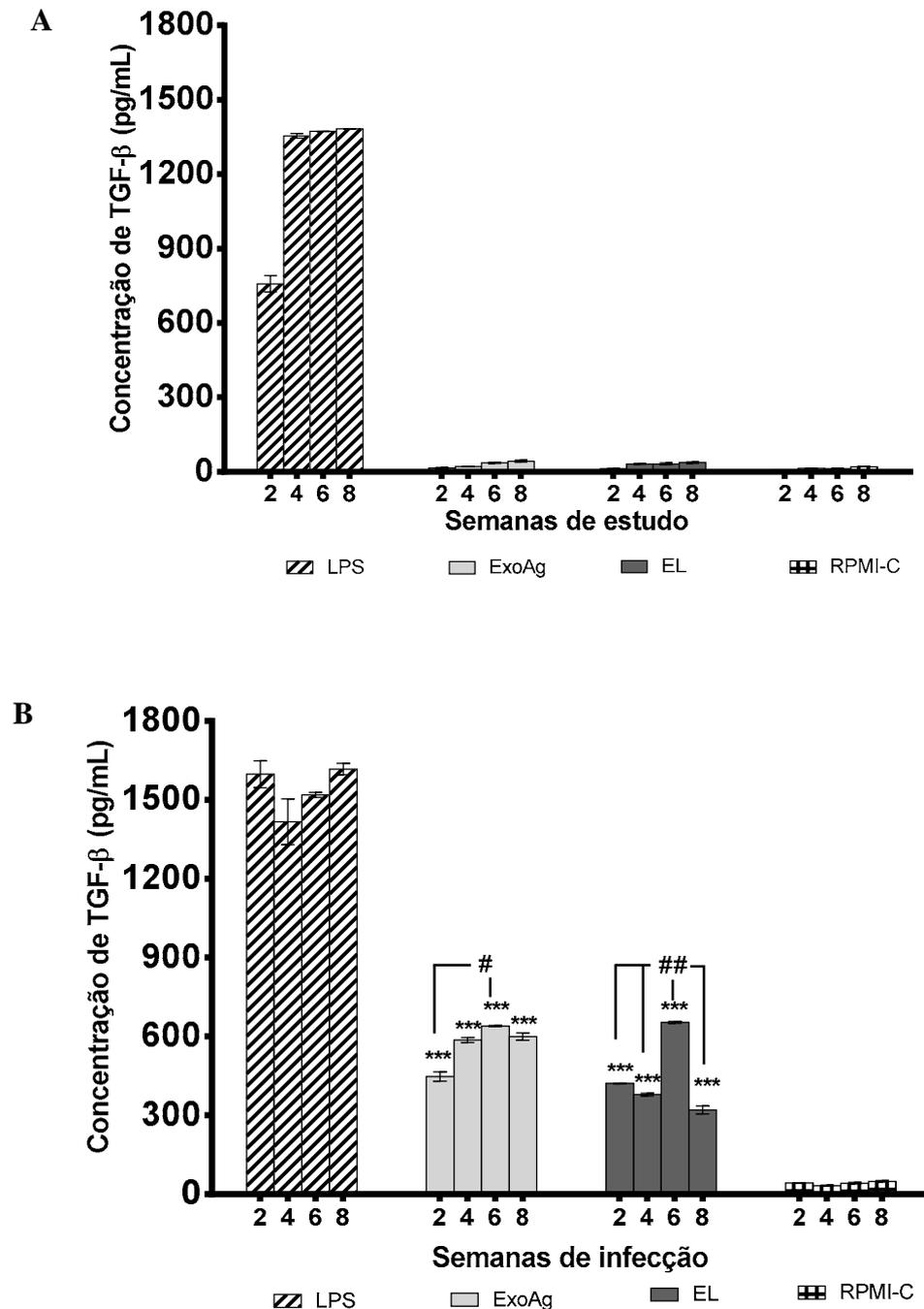
## 5.8 Determinação da produção de TGF- $\beta$

A determinação da produção de TGF- $\beta$  foi realizada em sobrenadantes de culturas de células aderentes do exsudato peritoneal (PECs) de camundongos infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii*, mediante o desafio com os antígenos fúngicos: ExoAg e EL, e os controles: LPS (controle positivo) ou meio RPMI-1640-C (controle negativo). Os resultados obtidos nas diferentes semanas de infecção foram calculados através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de TGF- $\beta$ , como média  $\pm$  desvio padrão de cinco animais por semana estudada.

Nos grupos de animais não infectados as PECs quando desafiadas com os antígenos fúngicos não foram capazes de levar a produção de TGF- $\beta$  em níveis significativos durante todo o período experimental (Figura 12A).

Nos grupos de animais infectados com o fungo *S. schenckii* foi observado que houve produção de TGF- $\beta$  estatisticamente significativa pelas PECs quando desafiadas com os antígenos fúngicos (ExoAg e EL) comparados aos controles negativos da mesma semana ( $p < 0,001$ ) durante todo o período experimental (Figura 12B).

Nos grupos infectados os antígenos levaram a um perfil de TGF- $\beta$  semelhante ao da IL-10, ou seja, picos na 6<sup>a</sup> semana de infecção, sendo estes estatisticamente significantes para o ExoAg quando comparada a 6<sup>a</sup> semana a 2<sup>a</sup> semana ( $p < 0,001$ ) e frente ao EL quando comparada a 6<sup>a</sup> semana ( $p < 0,001$ ) as demais semanas da cinética.



**Figura 12.** Concentração de TGF- $\beta$  liberado em cultura de PECs tratadas com tioglicolato de sódio 3% de camundongos *Swiss* não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* durante a 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas. Os macrófagos dos animais infectados e não infectados foram cultivados em presença de exoantígeno (ExoAg), extrato lipídico (EL), LPS e meio RPMI-1640C. Cada animal estudado foi avaliado em triplicata no momento de execução do teste. As concentrações de TGF- $\beta$  foram calculadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de TGF- $\beta$ . Os resultados foram expressos em pg/mL, como média  $\pm$  desvio padrão de 5 experimentos independentes por semana de infecção (\*\* $p < 0,001$  em relação ao RPMI-C na mesma semana de infecção; #  $p < 0,001$  comparando-se a sexta semana do ExoAg com a segunda semana; ## comparando-se a sexta semana do EL com as demais semanas).

## 6 Discussão

A incidência de doenças infecciosas causadas por fungos continua alarmante devido à ampla utilização de terapias imunossupressoras (SAMONIS e BAFALOUKOS, 1992; ISHII e KAWAKAMI, 2012) e o problema da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (DENNING et al., 1991a; 1991b; JOHNSON, 2012), sendo observado um número crescente de fungos oportunistas envolvidos nas doenças que acometem pacientes imunocomprometidos. Dentre estes patógenos encontra-se o fungo *Sporothrix schenckii* (SCHECHTMAN, 2010; RODRÍGUEZ-CERDEIRA et al., 2012) tornando-se importante o conhecimento sobre os mecanismos imunológicos envolvidos no controle da doença causada por este fungo para que futuramente estes auxiliem na elaboração de novas estratégias de tratamento, imunização e/ou diagnóstico.

A literatura tem demonstrado a existência de populações distintas de macrófagos que respondem a diferentes padrões de ativação, denominados macrófagos M1 e M2, os quais expressam metabólitos distintos, os primeiros são responsáveis por uma resposta de perfil pró-inflamatório levando em geral a produção de níveis elevados de IL-12 e baixos níveis de IL-10, além de outras citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, participando desta forma como indutores e efetores de resposta imune Th1 (MOSSER, 2003). Estas células apresentam ainda atividades citotóxicas, resultado de sua capacidade de secretar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Já os macrófagos M2 produzem moléculas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- $\beta$ , induzindo desta forma uma resposta imune Th2 (MANTOVANI et al., 2004; BENOIT et al., 2008).

Em relação as doenças fúngicas existem poucos relatos da participação destas populações, desta forma o presente estudo teve por objetivo fenotipar e avaliar os mediadores imunológicos associados a presença dos macrófagos M1 e M2 em células do exsudato peritoneal durante o processo infeccioso causado pelo fungo *S. schenckii*.

Ao avaliar-se a viabilidade celular foi observado que no grupo de animais infectados após estímulo *ex vivo* com ExoAg e EL houve diminuição estatisticamente significativa quando comparados aos animais não infectados na mesma semana de infecção, este fato pode estar relacionado a morte dos macrófagos por apoptose uma vez que já foram ativados *in vivo* na presença do fungo. Mesmo havendo uma diminuição da viabilidade celular estas se mantiveram acima de 80% tornando possível a realização dos ensaios imunológicos.

Os receptores F4/80 e CD11b foram considerados excelentes marcadores de superfície para as populações de macrófagos (ZHANG et al., 2010), desta forma foram utilizados neste trabalho para analisar o *gate* de macrófagos nas PECs onde considerou-se a população duplo positiva. Em seguida, o mesmo *gate* foi utilizado para a análise dos receptores de superfície utilizados na fenotipagem das populações M1 e M2 (BENOIT et al., 2008; OLIVER et al., 2011).

Os resultados da fenotipagem revelaram que houve aumento significativo de células F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> nos grupos de animais infectados quando comparados aos grupos de animais não infectados, sendo observado um aumento destas populações principalmente na 4<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semana de infecção. Os dados sugerem que aumento do número de células expressando estes receptores nos animais infectados possa estar relacionado ao estímulo *in vivo* com o fungo, sendo que apenas as células provenientes destes animais foram capazes de responder aos estímulos fúngicos *ex vivo* mediante os antígenos analisados (ExoAg e EL).

A partir do *gate* de macrófagos (F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) a análise dos marcadores para as subpopulações demonstrou a presença de células expressando os receptores CD197 e CD121b nas 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semanas de infecção caracterizando a presença de macrófagos M1. A presença do receptor CD197 foi correlacionado a produção de IL-23 pela via da PI3 quinase e pela via do NF-κB em células dendríticas (KUAWABARA et al., 2012), no entanto no presente estudo a fenotipagem demonstrou que as células expressando este receptor foram significativas somente na 2<sup>a</sup> semana enquanto a produção de IL-23 foi significativa na 2<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semana mediante o ExoAg e em todas as semanas frente o EL. Os resultados do presente trabalho parecem indicar outra via de ativação para os macrófagos quanto a produção da IL-23.

Em relação aos receptores CD23 e CD206, o primeiro esteve elevado na 2<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semana enquanto o segundo foi aumentando no decorrer da cinética ambos demonstrando a presença dos macrófagos M2.

Na literatura foi observado que a indução da infecção em macrófagos derivados de monócitos pelo *Mycobacterium avium* levava ao aumento da expressão do CD23, sendo este correlacionado a atividade microbicida dos macrófagos através da produção de TNF-α sem alteração da produção de NO (MOSSALAYI et al., 2009), mesmo sendo um receptor presente em macrófagos M2. No presente estudo também se observou a produção de NO coincidindo com a expressão significativa do receptor CD23.

Por outro lado, o receptor CD206 parece estar envolvido na fagocitose sendo capaz de reconhecer moléculas glicosiladas principalmente com resíduos de manose e fucose e internaliza-las, mas para que seja efetivada a resposta imunológica parece ser necessária a participação de outros receptores como os TLRs (GAZI e MARTINEZ-POMARES, 2009). Na resposta anti-inflamatória este receptor pode estar envolvido na fagocitose dos debrís celulares na tentativa de resolver o processo inflamatório (BHATIA et al., 2011).

Os TLRs foram estudados por Sassá e colaboradores (2012) em modelo de esporotricose murina, onde observaram que macrófagos provenientes de camundongos deficientes para o receptor TLR-4 (toll like receptor) em comparação aos animais normais apresentavam níveis aumentados de TGF- $\beta$  mediante o desafio com o extrato lipídico obtido do fungo *S. schenckii*. Outro estudo observou que camundongos knockout para TLR-2 apresentavam porcentagens menores de fagocitose em contato com antígeno solúvel e o extrato lipídico do *S. schenckii* quando comparados aos camundongos selvagens (NEGRINI et al., 2013), demonstrando a importância da participação destes receptores no reconhecimento dos antígenos fúngicos.

No presente estudo ao ser analisada a produção dos mediadores imunológicos no grupo de animais infectados observou-se que o NO (Figura 7B) foi produzido durante todo período experimental mediante o desafio com ExoAg e durante as 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> mediante o estímulo com EL. Em relação a enzima arginase no mesmo grupo foi observada sua atividade mediante o desafio com o ExoAg nas 2<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semanas de infecção e quando desafiadas com EL nas 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas de infecção (Figura 8B).

De acordo com a literatura a produção ou atuação destes mediadores está relacionada a presença dos macrófagos M1 e M2, sendo que ambos utilizam o mesmo substrato (L-arginina) para realizarem sua atividade funcional. Os M1 metabolizam a arginina através da via da enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS) levando a produção de altos níveis de NO e citrulina, sendo o primeiro conhecido por exercer atividades microbicidas, enquanto os M2 atuam através da enzima arginase levando a geração de ornitina e uréia apresentando como produto final o colágeno e a proliferação celular dos fibroblastos (MOSSER et al., 2003; BRONTE e ZANOVELLO, 2005). Dessa forma, as enzimas iNOS e arginase podem competir entre si pelo mesmo substrato (MORI e GOTOH, 2004).

Buga e colaboradores (1996) demonstraram que o LPS era capaz de induzir a formação tanto de iNOS quanto da arginase e a ativação dessas enzimas estavam associadas ao aumento dos seus produtos: NO, citrulina e uréia. No modelo experimental da esporotricose foi observada a ativação das duas vias de degradação da arginina na 4ª e 6ª semana de infecção mediante os desafios fungicos avaliados, o que pode explicar a presença da população M1 e M2 observada na fenotipagem (Tabela 3). Tais resultados sugerem que a arginase esteja competindo com a iNOS pela arginina na tentativa de evitar a toxicidade que poderia ser causada pela superprodução de NO, além de exercer o seu papel no processo de reparação após uma agressão tecidual como demonstrado na literatura (PESCE et al., 2009; BHATIA e tal., 2011).

