



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS**

DANIELLE CARDOSO GERALDO MAIA

**DICOTOMIA Th1/Th2: PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO E CITOCINAS
NA ESPOROTRICOSE**

**TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ANÁLISES
CLÍNICAS
ÁREA DE ANÁLISES CLÍNICAS**

Orientadora: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

**ARARAQUARA
2005**

Ficha Catalográfica
Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNESP – Campus de Araraquara

M217d Maia, Danielle Cardoso Geraldo
 Dicotomia Th1/Th2: papel do óxido nítrico e citocinas na esporotricose. /
 Danielle Cardoso Geraldo Maia. – Araraquara, 2005.
 160 f.

 Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita
 Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação
 em Análises Clínicas

 Orientador: Iracilda Zeppone Carlos

. 1. Óxido nítrico. 2. Citocinas. 3. Esporotricose. I. Carlos, Iracilda
 Zeppone, orient. .II. Título.

CDD: 615.37

CAPES:40300005

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP Araraquara. Recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Processo 04/10031-1.

" Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados,
capacita os escolhidos.
Fazer ou não fazer é algo que só depende de nossa
vontade e perseverança."

Albert Einstein

Dedico

À minha família (Pai, Mãe, Junior, Odette, Edemur, Rosana)

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

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

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

Jesus Cristo

Ao Ricardo

Por estar sempre presente ao meu lado me apoiando, me
incentivando, me dando força para ir adiante, apesar das
dificuldades e saudade, buscando sempre a conquista dos meus
ideais.

A Deus

Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.

As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos
auxiliam muito.

Ilumine sempre o meu caminho.

À Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

Pelos ensinamentos e confiança que sempre depositou em mim.

Meu muito obrigado pelos anos de convivência e exemplo.

Agradecimentos

Aos meus queridos amigos “pontas firmes” Patrícia F. Andreotti, Luis Gustavo S. Monnazzi e Juliana L. M. da Silva pela amizade e alegria sempre presente. Agradeço por estarem sempre ao meu lado.

Ponta que é ponta agüenta firme e acha graça.

As queridas amigas Lílian C. Baeza, Tirene Pavanelli e Eliana R. C. Godoy.

Obrigada pela amizade, pelos papos e risadas.

A minha querida amiga Marisa C. P. Placeres pelos ótimos anos de convivência, valiosas ajudas e amizade a qualquer momento.

Aos “amigos” da Micologia: Rosângela A. M. Silva, Elaine M. Toscano, Marisa F. Almeida, Marcelo Matsumoto e Fabiana Donofrio.

Obrigada pela amizade e diversão sempre presente e pelas “boquinhas” também!

Às minhas queridas amigas da imuno: Michelle C. da Rocha, Fernanda P. Benzatti, Flávia C. M. Lopes, Micheli F. Sassá, Márcia F. Marques e Fernanda L. Kinouchi pela preciosa ajuda nos experimentos e no decorrer do meu trabalho.

Agradeço a amizade e a ótima convivência.

Às amigas Ana Paula Munhoz e Ângela Mikawa pela amizade sempre presente.

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

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
I. INTRODUÇÃO	1
II. OBJETIVOS	27
III. MATERIAIS E MÉTODOS	
1. Fluxograma de execução dos experimentos	28
2. Microorganismo e condições de cultivo	29
3. Obtenção do exoantígeno	29
4. Animais de experimentação	30
5. Infecção dos animais	30
6. Obtenção das células do exsudato peritoneal	31
6.1.Obtenção dos sobrenadantes das culturas de células peritoneais	32
7. Obtenção dos linfonodos totais	33
7.1.Obtenção do sobrenadante das células dos linfonodos totais	34
8. Avaliação da viabilidade celular dos macrófagos	34
9. Determinação da atividade da óxido nítrico sintase (iNOS)	35
10. Determinação da produção de óxido nítrico	36
11. Determinação da liberação de citocinas	37
12. Transformação linfocitária (teste “in vitro”)	38
13. Detecção de anticorpos IgG durante o período de infecção	39
IV. RESULTADOS	41
V. DISCUSSÃO	80
VI. CONCLUSÕES	104
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
VIII. ANEXO I – TABELAS	139
IX. ANEXO II	152

LISTA DE TABELAS E QUADRO

Tabela 1- Valores de viabilidade celular.

Tabela 2- Valores de liberação de iNOS (pmol/min).

Tabela 3- Valores de liberação de NO ($\mu\text{mols}/5 \times 10^5$ células).

Tabela 4- Valores de liberação de IL-1 β (em pg/mL).

Tabela 5- Valores de liberação de TNF- α (em pg/mL).

Tabela 6- Valores de liberação de IL-12 (em pg/mL).

Tabela 7- Valores de liberação de IFN- γ (em pg/mL).