O papel da arginase em exercer um *feedback* negativo na atividade da iNOS vem sendo demonstrado na literatura. Em 2006 Freire-de-Lima e colaboradores observaram que ocorria a inibição da expressão da enzima iNOS e a estimulação da atividade da arginase em cultura de macrófagos quando expostas às células mortas (Jurkat T) por radiação prevenindo a formação do NO reativo.

A presença da arginase em macrófagos também tem sido associada a fagocitose dos debrís celulares durante a resolução do processo inflamatório, no entanto ainda não se sabe se estes debrís podem estar envolvidos na polarização dos macrófagos M2 (ARIEL e SERHAN, 2012). Em relação aos estudos realizados com fungos foi observado que na fase inicial da infecção causada por *Aspergillus fumigatus* os macrófagos alveolares apresentavam atividade da enzima arginase com aumento na expressão dos receptores CD206 e Ym1, sugerindo a presença dos macrófagos M2 e o possível papel protetor contra este fungo (BHATIA et al., 2011). Como mencionado no presente estudo observou-se um aumento da atividade da enzima arginase perante os desafios com o ExoAg e o EL nas semanas tardias da infecção (6ª e 8ª semanas), o que condiz com a presença do marcador CD23 e CD206.

Estudos anteriores realizados por Maia e colaboradores (2006) avaliaram o perfil de diferenciação de linfócitos T durante a esporotricose por meio da determinação de citocinas e de NO em culturas de macrófagos, sendo observado níveis elevados de NO mediante desafio com o ExoAg entre a 4ª e 7ª semana, perfil correspondente ao observado neste estudo (4ª e 6ª semana, Figura 7) mediante o mesmo desafio.

Em relação à produção de citocinas durante todo o período experimental foi observado que as PECs dos grupos infectados foram capazes de produzir IL-12

mediante o estímulo com ExoAg e EL (Figura 9B) mantendo os níveis estáveis deste mediador durante todo período experimental frente o ExoAg e diminuindo a produção frente o EL. Enquanto que a liberação da IL-23 foi significativa na 2ª e 4ª semana mediante desafio com o ExoAg e durante todo o período experimental quando desafiadas com o EL (Figura 10B). As diferenças nos perfis de produção destes mediadores pode estar relacionada à composição dos antígenos estudados, sendo o ExoAg composto por proteínas e o outro estímulo extrato bruto de lipídios.

Os resultados da produção de IL-12 vem de encontro ao estudo realizado anteriormente em nosso laboratório mediante o desafio com ExoAg onde houve a produção de IL-12 durante todo o período experimental com picos entre a 4ª e 6ª semanas de infecção (MAIA et al., 2006).

Os resultados observados no presente estudo em relação a produção de NO, IL-12 e IL-23, juntamente com os dados obtidos na fenotipagem demonstraram haver a participação da população M1 principalmente nas 2ª, 4ª e 6ª semanas de infecção, sugerindo uma potencialização da resposta inflamatória contra o fungo *S. schenckii*.

O papel da IL-12 na eliminação de fungos já vem sendo demonstrado na literatura. Camundongos IL-12p40<sup>-/-</sup> infectados com *Paracoccidioides brasiliensis* não foram capazes de liberar o NO necessário para a eliminação do conídio favorecendo dessa forma a infecção (LIVONESI et al., 2008). Zhang e colaboradores (2012) verificaram que a IL-12 e a IL-2 podem aumentar a expressão de IFN- $\gamma$  no tecido pulmonar durante a infecção por *Aspergillus fumigatus* levando a redução do número de colônias do órgão e aumento da sobrevivência do animal.

Ruan e colaboradores (2008) também verificaram que a presença de IL-12 na infecção pelo patógeno *Pneumocystis carinii* era responsável por maior recrutamento de células inflamatórias para o pulmão e aumento da concentração tecidual de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$ ).

A participação da IL-23 em resposta a fungos tem sido associada ao padrão de ativação de resposta Th17, onde foi observado que camundongos knockout para TLR2, *in vivo*, apresentaram diminuição da produção de IL-10 e IL-12 e aumento de IL-23 e IL-17 quando infectados com o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (LOURES et al., 2011). Esta via (Th17) encontra-se em processo de estudo no modelo experimental da esporotricose em nosso laboratório. Em 2012, Verdán e colaboradores analisando células dendríticas mediante estímulo com ExoAg observaram a produção de IL-6 e o

aumento significativo de TGF- $\beta$  juntamente com a produção de IL-23 demonstrando a plasticidade das células dendríticas mediante os antígeno.

Em relação aos macrófagos M2 estes podem ser subdivididos em M2a, M2b e M2c, sendo as populações M2a e M2c as principais responsáveis pela imunoregulação através da produção de IL-10 e TGF- $\beta$  que atuam sob os próprios macrófagos e as células T (LI et al., 2006; COUPER et al., 2008).

Os resultados obtidos nos grupos infectados demonstraram que as PECS foram capazes de responder aos antígenos fúngicos (ExoAg e EL) *ex vivo* levando a produção tanto de IL-10 (Figura 11B) quanto de TGF- $\beta$  (Figura 12B) durante todo o período experimental, sendo o perfil de produção destes mediadores semelhante com picos na 6<sup>a</sup> semana. Estes resultados mais uma vez condizem com os dados obtidos na fenotipagem que demonstraram aumento de células expressando marcadores para a população M2 nas últimas semanas da cinética (Figura 6B; Tabela 2).

O receptor CD23 foi um dos receptores utilizados para fenotipagem da população M2. Em relação a sua participação há relato no modelo para paracoccidiodomicose, onde foi observada a baixa produção de NO e níveis aumentados de TGF- $\beta$  na presença da fração  $\beta$ -glucana provenientes deste fungo, sendo os níveis de produção destes mediadores associados a presença de macrófagos CD11b<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup> (DE PÁDUA-QUEIROZ et al., 2010). No presente estudo os antígenos utilizados responderam produzindo tanto NO quanto TGF- $\beta$  durante a 6<sup>a</sup> semana, assim como foi observada a presença de células expressando o receptor CD23, as vias que levaram a produção de ambos mediadores frente os estímulos analisados serão alvos para estudos posteriores.

Monócitos estimulados com LPS na presença de neutrófilos apoptóticos apresentaram um efeito supressor com acentuada produção de TGF- $\beta$  e IL-10 e mesmo após estímulos exógenos com IFN- $\gamma$  as células não foram capazes de voltar a produzir mediadores pro-inflamatórios (BYRNE e REEN, 2002), demonstrando a participação destes mediadores no controle da inflamação.

A presença das populações M1 e M2 foi descrita por Pena e colaboradores (2011) após um estímulo com LPS em células mononucleares obtidas a partir de sangue periférico, inicialmente as células estimuladas levaram produção de mediadores envolvidos com a população M1, no entanto ao induzirem um estado de tolerância ao LPS foi verificada a presença de mediadores envolvidos com os macrófagos M2, os quais foram associados ao controle da inflamação.

No presente estudo os níveis aumentados de TGF- $\beta$ , IL-10 e arginase induzidos pelos antígenos fúngicos nos animais infectados podem funcionar como um mecanismo regulador da resposta inflamatória uma vez que já se conhece a resolução da infecção no modelo estudado (MAIA et al., 2006) e esta resolução está associada a presença da população M2 conhecida por participar no processo de deposição da matriz e remodelamento tecidual (MANTOVANI et al., 2004). De acordo com Mantovani e colaboradores (2009), o paradigma da polarização M1/M2 deve ser visto de acordo com a plasticidade e flexibilidade dos fagócitos mononucleares espelhando-se no paradigma Th1/Th2 e seus produtos de ativação. Os autores ainda concluem que de fato os diferentes sinais gerados na resposta imunológica dão origem a uma variedade de perfis de macrófagos ativados corroborando com os resultados observados neste modelo.

Na verdade, o papel dos macrófagos polarizados ainda permanece incerto tanto em modelos de infecções fúngicas quanto em outras infecções. A presença da população M2 nas semanas finais de infecção como demonstrada nesse estudo vem de encontro a outros trabalhos realizados no laboratório, onde se verificou uma diminuição de fungos nos órgãos dos animais infectados, com concomitante queda na produção de IL-1 e TNF- $\alpha$  (CARLOS et al., 1994; CARLOS et al., 2009) e aumento de IL-4, como sinalizador de uma resposta anti-inflamatória (MAIA, et al., 2006).

## 7 Conclusões

- A fenotipagem das células do exsudato peritoneal revelou que no grupo de camundongos infectados houve um aumento de células expressando CD11b<sup>+</sup> e F4/80<sup>+</sup> em relação ao grupo não infectado, o que indica que em contato com o fungo houve um aumento de macrófagos expressando estes receptores.

- Houve aumento de células expressando os marcadores para as subpopulações tanto M1 quanto M2 durante as 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semanas de infecção, e predomínio na 8<sup>a</sup> semana na expressão do marcador CD206 (M2) o que revela a participação de ambas às populações no modelo utilizado.

- Quanto à atividade funcional os estímulos *ex vivo* com exoantígeno e extrato lipídico induziram a produção de mediadores proinflamatórios (NO, IL-12 e IL- 23) e anti-inflamatórios (IL-10, TGF-β e atividade da enzima arginase), o que corrobora com os dados encontrados na fenotipagem.

- A presença dos macrófagos M2 encontrados durante o processo infeccioso pode estar relacionada ao processo de resolução da inflamação desde o início da doença, sendo este mais evidente no período tardio da infecção, impedindo principalmente que o excesso de mediadores inflamatórios provoque destruição tecidual.

## 8 Referencias bibliográficas

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, J.S. **Imunologia celular & molecular**. 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Revinter 2008. 574p.

ALBUQUERQUE, P.C.; CORDERO, R.J.; FONSECA, F.L.; PERES DA SILVA, R.; RAMOS, C.L.; MIRANDA, K.R.; CASADEVALL, A.; PUCCIA, R.; NOSANCHUK, J.D.; NIMRICHTER, L.; GUIMARAES, A.J.; RODRIGUES, M.L. A *Paracoccidioides brasiliensis* glycan shares serologic and functional properties with cryptococcal glucuronoxylomannan. *Fungal Genet Biol.*, n.49; v.11, p.943-54, 2012.

ALMEIDA-PAES, R.; FRASES, S.; MONTEIRO, P.C.F.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; NOSANCHUK, J.D. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. *Microbes Infect.*, v.11, n.5, p.554-62, 2009.

ARIEL, A.; SERHAN, C.N. New lives given by cell death: macrophage differentiation following their encounter with apoptotic leukocytes during the resolution of inflammation. *Front Immunol.*, n.3, artigo 4, 2012.

AGARWAL, S.; GOPAL, K.; KUMAR B. Sporotrichosis in Uttarakhand (India): areport of nine cases. *Intern J Dermatol.*, n.47, p.367-71, 2008.

AGGARWAL, S.; GHILARDI, N.; XIE, M.H.; DE SAUVAGE, F.J.; GURNEY, A.L. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem.*,n.278, v.3, p.1910-4, 2003.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, n.124, v.4, p.783-801, 2006.

ALVES, S.H.; BOETTCHER, C.S.; OLIVEIRA, D.C.; TRONCO-ALVES, G.R.; SGARIA, M.A.; THADEU, P.; OLIVEIRA, L.T.; SANTURIO, J.M. *Sporothrix schenckii* associated with armadillo hunting in Southern Brazil: epidemiological and antifungal susceptibility profiles. *Rev Soc Bras Med Trop*,v.43; n.5; p.523-5, 2010.

ALVIANO, C.S.; TRAVASSOS, L.R.; SCHAUER, R. Sialic acids in fungi: a minireview. *Glycoconj. J.*, v.16, n.9, p.545-54, 1999.

BARROS, M.B.L; SCHUBACH, A.O.; GALHARDO, M.C.; SCHUBACH, T.M.P.; REIS, R.S.; CONCEIÇÃO, M.J.; VALLE, A.C. Sporotrichosis with widespread cutaneous lesions-a report of 24 cases related to transmission by domestic cats in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Dermatol.*, n.42, p.677-81, 2003.

BARROS, M.B.L; PAES, R.A.; SCHUBACH, A.O. *Sporothrix schenckii* and sporothichosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, n.24, v.4, p.633-54, 2011.

BELKNAP, BS. Sporotrichosis. *Dermatol Clinics.*, n.7; v.2; p.193-202, 1989.

BENOIT, M.; DESNUES, B.; MEGE, J.L. Macrophage polarization in bacterial infections. *J. Immunol.*, v.181, p.3733–9, 2008.

BHATIA, S.; FEI, M.; YARLAGADDA, M.; QI, Z.; AKIRA, S.; SAIJO, S.; IWAKURA, Y.; ROOIJEN, N.; GIBSON, G.A.; ST. CROIX, C.M.; RAY, A.; RAY, P. Rapid Host Defense against *Aspergillus fumigatus* involves alveolar macrophages with a predominance of alternatively activated phenotype. *PLoS One.*, v.6; n.1; p.e15943, 2011.

BLEHARSKI, J.R.; LI, H.; MEINKEN, C.; GRAEBER, T.G.; OCHOA, M.T.; YAMAMURA, M.; BURDICK, A.; SARNO, N.; WAGNER, M.; ROLLINGHOFF, M. et al. Use of genetic profiling in leprosy to discriminate clinical forms of the disease. *Science*, v.301, p.1527–30, 2003.

BLOBE, G.C.; SCHIEMANN, W.P.; LODISH, H.F. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med.*, v.342, n.18, p.1350-8, 2000.

BRONTE, V.; ZANOVELLO, P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nature Rev Immunol.*, v.5, p.641-54, 2005.

BUGA, G.M.; SINGH, R.; PERVIN, S.; ROGERS, N.E.; SCHMITZ, D.A.; JENKINSON, C.P.; CEDERBAUM, S.D.; IGNARRO, L.J. Arginase activity in endothelial cells: inhibition by NG-hydroxy-L-arginine during high-output NO production. *Am J Physiol.*, n.271, p.H1988-98, 1996.

BYRNE, A.; ANDREEN, D.J. Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. *J. Immunol.*, v.168, p.1968-77, 2002.

CARLOS, I.Z., SGARBI, D.B.G., PLACERES, M.C.P. Host organism defense by a peptidepolysaccharide extracted from the fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*, 144: 9-14, 1999.

CARLOS, I.Z.; SASSA, M.F.; SGARBI, D.B.G.; PLACERES, M.C.P.; MAIA, D.C.G. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. *Mycopathologia*, v.168, n.1; p.1-10, 2009.

CARLOS, I.Z.; SGARBI, D.B.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C.S.; SILVA, C.L. Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the systemic form of the disease. *Mycopathologia*, v.117, n.3; p.139-44, 1992.

CARLOS, I.Z.; SGARBI, D.B.G.; SANTOS, G.C.; PLACERES, M.C.P. *Sporothrix schenckii* lipid inhibits macrophage phagocytosis, involvement of nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Scandinavian J. Immunol.*, n.57, p.214-20, 2003.

CARLOS, I.Z.; ZINI, M.M.; SGARBI, D.B.G.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C.S.; SILVA, C.L. Disturbances in the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor in disseminated murine sporotrichosis. *Mycopathologia*, v.127, p.189-94, 1994.

COSTA, R.O.; BERNARDES-ENGEMANN, A.R.; AZULAY-ABULAFIA, L.; BENVENUTO, F.; NEVES M.L.; LOPES-BEZERRA, L.M. Sporotrichosis in pregnancy: case reports of 5 patients in a zoonotic epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *An Bras Dermatol.*, v.86, n.5, p. 995-8, 2011.

CASTILLO, M.C.; TAPIA, F.J.; ARCINIEGAS, E. Ultrastructural localization of specific surface antigens in the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*. *J. Med. Vet. Mycol.*, v.28, n.1, p.91-4, 1990.

CLEMONS, K.V.; DARBONNE, W.C.; CURNUTTE, J.T.; SOBEL, R.A.; STEVENS, D.A. Experimental histoplasmosis in mice treated with anti-murine interferon-gamma antibody and in interferon-gamma gene knockout mice. *Microbes Infect.*, v.2, n.9, p.997-1001, 2000.

CORRALIZA, I.M.; CAMPO, M.L.; SOLER, G.; MODOLLEL, M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods*, v.174, p. 231-5, 1994.

CARVALHO MT, DE CASTRO AP, BABY C, WERNER B, FILUS NETO J, QUEIROZ-TELLES F. Disseminated cutaneous sporotrichosis in a patient with AIDS: report of a case. *Rev Soc Bras Med Trop.*, v.35; n.6, p.655-9, 2002.

CROXFORD, A.L.; MAIR, F.; BECHER, B. IL-23: one cytokine in control of autoimmunity. *Eur J Immunol.*, v.42, n.9, p.2263-73, 2012.

COUPER, K.N.; BLOUNT, D.G.; RILEY, E.M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J. Immunol.*, v.180, n.9, p. 5771-7, 2008.

DA ROSA, A.C.; SCROFERNEKER, M.L.; VETTORATO, R.; GERVINI, R.L.; VETTORATO, G.; WEBER, A. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. *J Am Acad Dermatol.* v.52, n.3, p. 451-9, 2005.

DE ALBORNOZ, M.B.; MENDOZA, M.; DE TORRES, E.D. Growth temperatures of isolates of *Sporothrix schenckii* from disseminated and fixed cutaneous lesions of sporotrichosis. *Mycopathologia*, v.95, n.2, p.81-3, 1986.

DEEPE, G.S.JR.; GIBBONS, R.S. Protective and memory immunity to *Histoplasma capsulatum* in absence of IL-10. *J. Immunol.*, v.171, p. 5353-62, 2003.

DE ARAÚJO, T.; MARQUES, A.C.; FERDEL, F. Sporotrichosis. *Int. J. Dermatol.*, v.40; n.12, p.737-42, 2001.

DE VISSER, K.E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L.M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer*, v.6, p.24-37, 2006.

DENNING, D.W.; ARMSTRONG, R.W.; LEWIS, B.H.; STEVENS, D.A. Elevated cerebrospinal fluid pressures in patients with cryptococcal meningitis and acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med*, v.91, n.3, p.267-72, 1991 (a).

DENNING, D.W.; FOLLANSBEE, S.E.; SCOLARO, M.; NORRIS, S.; EDELSTEIN, H.; STEVENS, D.A. Pulmonary aspergillosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.*, n.324, v.10, p.654-62, 1991 (b).

DE PÁDUA QUEIROZ, L.Jr.; MATTOS, M.Jr.; DA SILVA M.F.; SILVA, C.L. TGF-beta and CD23 are involved in nitric oxide production by pulmonary macrophages activated by beta-glucan from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Microbiol Immunol.*, v.199, n.1, p.61-9, 2010.

EDWARDS, J.P; XIA ZHANG, X.; FRAUWIRTH, K.A. MOSSER, D.M. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J. Leukoc. Biol.*, v.80, n.6, p.1298–1307, 2006.

ENGLE, J.; DESIR, J.; BERNSTEIN, J.M. A rose by any other name. *Skinmed*, v.6, n.3, p.139-41, 2007.

FERNANDES, K.S.S.; MATHEWS, H.L.; LOPES-BEZERRA, L.M. Differences in virulence of *Sporothrix schenckii* conidia related to culture conditions and cell-wall composition. *J. Med. Microbiol.*, v.48, p.195-203, 1999.

FERNANDES, K.S.S.; COELHO, A.L.J.; BEZERRA, L.M.L.; BARJA-FIDALGO, C. Virulence of *Sporothrix schenckii* conidia and yeast cells, and their susceptibility to nitric oxide. *Immunol.*, v.101, p.563-69, 2000.

FREIRE-DE-LIMA, C.G.; XIAO, Y.Q.; GARDAI, S.J.; BRATTON, D.L.; SCHIEMANN, W.P.; HENSON, P.M. Apoptotic cells, through transforming growth factor-beta, coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages. *J Biol Chem.*, v.281, n.50, p. 38376-84, 2006.

FRESHNEY, R. I. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. New York: Wiley-Liss, 1994. 486p.

GARRISON, R.G.; ARNOLD, W.N. Cytochemical localization of acid phosphatases in the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*. *Curr. Microbiol.*, v.9, p.253–58, 1983.

GAZI, U.; MARTINEZ-POMARES, L. Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiol.*, n.214, p.554-61, 2009.

GONG, D.; SHI, W.; YI, S.; CHEN, H.; GROFFEN, J.; HEISTERKAMP, N. TGFβ signaling plays a critical role in promoting alternative macrophage activation. *BMC Immunology*, v.13, p.31, 2012.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.*, v.3, p.23–35, 2003.

GORDON, S. The macrophage: Past, present and future. *Eur. J. Immunol.*, v.37, p.S9–17, 2007.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, v.126, p.131-8, 1982.

HE, M.; XU, Z.; DING, T.; KUANG, D.; ZHENG, L. MicroRNA-155 regulates inflammatory cytokine production in tumor-associated macrophages via targeting C/EBPbeta. *Cell. Mol. Immunol.*, v.6, p.343-52, 2009.

HAO, N.; LU, M.; FAN, Y.; CAO, Y.; ZHANG, Z.; YANG, S. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Development Immunol.*, 2012, doi:10.1155/2012/948098.

HEKTOEN, L.; PERKINS, C.F. Refractory subcutaneous abscess caused by *Sporothrix schenckii*: a new pathogenic fungus. *J. Exp. Med.*, v.5, p.77-91, 1900.

HOGAN, L.H.; KLEIN, B.S.; LEVITZ, S.M. Virulence factors of medically important fungi. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.9, n.4, p.469-88, 1996.

ISHIZAKI, H.; KAWASAKI, M.; AOKI, M.; MATSUMOTO, T.; PADHYE, A.A.; MENDOZA, M.; NEGRONI, R. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in North and South America. *Mycopathologia*, v.142, n.3, p.115-8, 1998.

ISEKI, S.; OSUMI-YAMASHITA, N.; MIYAZONO, K.; FRANZÉN, P.; ICHIJO, H.; OHTANI, H.; HAYASHI, Y.; ETO, K. Localization of transforming growth factor-beta type I and type II receptors in mouse development. *Exp Cell Res.*, v.219, n.2, p.339-47, 1995.

ISHIZAKI, H.; KAWASAKI, M.; AOKI, M.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K.; GARCIA FERNANDEZ, J.A. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in Costa Rica. *J. Med. Vet. Mycol.*, v.34, n.1, p.71-3, 1996.

ISHII, K.; KAWAKAMI, K. Pattern recognition and host defense response to *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol J.*, v.53, n.4, p.247-54, 2012.

IONTCHEVA, I.; AMAR, S.; ZAWAWI, K.H.; KANTARCI, A.; VAN DYKE, T.E. Role for moesin in lipopolysaccharide-stimulated signal transduction. *Infect Immun.*, n.72, p.2312-20, 2004.

IVANOV, I.I.; ZHOU, L.; LITTMAN, D.R. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Semin Immunol*, v.19, n.6, p.409-17, 2007.

JENKINSON, C. P.; GRODY, W. W.; CEDERBAUM, S. D. Comparative properties of arginases. *Comp Biochem Physiol*, v.114, p.107-32, 1996.

JOUANGUY, E.; DOFFINGER, R.; DUPUIS, S.; PALLIER, A.; ALTARE, F.; CASANOVA, J.L. IL-12 and IFN- $\gamma$  in host defense against mycobacteria and salmonella in mice and men. *Curr. Opin. Immunol.*, v.11, p.346-51, 1999.

JOHNSON, M.D.; PLANTINGA, T.S.; VAN DE VOSSE, E.; et al. Cytokine gene polymorphisms and the outcome of invasive candidiasis: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis.*, v.54, n.4, p.502-10, 2012.

KAUFFMAN, C.A. Sporotrichosis. *Clin. Infect. Dis.*, v.29, n.2, p.231-6, 1999.

KANYO, Z.F.; SCOLNICK, L.R.; ASH, D.E.; CHRISTIANSON, D.W. Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase. *Nature*, v.383, p.554-7, 1996.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Signaling to NF- $\kappa$ B by Toll-like receptors. *TRENDS Mol. Med.*, v.13, p.460-9, 2007.

KONG, X.; XIAO, T.; LIN, J.; WANG, Y.; CHEN, H.D. Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection. *Clin Microbiol Infect.*, v.12, n.11, p.1077-81, 2006.

KOZEL, T.R. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol.*, v.3, p.295-9, 1995.

KUWABARA, T.; TANAKA, Y.; ISHIKAWA, F.; KONDO, M.; SEKIYA, H.; KAKIUCHI, T. CCR7 ligands up-regulate IL-23 through PI3-kinase and NF- $\kappa$  B pathway in dendritic cells. *J Leukoc Biol.*, v.92, n.2, p.309-18, 2012

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; COSTA MARTINS, J.E. *Micologia médica*. Ed. Sarvier, 2008, p.428.

LAEMMELI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.680-5, 1970.

LEWIS, L.E.; BAIN, J.M.; LOWES, C.; GILLESPIE, C.; RUDKIN, F.M.; GOW, N.A.; ERWIG, L.P. Stage specific assessment of *Candida albicans* phagocytosis by macrophages identifies cell wall composition and morphogenesis as key determinants. *PLoS Pathog.*, v.8, n.3, p. e1002578, 2012.

LI, M.O.; WAN, Y.Y.; SANJABI, S.; ROBERTSON, A.K.L.; FLAVELL, R.A. Transforming growth factor- $\beta$  regulation of immune responses, *Ann. Rev. Immunol.*, v. 24, p.99-146, 2006.

LIANG, M.D.; BAGCHI, A.; WARREN, H.S.; TEHAN, M.M.; TRIGILIO, J.A.; BEASLEY-TOPLIFFE, L.K.; TESINI, B.L.; LAZZARONI, J.C.; FENTON, M.J.; HELLMAN, D.J. Bacterial peptidoglycan-associated lipoprotein: a naturally occurring Toll-like receptor 2 agonist that is shed into serum and has synergy with lipopolysaccharide. *J. Infect. Dis.*, v.191, p.939-48, 2005.

LIMA, O.C.; FIGUEIREDO, C.C.; PREVIATO, J.O.; MENDONCA-PREVIATO, L.; MORANDI, V.; LOPES-BEZERRA, L.M. Involvement of fungal cell wall components in adhesion of *Sporothrix schenckii* to human fibronectin. *Infect Immun*, v.69, p.6874-80, 2001.

LIN, J.; KAWASAKI, M.; AOKI, M.; ISHIZAKI, H.; YOU, G.; LI, R. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* clinical isolates from China. *Mycopathologia*, v.148, p.69-72, 1999.

LIVONESI, M.C.; SOUTO, J.T., CAMPANELLI, A.P.; MAFFEI, C.M.L.; MARTINEZ, R.; ROSSI, M.A.; SILVA, J.S. Deficiency of IL-12p40 subunit determines severe paracoccidioidomycosis in mice *Medical Mycology*, n. 46, p.637-46, 2008.

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.*, v.107, p.663-71, 1971.

LOPES-BEZERRA, L.M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R.O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Ann. Brazil. Acad. Sciences*, v.78, p.293-308, 2006.

LÓPEZ-ROMERO, E.; REYES-MONTES, M.R.; PÉREZ-TORRES, A.; RUIZ-BACA, E.; VILLAGÓMEZ-CASTRO, J.C.; MORA-MONTES, H.M.; FLORES-CARREÓN, A.; TORIELLO, C. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. *Future Microbiol.*, v.6, n.1, p.85-102, 2011.