Tabela 8- Valores de liberação de IL-2 (em pg/mL).

Tabela 9- Valores de valores de proliferação linfocitária (CPM).

Tabela 10- Valores de liberação de IL-6 (em pg/mL).

Tabela 11- Valores de liberação de IL-10 (em pg/mL).

Tabela 12- Valores de liberação de IL-4 (em pg/mL).

Tabela 13- Valores de detecção de anticorpos IgG.

Quadro 1 - Representação dos resultados observados na esporotricose experimental

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1- Viabilidade das células do exsudato peritoneal (PEC) de camundongos Swiss normais e infectados com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas.
- FIGURA 2- Produção de iNOS por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss normais e infectados com o fungo *S.schenckii* durante dez semanas.
- FIGURA 3- Produção de NO por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss normais e infectados com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas.
- FIGURA 4- Produção de IL-1 β liberada nos sobrenadantes de cultura de Macrófagos peritoneais de camundongos Swiss normais e infectados com *S.schenckii* durante dez semanas.
- FIGURA 5- Produção de TNF- α liberada nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss normais e infectados com *S. schenckii* durante dez semanas.
- FIGURA 6- Produção de IL-12 liberada nos sobrenadantes de cultura de Macrófago peritoneais de camundongos Swiss normais e infectados com *S. schenckii* durante dez semanas.
- FIGURA 7- Produção de IFN- γ liberada nos sobrenadantes de cultura de células de linfonodos totais de camundongos Swiss normais e infectados com *S. schenckii* durante dez semanas.
- FIGURA 8- Produção de IL-2 liberada nos sobrenadantes de cultura de células de linfonodos totais de camundongos Swiss normais e infectados com *S. schenckii* durante dez semanas.

- FIGURA 9-** Determinação da transformação linfocitária liberada nos sobrenadantes de cultura de células de linfonodos totais de camundongos Swiss normais e infectados com *S.schenckii* durante dez semanas.
- FIGURA 10-** Produção de IL-6 liberada nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss normais e infectados com *S. schenckii* durante dez semanas.
- FIGURA 11-** Produção de IL-10 liberada nos sobrenadantes de cultura de células de linfonodos totais de camundongos Swiss normais e infectados com *S. schenckii* durante dez semanas.
- FIGURA 12-** Produção de IL-4 liberada nos sobrenadantes de cultura de células de linfonodos totais de camundongos Swiss normais e infectados com *S. schenckii* durante dez semanas.
- FIGURA 13-** Detecção de anticorpos IgG de soros obtidos de camundongos Swiss normais e infectados com *S. schenckii* durante dez semanas.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AG	Aminoguanidina
BHI	Brain heart infusion
BSA	Soro albumina bovina
°C	Graus Celsius
CO ₂	Dióxido de Carbono
Con A	Concanavalina A
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ExoAg	Exoantígeno do fungo <i>Sporothrix schenckii</i>
Hepes	N-2-hydroxietilpiperazina-N'-2-ácido etano sulfônico
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IFN- γ	Interferon gama
L-NMMA	N ^G -monometil L-arginina
L-NAME	N ^W -nitro-L-arginina metil éster
LPS	Lipopolissacarídeo
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
MAF	Fator ativador de macrófagos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NaOH	Hidróxido de sódio
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NIL	N ⁶ -(1-iminoetil)-L-lisina
ng	Nanogramas
NK	Natural Killer
nmols	Nanomols
NO	Óxido nítrico

PEC	Células do exsudato peritoneal
PBS	Solução salina tamponada de fosfatos
pg	Picogramas
pmol	Picomol
RNI	Intermediários reativos do nitrogênio
ROI	Intermediários reativos do oxigênio
rpm	Rotação por minuto
SD	Desvio padrão
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Th	Linfócito T helper
UV	Ultra-violeta
μ mols	Micromols

RESUMO

A esporotricose é uma infecção micótica provocada pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenckii*, causando em geral lesões subcutâneas nodulares e/ou ulcerativas que se proliferam via linfática, porém em raros casos pode provocar infecção sistêmica. O óxido nítrico (NO) é sintetizado através da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em macrófagos ativados. Por outro lado, as citocinas exercem papel importante em todo o processo de ativação das células T e pode influenciar diretamente na resposta imunológica, juntamente com os compostos intermediários do nitrogênio. Para melhor avaliar a inter-relação entre as respostas inata, adaptativa, celular e humoral esse trabalho analisou vários mediadores como a iNOS (arginina marcada por trício), NO (teste de Griess), citocinas (teste imunoenzimático), transformação linfocitária (incorporação da timidina triciada) e detecção de IgG (teste imunoenzimático). Observou-se que o NO produzido a partir da iNOS causou uma imunossupressão entre a quarta e sexta semana de infecção, levando a uma depressão na produção de algumas citocinas como a IL-1 β e o TNF- α , além de inibir a proliferação das células T nas mesmas semanas. A IL-12 como o IFN- γ são importantes mediadores da resposta imune celular tipo Th1 e em conjunto com a IL-2 parecem ser produzidos como uma tentativa de proteção do hospedeiro contra a doença. Por outro lado, a IL-10 parece estar relacionada com a suscetibilidade à infecção. Para reverter esse quadro da doença fúngica a IL-6 e a IL-4 podem vir a induzir uma resposta humoral verificada pela produção de anticorpos nas semanas finais da infecção e por fim, levar a remissão da infecção experimental por *S. schenckii*.