LOURES, F.V.; PINA, A.; FELONATO, M.; FERIOTTI, C.; ARAUJO, E.F.; CALICH, V.L.G. MyD88 Signaling Is Required for Efficient Innate and Adaptive Immune Responses to *Paracoccidioides brasiliensis* Infection. *Infect Immun*, v.76, n.6, p.2470–80, 2011

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v.193, n.1, p.265-75, 1951.

MAIA, D.C.G.; SASSÁ, M.F.; PLACERES, M.C.P.; CARLOS, I.Z. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*, v.161, p.11-9, 2006.

MARTINEZ, F.O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Ann Rev Immunol.*, v.27, p.451-83, 2009.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; VECCHI, A.; LOCATI, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.*, v.25, p.677-86, 2004.

MANTOVANI, A.; GARLANDA, C.; LOCATI, M. Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.29, n.10, p.1419-23, 2009.

MARIMON, R.; CANO, J.; GENE, J.; SUTTON, D.A.; KAWASAKI, M.; GUARRO, J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol.*, v.45, n.10, p.3198–206, 2007.

MENCACCI, A.; TOROSATUCCI, A.; SPACCAPELO, R.; ROMANI, L.; BISTONI, F.; CASONE, A. A mannoprotein constituent of *Candida albicans* that elicits different levels of delayed-type hypersensitivity, cytokine production, and anticandidal protection in mice. *Infect. Immun.*, v.62, p.5353-60, 1994.

MENDES-GIANINNI, M.J.S.; MELHEM, M.S.C. Infecções Fúngicas. In: FERREIRA, A.W.; AVILA, S.L.M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. 2ª Ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001, p.443.

MESA-ARANGO, A.C.; REYES-MONTES, M.R.; PÉREZ-MEJÍA, A.; NAVARRO-BARRANCO, H.; SOUZA, V.; ZÚÑIGA, G.; TORIELLO, C. Phenotyping and Genotyping of *Sporothrix schenckii* Isolates According to Geographic Origin and Clinical Form of Sporotrichosis. *J Clin Microbiol.*, v.40, n.8, p.3004-11, 2002.

MILLAN, F.A.; DENHEZ, F.; KONDAIAH, P.; AKHURST, R.J. Embryonic gene expression patterns of TGF beta 1, beta 2 and beta 3 suggest different developmental functions in vivo. *Development.*, v.111, n.1, p.131-43, 1991.

MILLS, C.D.; KINCAID, K.; ALT, J.M.; HEILMAN, M.J.; HILL, A.M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*, v.164, p.6166-73, 2000.

MOORE, K.W.; DE WAAL, M.R, COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.*, v.19, p.683-765, 2001.

MORI, M.; GOTOH, T. Arginine metabolic enzymes, nitric oxide and infection. *J. Nutr.*, v.134, p.2820S-5S, 2004.

MORRIS-JONES, R. Sporotrichosis. *Clin. Exp. Dermatol.*, v.27, n.6, p.427-31, 2002.

MORRIS-JONES, R.; YOUNGCHIM, S.; GOMEZ, B.L.; AISEN, P.; HAY, R.J.; NOSANCHUK, J.D.; CASADEVALL, A.; HAMILTON, A.J. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. *Infect Immun.*, v.71, n.7, p.4026-33, 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, v.65, n.1-2, p.55-63, 1983.

MOSSALAYI, M.D.; VOULDOUKIS, I.; MAMANI-MATSUDA, M.; KAUSS, T.; GUILLON, J.; MAUGEIN, J.; MOYNET, D.; RAMBERT, J.; DESPLAT, V.; MAZIER, D.; VINCENDEAU, P.; MALVY, D. CD23 mediates antimycobacterial activity of human macrophages. *Infect Immun.*, v.77, n.12, p.5537-42, 2009.

MOSSER, D.M. The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.*, v.73, p.209-12, 2003.

MUELLER, C.K.; SCHULTZE-MOSGAU, S. Histomorphometric analysis of the phenotypical differentiation of recruited macrophages following subcutaneous implantation of an allogeneous acellular dermal matrix. *Int J Oral Maxillofac Surg.*, v.40, n.4, p.401-7, 2011.

MUNDER, M.; EICHMANN, K.; MODOLELL, M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4<sup>+</sup> T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol*, v.160, p.5347-54, 1998.

MUNDER, M.; EICHMANN, K.; MORAN, J.M.; CENTENO, F.; SOLER, G.; MODOLELL, M. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J Immunol*, v.163, p.3771-7, 1999.

NASCIMENTO, R.C.; ALMEIDA, S.R. Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v.43, p.241-47, 2005.

NASCIMENTO, R.C.; ESPÍNDOLA, N.M.; CASTRO, R.A.; TEIXEIRA, P.A.; LOUREIRO Y PENHA, C.V.; LOPES-BEZERRA, L.M.; ALMEIDA, S.R. Passive immunization with monoclonal antibody against a 70-kDa putative adhesin of *Sporothrix schenckii* induces protection in murine sporotrichosis. *Eur J Immunol*. v.38, n.11, p.3080-9, 2008.

NEGRINI, T.C.; FERREIRA, L.S.; ALEGRANCI, P.; ARTHUR, R.A.; SUNDFELD, P.P.; MAIA, D.C., SPOLIDORIO, L.C.; CARLOS, I.Z. Role of TLR-2 and Fungal Surface Antigens on Innate Immune Response Against *Sporothrix schenckii*. *Immunol Invest.*, v.42, n.1, p.36-48, 2013.

ODA, L.M.; KUBELKA, C.F.; ALVIANO, C.S.; TRAVASSOS, L.R. Ingestion of yeast forms of *Sporothrix schenckii* by mouse peritoneal macrophages. *Infect. Immun.*, v.39, n.2, p.497-504, 1983.

OLIVER, E.; MCGILLICUDDY, F.C.; HARFORD, K.A.; REYNOLDS, C.M.; PHILLIPS, C.M.; FERGUSON, J.F.; ROCHE, H.M. Docosahexaenoic acid attenuates macrophage-induced inflammation and improves insulin sensitivity in adipocytes-specific differential effects between LC n-3 PUFA. *J Nutr Biochem.*, v.23, n.9, p.1192-200, 2012.

OLIVEIRA, M.M.E.; ALMEIDA-PAES, R.; MUNIZ, M.M.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. *Mycopathologia*, v.172, p.257-67, 2011.

PESCE, J.T.; RAMALINGAM, T.R.; MENTINK-KANE, M.M.; WILSON, M.S.; EL KASMI, K.C.; et al. Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS Pathog.*, v.5, p.e1000371, 2009.

PINHEIRO DA SILVA, F.; ALOULOU, M.; SKURNIK, D.; BENHAMOU, M.; ANDREMONT, A.; VELASCO, I.T.; CHIAMOLERA, M.; VERBEEK, J.S.; LAUNAY, P.; MONTEIRO, R.C. CD16 promotes *Escherichia coli* sepsis through an FcR $\gamma$  inhibitory pathway that prevents phagocytosis and facilitates inflammation. *Nat. Med.*, v.13, p.1368-74, 2007.

RAMOS-E-SILVA, M.; VASCONCELOS, C.; CARNEIRO, S.; CESTARI, T. Sporotrichosis. *Clin Dermatol*, v.25, p.181-7, 2007.

RAUH, M.L.; HO, V.; PEREIRA, C.; SHAM, A.; SLY, L.M.; LAM, V.; HUXHAM, L.; MINCHINTON, A.I.; MUI, A.; KRYSTAL, G. SHIP represses the generation of alternatively activated macrophages. *Immunity*, v.23, p.361-74, 2005.

ROCHA, M.M.; DASSIN, T.; LIRA, R.; LIMA, E.L.; SEVERO, L.C.; LONDERO, A.T. Sporotrichosis in patient with AIDS: report of a case and review. *Rev Iberoam Micol.*, v.18, n.3, p.133-6, 2001.

RODRIGUEZ-CABAN, J.; GONZALEZ-VELAZQUEZ, W.; PEREZ-SANCHEZ, L.; GONZALEZ-MENDEZ, R.; RODRIGUEZ-DEL VALLE, N. Calcium/calmodulin kinase 1 and its relation to thermotolerance and HSP90 in *Sporothrix schenckii*: an RNAi and yeast two-hybrid study. *BMC Microbiology*, v.11, p.162, 2011.

RODRÍGUEZ-CERDEIRA C, ARENAS R, MORENO-COUTIÑO G, VÁSQUEZ E, FERNÁNDEZ R, CHANG P. Systemic fungal infections in patients with human immunodeficiency virus. *Actas Dermosifiliogr.*, 2012. doi: 10.1016/j.ad.2012.06.017.

ROMERO-CABELLO R, BONIFAZ A, ROMERO-FEREGRINO R, SÁNCHEZ CJ, LINARES Y, ZAVALA JT, ROMERO LC, ROMERO-FEREGRINO R, VEGA JT. Disseminated sporotrichosis. *BMJ Case Rep.*, 2011, doi: 10.1136/bcr.10.2010.3404.

ROMERO-MARTINEZ, R.; WHEELER, M.; GUERRERO-PLATA, A.; RICO, G.; TORRES-GUERRERO, H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect Immun.*, v.68, n.6, p.3696-703, 2000.

RUAN, S.; MCKINLEY, L.; ZHENG, M.; RUDNER, X.; D'SOUZA, A.; KOLLS, J.K.; SHELLITO, J.E. Interleukin-12 and host defense against murine *Pneumocystis pneumonia*. *Infect Immun.*, v.76, n.5, p.2130-7, 2008.

RUIZ-BACA, E.; MORA-MONTES, H.M.; LÓPEZ-ROMERO, E.; TORIELLO, C.; MOJICA-MARÍN, V.; URTIZ-ESTRADA, N. 2D-immunoblotting analysis of *Sporothrix schenckii* cell wall. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.106, n.2, p.248-50, 2011.

SAMONIS, G.; BAFALOUKOS, D. Fungal infections in cancer patients: an escalating problem. *In Vivo.*, v.6, n.2, p.183-93, 1992.

SASSÁ, M.F.; SATURI, A.E.T.; SOUZA, L.F.; RIBEIRO, L.C.A.; SGARBI, D.B.G.; CARLOS, I. Z. Response of macrophages Toll-like receptor 4 to a *Sporothrix schenckii* lipid extract during experimental sporotrichosis. *Immunol.*, v.128, p.301-9, 2009.

SASSÁ, M.F.; SOUZA, L.F.; RIBEIRO, L.C.A.; CARLOS, I. Z., Immune response against *Sporothrix schenckii* in TLR-4-deficient mice. *Mycopathologia*, v.174, n.1, p.21-30, 2012.

SCHECHTMAN RC. Sporotrichosis: Part I. *Skinmed.*, v.8, n.4, p.216-20, 2010.

SCHENCK, B. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to sporotrichia. *John Hopkins Hosp.*, v.9, p.286-90, 1898.

SCHUBACH, T.M.; SCHUBACH, A.O.; CUZZI-MAYA, T.; OKAMOTO, T.; REIS, R.S.; MONTEIRO, P.C.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; WANKE, B. Pathology of sporotrichosis in 10 cats in Rio de Janeiro. *Vet Rec.*, v.152, n.6, p.172-5, 2003.

SCHUBACH, A.; SCHUBACH, T.M.P.; BARROS, M.B.L. WANKE, B.. Cat-transmitted sporotrichosis, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis.*, v.11, n.12, p.1952-4, 2005.

SCHUBACH, A.; BARROS, M.B.; WANKE, B. Epidemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis.*, v.21, n.2, p.129-33, 2008.

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

SGARBI, D.B.G.; SILVA, A.J.R.; CARLOS, I.Z.; SILVA, C.L.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C.S., Isolation of ergosterol peroxide and its reversion to ergosterol in the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*, v.139, p.9-12, 1997.

SHAUGHNESSY, L.M.; SWANSON, J.A. The role of the activated macrophage in clearing *Listeria monocytogenes* infection. *Front Biosci.*, v.12, p.2683-92, 2007.

SICA, A.; PORTA, C.; RIBOLDI, E.; LOCATI, M. Convergent pathways of macrophage polarization: The role of B cells. *Eur J Immunol*, v.40, n.11, p.3291, 2010.

SIERRA-FILARDI E.; VEGA M.; SANCHEZ-MATEOS P.; CORBI, A.L.; PUIG-KROGER A. Heme Oxygenase-1 expression in M-CSF-polarized M2 macrophages contributes to LPS-induced IL-10 release. *Immunobiol.*, v.215, p.788-95, 2010.

SILVA-VERGARA, M.L.; MANEIRA, F.R.; DE OLIVEIRA, R.M.; SANTOS, C.T.; ETCHEBEHERE, R.M.; ADAD, S.J. Multifocal sporotrichosis with meningeal involvement in a patient with AIDS. *Med Mycol.*, v.43, n.2, p.187-90, 2005.

TACHIBANA, T.; MATSUYAMA, T.; MITSUYAMA, M. Characteristic infectivity of *Sporothrix schenckii* to mice depending on routes of infection and inherent fungal pathogenicity. *Med. Mycol.*, v.36, p.21-7, 1998.

TAYLOR, P.R.; MARTINEZ-POMARES, L.; STACEY, M.; LIN, H.H.; BROWN, G.D.; GORDON, S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev. Immunol.*, v.23, p.901-44, 2005.

TEIXEIRA, M.M.; ALMEIDA, I.C.; GAZZINELLI, R.T. Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. *Microbes Infect.*, v.4, n.9, p.883-6, 2002.

TEIXEIRA, P.A.; DE CASTRO, R.A.; NASCIMENTO, R.C.; TRONCHIN, G.; TORRES, A.P.; LAZÉRA, M.; DE ALMEIDA, S.R.; BOUCHARA, J.P.; LOUREIRO

Y PENHA, C.V.; LOPES-BEZERRA, L.M. Cell surface expression of adhesins for fibronectin correlates with virulence in *Sporothrix schenckii*. *Microbiol.*, v.155, p.3730-8, 2009.

TSUBOI, R.; SANADA, T.; TAKAMORI, K.; OGAWA, H. Isolation and properties of extracellular proteinases from *Sporothrix schenckii*. *J Bacteriol.*, v.169, n.9, p.4104-9, 1987.

TRINCHIERI, G.; PFLANZ, S.; KASTELEIN, R.A. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity*, v.19, p.641, 2003.

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J.D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother.*, v.46, n.11, p.3394-400, 2002.

VONK, A.G.; NETEA, M.G.; KULLBERG, B.J. Phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* by murine polymorphonuclear neutrophils. *Methods Mol. Biol.*, v.845, p.277-87, 2012.

WIEKOWSKI, M.T.; LEACH, M.W.; EVANS, E.W.; SULLIVAN, L.; CHEN, S.C.; VASSILEVA, G.; BAZAN, J.F.; GORMAN, D.M.; KASTELEIN, R.A.; NARULA, S.; LIRA, S.A. Ubiquitous transgenic expression of the IL-23 subunit p19 induces multiorgan inflammation, runting, infertility, and premature death. *J Immunol.*, v.166, n.12, p.7563-70, 2001.

YOSHIKE, T.; LEI, P.C.; KOMATSUZAKI, H.; OGAWA, H. Antibody raised against extracellular proteinases of *Sporothrix schenckii* in *S. schenckii* inoculated hairless mice. *Mycopathologia*, v.123, n.2, p.69-73, 1993.

ZHANG, X.; GONCALVES, R. MOSSER, D.M. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol.*, Chapter 14: Unit 14.11, 2008.

ZHANG CR; LIN JC; XU WM; LI M; YE HS; CUI WL; LIN Q. Interleukin-12 and interleukin-2 alone or in combination against the infection in invasive pulmonary aspergillosis mouse model. *Mycoses*, 2012. doi: 10.1111/j.1439-0507.2012.02220.x.

ZHI LI, ZHI-JUN ZHAO, XING-QUAN ZHU, QING-SHI REN, FANG-FANG NIE, et al. Differences in iNOS and Arginase Expression and Activity in the Macrophages of Rats Are Responsible for the Resistance against *T. gondii* Infection. *PLoS One*, v.7, n.4, p.e35834, 2012.

ZHOU, T.; SUN, G.Z.; ZHANG, Y.M.; ZHANG, Y.Y.; ZHANG, D.Q.; TANG, X.M.; CHEN, N. Effect of interleukin-10 on the phenotype and function of cultured human dendritic cells. *Chin Med J (Engl.)*, v.118, n.15, p.1299-302, 2005.

## 9 APÊNDICE

Tabela 1. Fenotipagem de células do exsudato peritoneal (PECs) expressando os receptores F4/80<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, CD197<sup>+</sup>, CD121b<sup>+</sup>, CD121b<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup> e CD206<sup>+</sup>.

Semanas	Não infectados					Infectados				
	F4/80 / CD11b	CD197	CD121b	CD23	CD206	F4/80 / CD11b	CD197	CD121b	CD23	CD206
2 <sup>a</sup>	19,8 ± 5,4	4,2 ± 1,2	3,6 ± 1,6	21,5 ± 3,9	6,2 ± 1,2	43,82 ± 5	11,7 ± 2	4,4 ± 0,2	32,5 ± 1	12 ± 1
4 <sup>a</sup>	17,7 ± 3	6,2 ± 0,5	2,8 ± 0,9	4,9 ± 0,4	14,6 ± 3	79,4 ± 2,3	7,5 ± 0,6	8,5 ± 2,3	3 ± 0,4	35 ± 3
6 <sup>a</sup>	13,9 ± 5,3	10 ± 2	3,4 ± 3	2,4 ± 0,3	18,6 ± 2,5	76 ± 1,8	9,5 ± 1,7	24,2 ± 1,9	20,1 ± 2	42,5 ± 1,8
8 <sup>a</sup>	13,3 ± 1,6	4,2 ± 1,9	10 ± 4	2,3 ± 0,3	15,2 ± 3,4	59,2 ± 1,3	3,7 ± 1,4	11,5 ± 1,5	4,9 ± 2,1	77,3 ± 4

\* Média ± desvio padrão

Tabela 2. Produção de NO em cultura de células do exsudato peritoneal (em  $\mu\text{mol}/5 \times 10^6$  células) para os grupos testados

Semanas	Não infectados				Infectados			
	LPS	ExoAg	EL	RPMI-C	LPS	ExoAg	EL	RPMI-C
2 <sup>a</sup>	44,3±2,6	4,5±1,1	5,7±0,8	4,6±0,4	53,6±1,2	30,5±3,3	15,3±0,6	7,1±0,7
4 <sup>a</sup>	42,9±2,1	7,6±0,9	4,9±0,5	3,9±0,2	64±2,1	40,1±0,6	32,6±0,6	5,7±0,5
6 <sup>a</sup>	43,1±6,9	3,9±0,5	4±0,4	3±0,5	71,3±5,6	33,9±1,5	31,3±1	5±0,3
8 <sup>a</sup>	44,3±2,6	2,2±0,3	1,5±0,4	1,9±0,3	61,5±3,2	21,8±2,2	3,6±0,7	8±0,6

\* resultados expressos como média ± desvio padrão

Tabela 3. Atividade da enzima arginase em cultura de células do exsudato peritoneal (em mU) para os grupos testados

Semanas	Não infectados				Infectados			
	LPS	ExoAg	EL	RPMI-C	LPS	ExoAg	EL	RPMI-C
2 <sup>a</sup>	4,3±0,5	3,9±0,5	3,7±0,4	2,8±0,3	2,9±0,6	2,9±0,5	2,9±0,4	2,7±0,4
4 <sup>a</sup>	4,7±0,7	4,5±0,8	4,8±0,8	3,8±0,3	6,0±0,7	6±0,9	5,9±0,4	3,5±0,4
6 <sup>a</sup>	5,4±0,7	4,5±0,3	3,9±0,6	3,6±0,2	6,3±0,7	6,3±0,1	6±0,5	4±0,7
8 <sup>a</sup>	4,5±0,7	4±0,8	4,1±0,2	2,7±0,6	5±1	4±0,6	5,3±0,7	3,6±0,4

\* resultados expressos como média ± desvio padrão

Tabela 4. Produção de IL-12 (em pg/mL) para os grupos testados

Semanas	Não infectados				Infectados			
	LPS	ExoAg	EL	RPMI-C	LPS	ExoAg	EL	RPMI-C
2 <sup>a</sup>	965,6±12	95,8±6	18,8±3	87,6±7	2067,7±107	383,5±18	1015,2±5	95,8±9
4 <sup>a</sup>	930,6±11	82,2±4	29,2±2	87±3	2097,3±96	374,5±23	945,6±7	56,5±5
6 <sup>a</sup>	875,6±4	83,8±4	42,1±8	72,7±6	2310,3±91	375,2±4,5	947,3±9	72±5
8 <sup>a</sup>	919,8±4	75,4±8	25,3±4	82,2±5	2184,1±18	372±0,5	786,1±20	90,4±4

\* resultados expressos como média ± desvio padrão

Tabela 5. Produção de IL-23 (em pg/mL) para os grupos testados

Semanas	Não infectados				Infectados			
	LPS	ExoAg	EL	RPMI-C	LPS	ExoAg	EL	RPMI-C
2 <sup>a</sup>	856,2±55	54,3±3	66,5±1	13,2±1	879,7±65	116,3±4	179,8±29	30,7±5
4 <sup>a</sup>	899,9±55	31±2	31,8±5	15,8±1	904,9±54	160,8±8	176,7±22	22,5±2
6 <sup>a</sup>	910,1±47	12,1±3	27,9±4	13,4±1	908,3±55	34,2±3	225±5	33,1±6
8 <sup>a</sup>	749,4±22	25,8±3	33±8	13±3	758±11	39,6±4	217±5	23,8±2

\* resultados expressos como média ± desvio padrão

Tabela 6. Produção de IL-10 (em pg/mL) para os grupos testados

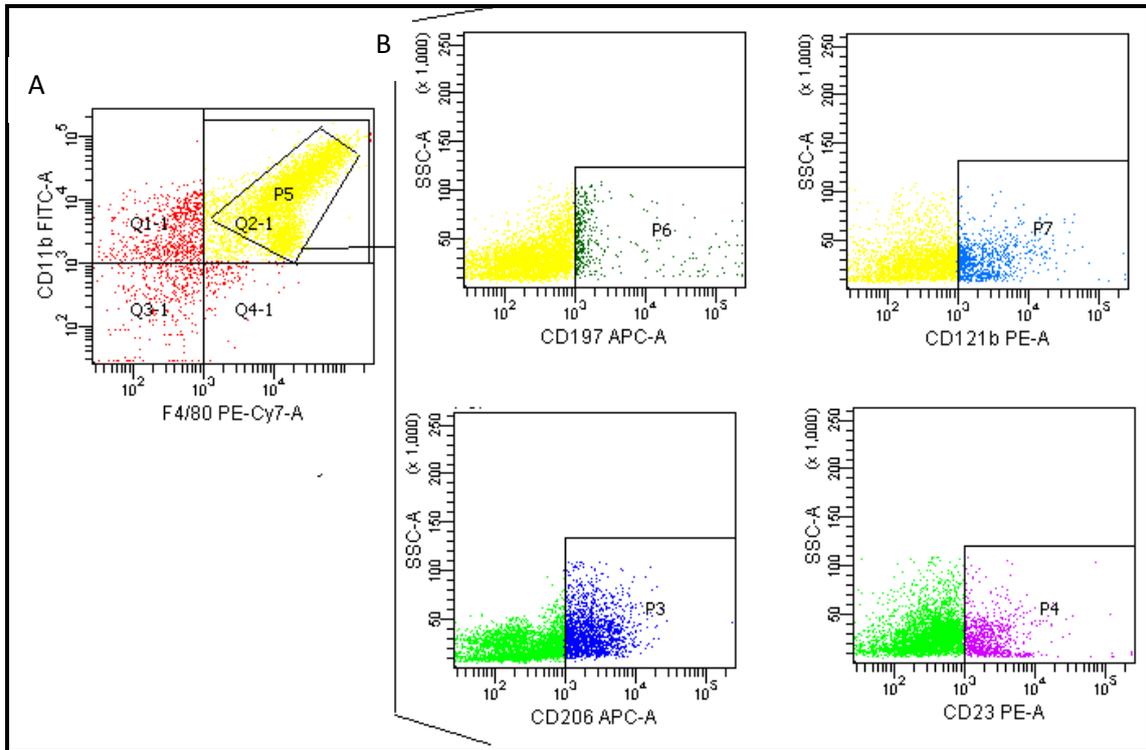
Semanas	Não infectados				Infectados			
	LPS	ExoAg	EL	RPMI-C	LPS	ExoAg	EL	RPMI-C
2 <sup>a</sup>	748,6±28	128,9±23	45,3±5	96,4±3	1670,8±104	478±18	476,3±19	149,8±29
4 <sup>a</sup>	820,2±28	106±10	41,8±2	79,5±3	1188,8±49	746±19	461,3±15	161,3±17
6 <sup>a</sup>	817,4±30	94,2±3	36,9±2,5	49,2±2	1251,1±64	938,6±14	770,2±16	142,2±13
8 <sup>a</sup>	850,8±17	91,8±1	38,6±2	76,2±3	1546,9±30	896±15	441,6±21	117±15

\* resultados expressos como média ± desvio padrão

Tabela 7. Produção de TGF-β (em pg/mL) para os grupos testados

Semanas	Não infectados				Infectados			
	LPS	ExoAg	EL	RPMI-C	LPS	ExoAg	EL	RPMI-C
2 <sup>a</sup>	758,1±47	15,1±4	12,4±2	7,4±0,4	1597,5±72	454,1±35	401,4±30	43,4±0,7
4 <sup>a</sup>	1354,1±13	21,3±1	31,8±3	14,1±0,6	1416,5±123	586,8±13	378,8±7	32,3±3
6 <sup>a</sup>	1372,3±1	36,7±4	32,3±5	13,2±2	1519,1±13	639,6±4	654±5	41,7±4
8 <sup>a</sup>	1382,8±1	43,2±6	37,2±5	20,3±3	1617,1±30	599,3±19	320,5±22	49±4

\* resultados expressos como média ± desvio padrão



**Figura 1.** Gráficos “dot plots” representativos da expressão de A) F4/80 e CD11b e B) CD197, CD121b, CD206 e CD23 nas células do exsudato peritoneal de camundongos *Swiss* infectados com o fungo *Sporothrix schenckii*. Os valores apresentados nos quadrantes dos gráficos correspondem aos valores médios das medianas das intensidades de fluorescência de cinco animais por experimento.

## **CAPÍTULO II**

**Artigo submetido para publicação**

**The predominance of alternatively activated macrophages following challenge with cell wall peptide-polysaccharide after prior infection with *Sporothrix schenckii***

PAMELA ALEGRANCI<sup>1</sup>; LIVIA CAROLINA DE ABREU RIBEIRO<sup>1</sup>; LUCAS SOUZA FERREIRA<sup>1</sup>; THAIS DE CÁSSIA NEGRIN<sup>1</sup>; DANIELLE CARDOSO GERALDO MAIA<sup>1</sup>; ALINE TANSINI<sup>1</sup>; MARISA CAMPOS POLESÍ PLACERES<sup>1</sup>; IRACILDA ZEPPONE CARLOS<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, Sao Paulo State University (UNESP), Sao Paulo, Brazil

**Corresponding author:**

Prof. Dr. Iracilda Zeppone Carlos

Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, Sao Paulo State University (UNESP), Sao Paulo, Brazil

Rua Expedicionários do Brasil n<sup>o</sup> 1621, Araraquara, SP, CEP 14.801-902. Brazil

Tel.: +55-16-3301-6549; Fax: +55-16-3332-0486.