Palavra chave: Óxido nítrico, citocinas e *Sporothrix schenckii*

ABSTRACT

Sporotrichosis is a mycotic infection disease caused by dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*, causing in general subcutaneous nodules and/or ulcerative lesions that proliferate through lymphatic vessels, however in rare cases systemic can provoke infection. The nitric oxide (NO) is synthesized through of the enzyme nitric oxide synthase inducible (iNOS) in activated macrophages. On the other hand, the cytokines exert important role in all the process of activation of cells T and can to influence directly in the immunological response, together with intermediate complexes of nitrogen. The evaluation between the innate, adaptive, cellular and humoral response this work were analyzed several mediators as iNOS (arginine H^3), NO (Griess reagent), cytokines (immunoenzymatic assay), lymphatic transformation (incorporation of thymidine- H^3) and detection of IgG (immunoenzymatic assay). We observed that NO the produced from iNOS caused an immunosuppression between the fourth and sixth week of infection leading to a depression in the production of some cytokines as the IL-1 β and TNF- α , besides inhibiting the proliferation of cells T in the same weeks. The IL-12 as the IFN- γ is important mediators of the cellular Th1 response and together with IL-2 seem to being produced as a protection host attempt against the disease. On the other hand, the IL-10 seems to be related with the susceptibility to the infection. To revert this immunological response IL-6 and IL-4 can come to induce an humoral response verified by the antibodies production in the infection final weeks and finally, lead the experimental infection remission by *S. schenckii*.

Key word: Nitric oxide, cytokines and *Sporothrix schenckii*

I. INTRODUÇÃO

1.1 ESPOROTRICOSE

A esporotricose é uma doença de distribuição mundial, sendo mais comum nas regiões de clima temperado e tropical. A maioria dos casos é encontrada no México, América Central e América do Sul (PAPPAS et al., 2000; DE ARAUJO et al., 2001). Atualmente, o Japão e a América do Norte são também considerados áreas endêmicas (BARROS et al., 2004).

É provocada pelo fungo *Sporothrix schenckii* (*S. schenckii*), um fungo dimórfico, pertencente à classe dos *Hyphomycetes*, presente na natureza como bolor, na forma miceliar, constituído de hifas septadas, hialinas, com conídios lateralmente na hifa ou em grupos no final de conidióforos. Quando se desenvolve a 37°C, *in vitro* ou em tecidos, cresce na forma de levedura, em muitos casos redondas, ovais ou em forma de charuto e se reproduz por brotamento (GORI et al., 1997; MENDEZ-TOVAR et al., 2004).

O habitat natural do fungo *S. schenckii* são plantas, arbustos, solo, materiais sob condições ambientais adequadas de temperatura e umidade, representando os principais reservatórios. A doença afeta pessoas de qualquer idade, sexo ou raça e não precisa de fatores pré-disponíveis para se desenvolver, porém é mais comum em homens

adultos, devido a sua exposição ocupacional e recreacional. As pessoas mais suscetíveis são aquelas ligadas a certas ocupações como fazendeiros, jardineiros, floristas, horticultores, mineradores e outros profissionais em contato com o solo e plantas (MATTER et al., 1984; DIAS, 1989; BELKNAP, 1989; NEYRA et al., 2005).

A infecção é adquirida através da implantação cutânea, em geral através de pequenos traumas com materiais contaminados com matéria orgânica do solo, através de ferimentos causados por fragmentos de vidro, pedras, vegetação, espinhos de roseira, ferimentos com feno contaminado. A transmissão zoonótica também tem sido relatada, através de picadas ou arranhões de animais contaminados (como roedores, peixes, pássaros, insetos, répteis). O período de incubação varia de 3 dias a 12 semanas, com média de 3 semanas (BELKNAP, 1989; LOPES et al., 1992; KAJIWARA et al., 2004).

Ocasionalmente, há relatos da transmissão da esporotricose felina para o homem. Profissionais como veterinários, técnicos e, sobretudo os donos dos gatos estão mais expostos em adquirir a micose. O potencial zoonótico da esporotricose felina foi considerado nos anos 80. A maioria desses casos é relatada em áreas de condições socioeconômicas desfavoráveis das grandes cidades (BARROS et al., 2001; BARROS et al., 2004).