E-mail address: carlosiz@fctar.unesp.br

**Abstract**

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis that is caused by the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*. This disease generally occurs within the skin and subcutaneous tissues, causing lesions that can spread through adjacent lymphatic vessels and sometimes leading to systemic diseases in immunocompromised patients. Macrophages are crucial for proper immune responses against a variety of pathogens. Furthermore, macrophages can play different roles in response to different microorganisms and forms of activation, and they can be divided into “classic” or “alternatively” activated populations, as also known as M1 and M2 macrophages. M1 cells can lead to tissue injury and contribute to pathogenesis, whereas M2 cells promote angiogenesis, tissue remodeling and repair. The aim of this study was to investigate the roles of M1 and M2 macrophages in a sporotrichosis model. Toward this end, we performed phenotyping of peritoneal exudate cells and evaluated the concomitant production of several immunomediators, including IL-12, IL-10, TGF- $\beta$ , nitric oxide and arginase-I activity, which were stimulated *ex vivo* with cell wall peptide-polysaccharide. Our results showed the predominance of the M2 macrophage population, indicated by peaks of arginase-I activity as well as IL-10 and TGF- $\beta$  production during the 6<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> weeks after infection. These results were consistent with cellular phenotyping that revealed increases in CD206-positive cells over this period. This is the first report of the participation of M2 macrophages in sporotrichosis infections.

**Keywords:** *Sporothrix schenckii*; M2 macrophages; Cell wall peptide-polysaccharide; CD206; interleukin, fungus.

## Introduction

Sporotrichosis is a type of chronic subcutaneous infection that is caused by the thermally dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*. Fungal infection usually occurs through inoculation of the skin or subcutaneous tissues via small wounds or trauma. The fungus can remain restricted to the site of inoculation, proceed to nearby lymph nodes, or in some cases, induce multifocal or systemic disease via hematogenous spread [1, 2], the latter outcome occurring primarily in immunocompromised individuals [3-5].

Specific characteristics of *S. schenckii* are relevant to clinical manifestations of sporotrichosis, and research has been directed at the fungal components that may be involved in recognition and induction of the immune response. For example, the fungal wall—a rigid and complex structure—contains polysaccharides and glycoproteins that have been studied at the chemical level to determine whether they contain antigenic epitopes [6-8]. Furthermore, it was demonstrated that cell-surface glycoconjugates can bind to human fibronectin via their carbohydrate or peptide moieties [9].

The peptide ramnomannan, which can be isolated from the yeast form of *S. schenckii*, showed mitogenic activity when cultured with lymphocytes from healthy animals [10] and both galactomannan and ramnomannan purified from the cell surface of *S. schenckii* are capable of inhibiting the phagocytosis of yeast cells by peritoneal macrophages *in vitro* [11]. It has also been observed that the humoral immune response generates antibodies that are protective against fungal antigens [8, 12]. Taken together, these studies demonstrate the ability of compounds and antigens released by *S. schenckii* to both activate and evade the immune response.

Macrophages can adopt a variety of phenotypes, resulting from their broad tissue distribution and concomitant adaptation to various microhabitats as well as in response to a numerous endogenous and exogenous stimuli [13]. Macrophages activated by the classical M1 pathway can be polarized by IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  and are necessary to produce the high levels of interleukin 12 (IL-12) and low levels of IL-10 used to induce the Th1 immune response. These cells also exhibit cytotoxic activities because of their ability to secrete reactive oxygen species and nitrogen species, in particular nitric oxide [14,15].

A number of mediators have been reported to inhibit M1 macrophages, which act as anti-inflammatory molecules, and are collectively designated as M2 pathway molecules or "alternative" activators. For example, IL-4, IL-13, Toll-like Receptors

(TLRs), and IL-1 (IL-1ra) can induce M2 polarization and are known to be immunomodulators and with weakly microbicidal activities [14, 16]. Furthermore, M2 macrophages can produce high levels of IL-10 and induce arginase-I expression [17].

The aim of this study was to observe M1 and M2 macrophages following challenge with cell wall peptide-polysaccharide (PPC) from the fungus *Sporothrix schenckii* in an experimental model system, as the role of these macrophage subpopulations in sporotrichosis was unknown. Phenotypic analyses and experiments with immunological mediators indicate the predominance of M2 macrophages during the course of infection. This is the first report that M2 macrophages participate during sporotrichosis infection, and these findings may contribute to a better understanding of the innate immune-response mechanisms directed against *S. schenckii*.

## **Materials and Methods**

### **Fungus**

The fungus *S. schenckii*, strain 1099-18, was originally isolated from a human case of sporotrichosis at the Mycology section of the Department of Dermatology, Columbia University, New York. For use in the present study, the fungus was cultured at 37°C for 8 days in brain heart infusion broth (BHI; Difco Laboratories, Detroit, MI) with constant shaking at 150 cycles/min.

### **Cell wall peptide-polysaccharide**

Cell wall peptide-polysaccharide (PPC) was extracted according to the method of Loureiro-Penha and Lopez-Bezerra [18] with a few modifications: an *S. schenckii* culture in BHI broth (containing mostly yeast cells) was killed using a combination of UV radiation and thimerosal (1:5000). Yeast cells were retrieved by centrifugation at 700 g for 5 min at 4°C and washed three times with sterile phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. Following the last wash, cells were resuspended in sterile PBS, autoclaved for 90 min at 120°C and then kept overnight under rotatory shaking of 150 rpm at 37°C. The supernatant containing the extracted PPC was separated from other cellular components by centrifugation at 700 g for 5 min and dialyzed against PBS, pH 7.4, for 72 h at 4-8°C. The resulting PPC solution was concentrated with polyethylene glycol 20,000 and precipitated with 5 volumes of absolute ethanol and centrifugation at

2,650 g for 10 min. This previous step was repeated one more time, and the resulting precipitate was resuspended in sterile PBS, pH 7.4, and further dialyzed and concentrated as described above. Protein concentration was determined using the Lowry method [19] before the final PPC solution was aliquoted and stored at -20 °C.

### **Animals**

Six-week-old male Swiss mice weighing 18 to 25 g were supplied by the Central Animal House of UNICAMP University (CEMIB, Campinas, Brazil). These animals were used for all experiments described here. All procedures involving animals were approved by the Research Ethics Committee of the School of Pharmaceutical Sciences, UNESP, Araraquara, SP, Brazil (CEP/FCFAr n° 13/2009).

### **Infection protocol and experimental groups**

For animal infection, yeast-phase organisms were grown as described above. After 8 days, cultures were harvested and washed three times by centrifugation at 350 g for 5 min and washing with PBS, pH 7.4. Yeast cells were counted in a Neubauer chamber (Boeco, Germany), and a new suspension was prepared at a concentration of  $10^7$  cells/ml. Mice received 0.1 ml ( $10^6$  yeast cells) of this suspension via intraperitoneal (i.p.) inoculation. After the 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> weeks post infection animals were euthanized.

### **Peritoneal exudate cells**

Thioglycollate-elicited peritoneal exudate cells (PECs) were harvested from Swiss mice 3 days after i.p. inoculation with 3% sodium-thioglycollate, which was performed by washing the peritoneal cavity with 5.0 ml of sterile PBS, pH 7.4. The cells were cleaned twice by centrifugation at 200 g for 5 min at 4°C and washing with sterile PBS, pH 7.4. The cells were then resuspended in RPMI-1640 medium (Sigma) supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin,  $5 \times 10^{-2}$  M mercaptoethanol and 5% inactivated fetal calf serum (Sigma), referred to here as RPMI-1640 complete (RPMI-1640C) medium. PEC macrophages were manually counted in a Neubauer chamber (Boeco, Germany), and the concentration was adjusted to  $5 \times 10^6$  macrophages/ml in RPMI-1640C for use in the following experiments.

## **Flow Cytometry**

Peritoneal exudate cells were stained for flow-cytometric analysis. Briefly,  $1 \times 10^6$  cells were washed with buffer (PBS containing 0.1% BSA) and stained with the appropriate antibodies for 30 min on ice in the dark: anti-mouse F4/80 (BM8; PE/Cy7-conjugated; BioLegend), anti-mouse CD11b (M1/70; FITC-conjugated; BD Pharmigen), anti-mouse CD197 (4B12; Alexa Fluor 647-conjugated; BD Pharmigen), anti-mouse CD121b (4E2; PE-conjugated; BD Pharmigen), anti-mouse CD23 (B3B4; PE-conjugated; BD Pharmigen), and anti-mouse CD206 (MR5D3; Alexa Fluor 647-conjugate; BioLegend). Cells were washed with FACS buffer and either fixed with 1% p-formaldehyde in PBS (to be run the following day) or immediately run on a FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences). Data were processed using the BD FACSDiva™ software program and analyzed using fluorescence minus one (FMO) and isotype controls for each separate experiment. Macrophage-positive populations were identified as being double-positive for F4/80 and CD11b ( $F4/80^+$  and  $CD11b^+$ ), and all subsequent markers were gated off this population. Results are shown as the percentage of cells expressing each of the analyzed receptors.

## **NO measurement**

For NO measurements, 0.1 ml PEC suspensions containing  $5 \times 10^6$  macrophages/ml in RPMI-1640C were added to each well of a 96-well tissue culture plate and incubated for 1 h at  $37^\circ\text{C}$  in an atmosphere of air/ $\text{CO}_2$  (95/5, v/v) (Forma Scientific). Next, non-adherent cells were removed by discarding the supernatants and refilling each well with 0.1 ml of RPMI-1640C medium. The remaining adherent cells were then incubated with 100  $\mu\text{l}$  50  $\mu\text{g/ml}$  PPC solution with either 10  $\mu\text{g/ml}$  E. coli O111B lipopolysaccharide (LPS) solution (positive control) or RPMI-1640C medium alone (negative control) for 24 h under the same conditions as described above. Next, 50  $\mu\text{l}$  aliquots from the supernatants of each well were mixed with 50  $\mu\text{l}$  of Griess reagent (1% w/v sulphonylamide, 0.1% w/v naphthylethylenediamine and 3%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) and incubated for 10 min at room temperature in the dark. The colorimetric reaction was measured at 540 nm using a Multiskan Ascent ELISA reader (Labsystems, Helsinki, Finland), and the results are shown as mean  $\pm$  SD values of the  $\text{NO}_2$  concentration [20].

### **Arginase activity**

Arginase activity was measured using a previously established protocol [21]. Briefly,  $1 \times 10^6$  cells were lysed with 100  $\mu$ L of 0.1% Triton X-100 in PBS supplemented with protease inhibitors (Complete Minis; Roche, Mississauga, Ontario, Canada). Following room-temperature incubation with shaking for 30 min, 100  $\mu$ L of 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) was added. Next, 10  $\mu$ L of 10 mM  $\text{MnCl}_2$  was added to 100  $\mu$ L of this lysate. The enzyme was activated by heating samples to 56°C for 10 min. L-Arginine hydrolysis was carried out by incubating 100  $\mu$ L of this lysate with 100  $\mu$ L of 0.5 M L-arginine, pH 9.7, at 37°C for 60 min. The reaction was then stopped with 800  $\mu$ L of stop solution [ $\text{H}_2\text{SO}_4$  (96%)/ $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85%)/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:3:7, v/v/v)] and 40  $\mu$ L 9%  $\alpha$ -isonitrosopropiophenone. The reactions were heated to 99°C for 30 min, and 200  $\mu$ L of each sample was analyzed using a microplate reader at 540 nm. A standard curve generated from urea solutions of known concentrations (0 to 20 mM) was used to determine the final concentrations. One unit of arginase activity was defined as the amount of enzyme that catalyzed the formation of 1 mM urea per min at 37°C.

### **Cytokine determination in culture supernatants**

To determine the amount of cytokine released by PECs, the cells were suspended in RPMI-1640C were subjected to non-adherent cell removal as described above for NO measurement with the following exceptions: culturing was performed in 48-well tissue-culture plates using 500  $\mu$ l of the initial PEC suspension, 500  $\mu$ l of RPMI-1640C was used to replace the discarded supernatant, and plus 500  $\mu$ l of each of the following solutions in RPMI-1640C medium: 50  $\mu$ g/ml PPC, 10  $\mu$ g/ml LPS or RPMI-1640C medium alone. After 24 h of culture, the supernatants were assayed for IL-12, IL-10 and tumor growth factor (TGF)- $\beta$  using commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA) (BD Pharmingen or eBioscience) according to the manufacturer's instructions. Colorimetric reactions were measured at 450 nm with wavelength correction at 570 nm on a Multiskan Ascent ELISA reader (Labsystems, Helsinki, Finland).

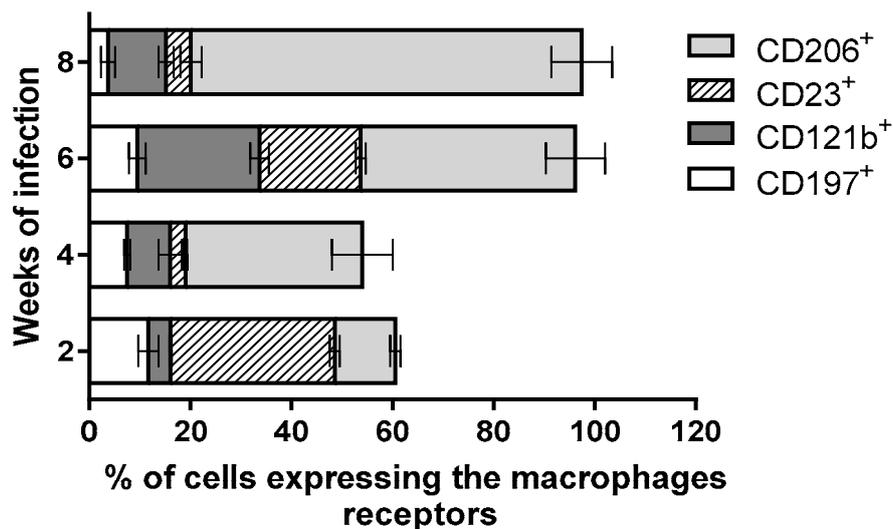
## Statistical analysis

All results are representative of five independent experiments with five animals each and are presented as mean  $\pm$  SD values from triplicate observations, unless stated otherwise. Means were tested for significant differences using the Tukey Test and the software program GraphPad Prism version 6.00; a value of  $p < 0.05$  was considered to be statistically significant.

## Results

### Phenotyping

The population of peritoneal exudate cells (PECs) was characterized using flow cytometry, and macrophages were defined as cells positive for both the F4/80 and CD11b receptors (F4/80<sup>+</sup> and CD11b<sup>+</sup>). Increases in the PEC macrophage population were observed during the 4<sup>th</sup> (79.4%) and 6<sup>th</sup> (76%) weeks after infection with the fungus *Sporothrix schenckii* compared with levels during the 2<sup>nd</sup> and 8<sup>th</sup> weeks (43.8% and 59.2% of cells, respectively). Gates were set on F4/80<sup>+</sup> and CD11b<sup>+</sup> cells to analyze the distribution of the CD197- and CD121b-positive (M1) as well as CD23- and CD206-positive (M2) macrophage populations. The results showed a predominance of the M2 population over the course of the observed period (Figure 1); in particular, CD206 receptor levels during the 8<sup>th</sup> week after infection (77.3%) were 6.4 times greater than observed during the 2<sup>nd</sup> week (12%).

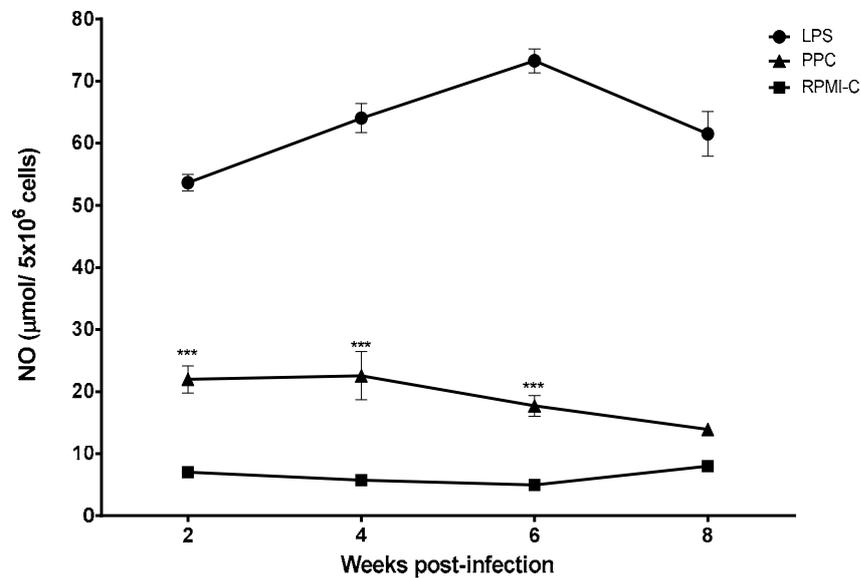


**Fig. 1** The populations of peritoneal exudate cells expressing macrophage-specific markers. Peritoneal macrophages were isolated from *Swiss* mice and stained with mAbs against CD197, CD121b,

CD23 and CD206. Data are shown as mean  $\pm$  SD percentages for cells positive for macrophage-specific markers, gated off a F4/80<sup>+</sup> and CD11b<sup>+</sup> macrophage population

### Evaluation of immune mediators correlated with M1 macrophage populations

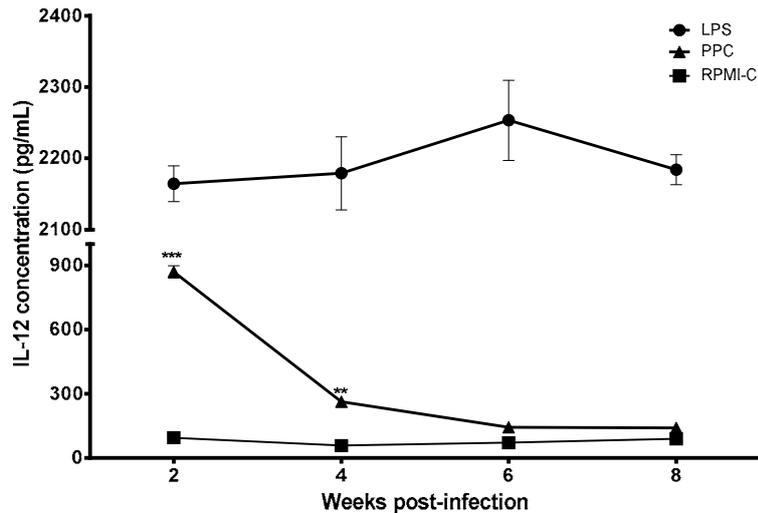
NO production was evaluated using the supernatants of PEC cultures challenged with PPC as well as positive (LPS) and negative (RPMI-C) controls (Figure 2). Increases in NO production were observed during the 2<sup>nd</sup> (21.9%), 4<sup>th</sup> (22.6) and 6<sup>th</sup> (17.7%) weeks after infection, which were statistically significant ( $p < 0.001$ ) compared with negative controls from the same weeks.



**Fig. 2 NO production in cultures of adherent peritoneal exudate cell from Swiss mice infected with the fungus *S. schenckii* during the 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> weeks post-infection.** Adherent cells were cultured (in triplicate) in the presence of cell wall peptide-polysaccharide (PPC), LPS or RPMI-1640C alone. Nitrite concentrations were determined using a previously established standard curve generated from known molar concentrations of sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>). Results are expressed in units of µmol nitrite/5x10<sup>5</sup> cells and are shown as mean  $\pm$  standard deviation values from 5 independent experiments per experimental point (\*\*\*)  $p < 0.001$  compared with the RPMI-C negative controls from the same week)

Another mediator used to analyze the role of the M1 population following infection was IL-12, which was measured from the supernatant of adherent cells stimulated with cell-wall polysaccharide peptide (PPC) as well as from positive (LPS) and negative (RPMI-C) control supernatants (Figure 3). The results showed greatly increased production during the 2<sup>nd</sup> week (869.9 pg/mL) and slightly increased

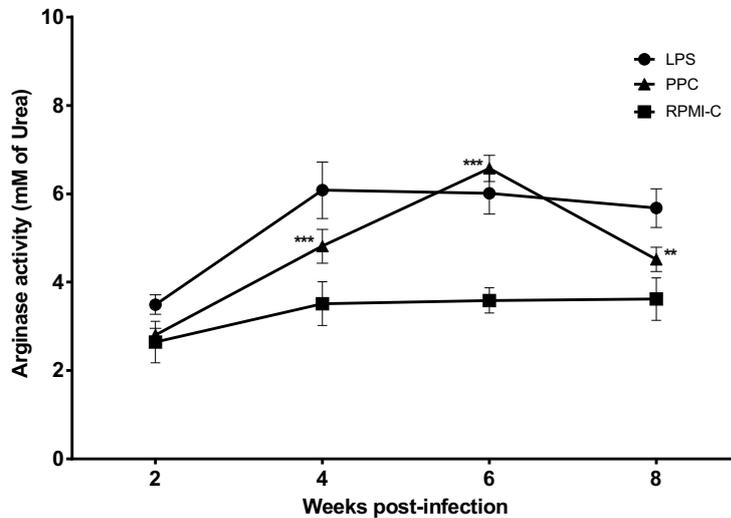
production during the 4<sup>th</sup> week (263.73 pg/mL) after infection, which were statistically significant when compared with negative controls ( $p < 0.001$  and  $p < 0.01$ , respectively). Phenotyping indicated the presence of CD197<sup>+</sup> and CD121b<sup>+</sup> macrophages over the entire course of the infection kinetics, although their functional activity following PPC challenge was primarily observed during the 2<sup>nd</sup> week of infection, as demonstrated by increased cytokine and NO production.



**Fig. 3 Production of IL-12 in cultures of adherent peritoneal exudate cells from Swiss mice infected with the fungus *S. schenckii* during the 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> weeks post-infection.** Adherent cells were cultured (in triplicate) in the presence of cell wall peptide-polysaccharide (PPC), LPS or RPMI-1640C alone. The concentrations of IL-12 were calculated using a previously established standard curve generated from known molar concentrations of IL-12. The results are expressed in units of pg/ml and are shown as mean  $\pm$  standard deviation values from 5 independent experiments per experimental point (\*\*  $p < 0.01$  compared with RPMI-C negative controls from the same week)

### Evaluation of immune mediators correlated with M2 macrophage populations

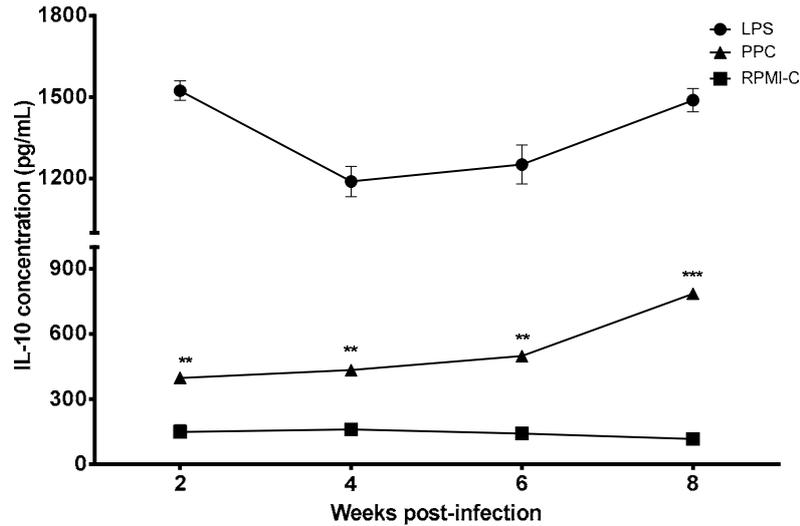
Arginase activity was assayed in lysates from peritoneal exudate cells following challenge with PPC as well as positive (LPS) and negative (RPMI-C) control lysates (Figure 4). Maximal enzyme activity was observed during the 6<sup>th</sup> week post-infection (6.6 mM urea), which was greater than in the positive control (LPS) and significantly greater ( $p < 0.001$ ) compared with the negative control from the same week; increases in enzyme activity were also observed during the 4<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> weeks post-infection (4.8 and 4.5 mM urea, respectively), which were statistically significant compared with negative controls ( $p < 0.001$  and  $p < 0.01$ , respectively).



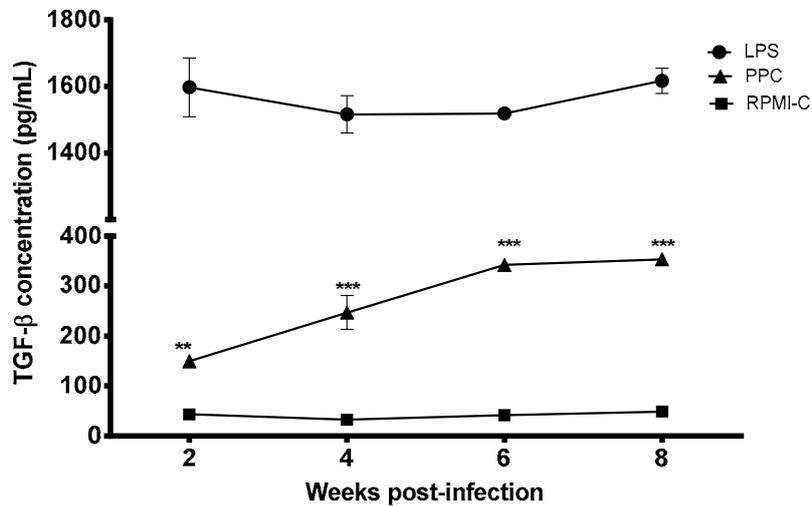
**Fig. 4 Arginase-I activity in cultures of peritoneal exudate cells from Swiss mice infected with the fungus *S. schenckii* during the 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> weeks post-infection.** Cells of infected animals were incubated for 24 h at 37 °C in the presence of cell-wall peptide-polysaccharide (PPC), LPS or RPMI-1640C alone. Enzymatic activity was defined as the amount of enzyme needed to catalyze the formation of 1  $\mu$ mol urea/min. Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation values in units of mM of urea, which were determined from triplicate experiments using 5 animals for each time point (\*\* p<0.01 and \*\*\* p<0.001 compared with the RPMI-C negative controls from the same week)

We also measured the production of the cytokines IL-10 and TGF- $\beta$  from the supernatants of adherent cells challenged with the above the stimuli. Significant increases in IL-10 production were observed compared with negative controls from the same week over the course of the infection (p<0.01 during the 8<sup>th</sup> week and p<0.001 during the 4<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> weeks), with maximal production occurring during the 8<sup>th</sup> week (786.2 pg/mL) (Figure 5).

TGF- $\beta$  production was also significantly increased over the course of the infection (p<0.01 during the 8th week and p<0.001 during the 4th and 6th weeks), with maximal production occurring during the 6th and 8th weeks post-infection (342.3 pg/mL and 353.7 pg/mL, respectively) (Figure 6).



**Fig. 5 Production of IL-10 in cultures of adherent peritoneal exudate cells from Swiss mice infected with the fungus *S. schenckii* during the 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> weeks post-infection.** Adherent cells were cultured (in triplicate) in the presence of cell wall peptide-polysaccharide (PPC), LPS or RPMI-1640C alone. The concentrations of IL-10 were calculated using a previously established standard curve generated from known molar concentrations of IL-10. The results are expressed in units of pg/ml and as mean  $\pm$  standard deviation values from 5 independent experiments per time point (\*\*  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$  compared with the RPMI-C negative controls from the same week)



**Fig. 6 Production of TGF-β in cultures of adherent peritoneal exudate cells from Swiss mice infected with the fungus *S. schenckii* during the 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> weeks post-infection.** Adherent cells were cultured (in triplicate) in the presence of cell wall peptide-polysaccharide (PPC), LPS or RPMI-1640C alone. The concentrations of TGF-β were calculated using a previously established standard curve generated from known molar concentrations of TGF-β. The results are expressed in units of pg/ml and are shown as mean  $\pm$  standard deviation values from 5 independent experiments per time point (\*\*  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$  compared with RPMI-C negative controls from the same week)

Phenotyping also demonstrated the presence of M2 macrophages over the course of the infection, which was more evident with respect to CD206<sup>+</sup> cells, whose expression increased over the course of weeks analyzed, consistent with the increased IL-10 and TGF- $\beta$  production and arginase-I activity.

## Discussion

The different clinical manifestations of sporotrichosis depend on the immune status of the host. The most severe forms of the disease are often associated with immunocompromised patients [12, 22], demonstrating that *S. schenckii* is an emerging opportunistic pathogen.

The innate immune system may be able to recognize *S. schenckii* through surface molecules located on, or molecules secreted by, this pathogen [23]. Several antigenic preparations derived from *S. schenckii* have been shown to activate the immune system and induce the production of several immune mediators when tested with *ex vivo* macrophage cultures and splenocytes from animals infected with this pathogen [24, 25]. In 2012, Sassá et al. [26] observed that macrophages (in the absence of TLR-4 signaling) increased TGF- $\beta$  production during mouse sporotrichosis, which could contribute to the abrogation of inflammatory activation of peritoneal exudate cells. Another study involving TLR-2-knockout mice demonstrated that macrophages stimulated with soluble antigens and extracted lipids from *S. schenckii* showed decreased phagocytosis and production of the mediators TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10 and IL-12 [27]. In the present study, we observed that PPC was able to efficiently activate macrophages in animals previously infected with *S. schenckii*, with a predominance of alternately activated macrophages observed during the course of infection.

Phenotyping of the PECs showed that the macrophage population expanded over the course of the infection, reaching the highest levels during the 4<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> weeks post-infection. This population expansion further reinforces the idea that macrophages are the primary cells necessary for eliminating this fungus [2]. Macrophages were active during all studied periods, although the two macrophage populations were more or less functionally active during different periods. This is the first report of the activation of M1 and M2 macrophages by *ex vivo* stimulation with PPC. We observed the presence of an M2 population, which was principally characterized by an increase in cells

expressing CD206 after infection; the same receptors we used (CD 23 and CD206) were also employed by Chan et al. [28] to evaluate M2 populations.

NO production contributes to the cytotoxicity of macrophages against different microorganisms [29], including *S. schenckii* [25, 30], although NO overproduction may suppress immunity against fungi, acting through feedback in the Th1 response and causing increased susceptibility of animals to fungal infections [30-33]. Other ways that macrophages act during the immune response include the production of several cytokines that play effector roles and help coordinate the systemic immune response, such as IL-12. This pro-inflammatory cytokine is responsible, in part, for inducing adaptive cellular responses and promoting the release of IFN- $\gamma$  by T cells [14].

Classically activated macrophages are known to produce pro-inflammatory cytokines, including high levels of IL-12, and also show marked upregulation of nitric oxide synthase (NOS2), which is associated with NO production; together, these processes aid in the destruction of pathogens. In the present study, it was observed that PPC induced IL-12 production during the 2<sup>nd</sup> and 4<sup>th</sup> weeks post-infection, which was consistent with increased NO production over the same period. In this context, increased IL-12 production during early infection demonstrates the participation of M1 macrophages during this period. The presence of this cytokine could enhance the inflammatory response against *S. schenckii* during the early stages of infection, as has been demonstrated for *Aspergillus fumigatus* [34] and *Pneumocystis carinii* [35].

On the other hand, alternatively activated macrophages have been associated with the expression of arginase I and the presence of cells expressing CD206 [36] and these authors suggest that the participation of this macrophage population may be associated with defense against *Aspergillus fumigatus*.

We analyzed arginase-I activity as well as the production of IL-10 and TFG- $\beta$ , which are associated with M2 macrophage populations. Our results show that following PPC stimulus, the production of these cytokines is increased over the entire course of infection, and these molecules may act as regulators of the inflammatory response that, otherwise, might contribute to immune evasion and establishment of infection by *S. schenckii* [37]. M2 macrophages induce arginase-I, which metabolizes arginine to ornithine and polyamines, which are necessary precursors for collagen synthesis and cellular proliferation [13]. Our results showed a peak in arginase production during the

6<sup>th</sup> week after infection and suggest that M2 macrophages become prevalent after the 4<sup>th</sup> week of infection.

In conclusion, these results indicate for the first time that M1 and M2 macrophage populations are present during sporotrichosis. These findings contribute to knowledge concerning the mechanisms involved in the innate immune response to *S. schenckii*, and they may help development more effective immunotherapies against this mycosis.

### **Acknowledgments**

The authors are grateful to Marisa Campos Polesi Placeres for technical support. This work was supported by grants from the The State of Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) (grants number 2009/06519-2 and 2009/11442-9).

### **Disclosures**

The authors have no financial conflict of interest.

### **References**

1. RAMOS-E-SILVA M, VASCONCELOS C, CARNEIRO S, CESTARI T. Sporotrichosis. *Clin Dermatol.* 2007; 25(2): 181-7.
2. CARLOS IZ, SASSÁ MF, SGARBI DBG, PLACERES MCP, MAIA DCG. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. *Mycopathologia.* 2009; 168:1-10.
3. HARDMAN S, STEPHENSON I, JENKINS DR, WISELKA MJ, JOHNSON EM. Disseminated *Sporothrix schenckii* in a patient with AIDS. *J Infect.* 2005; 51(3):e73-7.
4. GALHARDO MC, SILVA MT, LIMA MA, NUNES EP, SCHETTINI LE, DE FREITAS RF, PAES RDE A, NEVES EDE S, DO VALLE AC. *Sporothrix schenckii* meningitis in AIDS during immune reconstitution syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.*, 2010; 81(6):696-9.
5. ROMERO-CABELLO R, BONIFAZ A, ROMERO-FEREGRINO R, SÁNCHEZ CJ, LINARES Y, ZAVALA JT, ROMERO LC, ROMERO-FEREGRINO R, VEGA JT. Disseminated sporotrichosis. *BMJ Case Rep.*, 2011; doi: 10.1136/bcr.10.2010.3404.
6. LLOYD KO, BITOON MA. Isolation and purification of a peptido-rhamnomannan from the yeast form of *Sporothrix schenckii*: Structural and immunochemical studies. *J. Immunol.*, 1971; 107:663-71.

7. CASTILLO MC, TAPIA FJ, ARCINIEGAS E. Ultrastructural localization of specific surface antigens in the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*. J. Med. Vet. Mycol., 1990; 28 (1): 91-4.
8. NASCIMENTO RC, ESPÍNDOLA NM, CASTRO RA, TEIXEIRA PA, LOUREIRO Y PENHA CV, LOPES-BEZERRA LM, ALMEIDA SR. Passive immunization with monoclonal antibody against a 70-kDa putative adhesin of *Sporothrix schenckii* induces protection in murine sporotrichosis. Eur J Immunol., 2008; 38(11): 3080-9.
9. LIMA OC, FIGUEIREDO CC, PREVIATO JO, MENDONCA-PREVIATO L.; MORANDI, V.; LOPES-BEZERRA, L.M. Involvement of fungal cell wall components in adhesion of *Sporothrix schenckii* to human fibronectin. Infect Immunol, 2001; 69, 6874–80.
10. CHARLES PC, WEBER KS, CIPRIANI B, BROSNAN CF. Cytokine, chemokine and chemokine receptor mRNA expression in different strains of normal mice: implications for establishment of a Th1/Th2 bias. J Neuroimmunol. 1999; 100(1-2):64-73.
11. LOPES-BEZERRA LM, SCHUBACH A, COSTA RO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. Ann. Brazil. Acad. Sciences, 2006; 78:293-308.
12. NASCIMENTO RC, ALMEIDA SR. Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis. FEMS Immunol. Med. Microbiol, 2005; 43: 241-47.
13. GORDON S. Alternative activation of macrophages. Nat Rev Immunol, 2003; 3: 23–35.
14. MANTOVANI A, SICA A, SOZZANI S, ALLAVENA P, VECCHI A, LOCATI M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol., 2004; 25: 677–86.
15. HAO N, LU M, FAN Y, CAO Y, ZHANG Z, YANG S. Macrophages in Tumor Microenvironments and the Progression of Tumors. Clinical and Developmental Immunology. Clin Development Immunol., 2012, . doi:10.1155/2012/948098.
16. MARTINEZ FO, HELMING L, GORDON S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. Ann Rev Immunol., 2009; 27: 451–83.
17. MUNDER M, EICHMANN K, MODOLELL M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4<sup>+</sup> T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. J Immunol, 1998; 160: 5347-54.
18. LOUREIRO-PENHA CV, LOPEZ-BEZERRA LM. Concanavalin A-binding cell wall antigens of *Sporothrix schenckii*: a serological study. Med. Mycol., 2000; 38: 1-7.
19. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL; RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journ. Biol. Chemistry, 1951; 193:265-75.

20. GREEN LC, WAGNER DA, GLOGOWSKI J, SKIPPER PL, WISHNOK JS, TANNENBAUM SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 1982; 126(1), 131-38.
21. CORRALIZA IM, CAMPO ML, SOLER G, MODOLLEL M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods*, 1994; 174:231-35.
22. RODRÍGUEZ-CERDEIRA C, ARENAS R, MORENO-COUTIÑO G, VÁSQUES E, FERNÁNDEZ R, CHANG P. Systemic fungal infections in patients with human immunodeficiency virus. *Actas Dermosifilogr.*, 2012; doi10.1016/j.ad.2012.06.017.
23. BROZ P, MONACK DM. Molecular mechanisms of inflammasome activation during microbial infections. *Immunol Rev.*; 2011; 243(1):174-90.
24. CARLOS IZ, SGARBI DB, PLACERES MC. Host organism defense by a peptide-polysaccharide extracted from the fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*, 1999; 144(1): 9-14.
25. CARLOS IZ, SGARBI DB, SANTOS GC, PLACERES MC. *Sporothrix schenckii* lipid inhibits macrophage phagocytosis: involvement of nitric oxide and tumour necrosis factor-alpha. *Scand J Immunol.*; 2003; 57(3): 214-20.
26. SASSÁ, M.F.; SOUZA, L.F.; RIBEIRO, L.C.A.; CARLOS, I. Z., Immune response against *Sporothrix schenckii* in TLR-4-deficient mice. *Mycopathologia*, 2012; 174(1):21-30.
27. NEGRINI, T.C.; FERREIRA, L.S.; ALEGRANCI, P.; ARTHUR, R.A.; SUNDFELD, P.P.; MAIA, D.C., SPOLIDORIO, L.C.; CARLOS, I.Z. Role of TLR-2 and Fungal Surface Antigens on Innate Immune Response Against *Sporothrix schenckii*. *Immunol Invest.* 2013; 42(1):36-48.
28. CHAN T, PEK EA, HUTH K, ASHKAR AA. CD4<sup>+</sup> T-cells are important in regulating macrophage polarization in C57BL/6 wild-type mice. *Cellul. Immunol.*, 2011; 266:180-6.
29. KOBAYASHI Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 2010; 88(6): 1157-62.
30. MAIA DC, SASSÁ MF, PLACERES MC, CARLOS IZ. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*, 2006;161(1):11-9.
31. VAN DER VEEN RC. Nitric oxide and T helper cell immunity. *Int Immunopharmacol.* 2001; 1(8):1491-500
32. NASCIMENTO FR, CALICH VL, RODRÍGUEZ D, RUSSO M. Dual role for nitric oxide in paracoccidiodomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. *J Immunol.*, 2002;168(9):4593-600.

33. ANGULO I, JIMÉNEZ-DÍAZ MB, GARCÍA-BUSTOS JF, GARGALLO D, DE LAS HERAS FG, MUÑOZ-FERNÁNDEZ MA, FRESNO M. *Candida albicans* infection enhances immunosuppression induced by cyclophosphamide by selective priming of suppressive myeloid progenitors for NO production. *Cell Immunol.*, 2002; 218(1-2): 46-58.
34. ZHANG CR; LIN JC; XU WM; LI M; YE HS; CUI WL; LIN Q. Interleukin-12 and interleukin-2 alone or in combination against the infection in invasive pulmonary aspergillosis mouse model. *Mycoses*, 2012. doi: 10.1111/j.1439-0507.2012.02220.x.
35. RUAN S, MCKINLEY L, ZHENG M, RUDNER X, D'SOUZA A, KOLLS JK, SHELLITO JE. Interleukin-12 and host defense against murine *Pneumocystis pneumonia*. *Infect Immun.*, 2008; 76(5):2130-7.
36. BHATIA S, FEI M, YARLAGADDA M, QI Z, AKIRA S, SAIJO S, IWAKURA Y, ROOIJEN N, GIBSON GA, ST CROIX CM, RAY A, RAY P. Rapid Host Defense against *Aspergillus fumigatus* Involves Alveolar Macrophages with a Predominance of Alternatively Activated Phenotype. *PLoS One.*, 2011; 6(1): e15943.
37. ROMANI L, PUC CETTI P. Protective tolerance to fungi: the role of IL-10 and tryptophan catabolism. *Trends Microbiol.* 2006; 4(4):183-9.