Mais raramente, o fungo pode ser inalado, aspirado ou ingerido, produzindo infecção sistêmica em indivíduos suscetíveis (RIPON, 1982; MATTER et al., 1984; BELKNAP, 1989; LOPES et al., 1992).

A localização mais freqüente da esporotricose é a pele e tecidos subcutâneos, podendo se limitar ao local de inoculação do fungo ou se espalhar pelo sistema linfático. No início da infecção, as lesões aparecem como uma pápula que gradativamente aumenta tornando-se nodular e freqüentemente ulcera (KAUFMANN, 1999; LYON et al., 2003).

As diferentes formas clínicas descritas para essa micose subcutânea são produzidas de acordo com o estado imunológico do hospedeiro. A capacidade da resposta imune celular do hospedeiro determina o grau de invasão pelo fungo patogênico (ALBORNOZ et al., 1986). As formas mais graves da esporotricose, recentemente, têm sido associadas a pacientes imunocomprometidos, como aqueles infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), sugerindo que o *S. schenckii* é um patógeno oportunista emergente (AL-TAWFIQ & WOOL, 1998; GORI et al., 1997; DE ARAÚJO et al., 2001; NASCIMENTO et al.; 2005).

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

extracelulares como as fosfatases ácidas, produzidas pelo fungo, parecem desempenhar papel importante na interação das células leveduriformes de *S. schenckii* com os macrófagos (HOGAN et al., 1996; NASCIMENTO et al., 2005).

No fungo *S. schenckii*, a forma leveduriforme possui uma fina camada de complexo peptídico-polissacarídeo na superfície celular (ALVIANO et al., 1982). Em relação à composição dos antígenos do *S. schenckii*, o peptídeo-polissacarídeo é composto de polissacarídeo constituído de ramnose, manose, galactose. A ramnose desempenha um papel importante na reação do tipo imediata, enquanto que a porção peptídica está envolvida nas reações tardias (SHIMONAKA et al., 1975). O peptídeo-ramnomanana, isolado da forma leveduriforme do fungo, pode estar envolvido na virulência do fungo (LLOYD & BITTON, 1971; CARLOS et al., 1999). A fagocitose das células leveduriformes pelos macrófagos peritoneais é inibida *in vitro* pela galactomanana e ramnomanana purificadas da superfície celular do *S. schenckii* (ODA et al., 1983).

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

O componente lipídico da parede celular desempenha um papel importante na patogênese desta micose inibindo o processo fagocítico

através da elevada liberação de óxido nítrico (NO) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em culturas de macrófagos (CARLOS et al., 2003).

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

Muito pouco é conhecido sobre as interações moleculares do *S. schenckii* com a superfície das células do hospedeiro. Recentes estudos demonstraram que o fungo é capaz de se prender a várias proteínas da matriz extracelular como a fibronectina, laminina e colágeno do tipo II (FIGUEIREDO et al., 2004).

A produção de melanina ou de produtos relacionados à melanina pelo fungo parece também estar relacionada à sua infectividade. As cepas produtoras de melanina mostraram-se menos suscetíveis à ação de intermediários de nitrogênio e oxigênio do que as cepas não produtoras de melanina (ROMERO-MARTINEZ et al., 2000; MORRIS-JONES et al., 2003).

Os antígenos da superfície celular do fungo *S. schenckii*, presentes tanto na fase micelar quanto na leveduriforme, induzem a produção de anticorpos (CASTILLO et al., 1990).

Os exoantígenos do fungo *S. schenckii* são antígenos celulares liberados no meio de cultura e que podem estar relacionados à resposta imune gerada na infecção fúngica (POLONELLI & MORACE, 1982). Em estudos realizados por CARLOS et al., 1992, a resposta ao antígeno solúvel de *S. schenckii* foi avaliada em camundongos com infecção esporotricótica sistêmica. A via de entrada do fungo e a profundidade de inoculação do mesmo podem estar relacionadas à infectividade do *S. schenckii* (TACHIBANA et al., 1998).

A infecção experimental pode ser facilmente induzida em camundongos pela injeção intraperitoneal ou intratesticular de células leveduriformes. Dentro de 10 dias desenvolve-se peritonite ou orquite grave. A doença pode se disseminar produzindo lesões destrutivas nos ossos e outros órgãos, levando à morte, geralmente dentro de três a quatro semanas (RIPPON, 1982; RESTREPO-GUTIERREZ et al., 1993).

Os macrófagos desempenham um importante papel no sistema imune como célula apresentadora de antígeno. São os primeiros a reconhecer o invasor e produzir uma variedade de moléculas efetoras, incluindo TNF- α , IL-1, IL-6 e NO (SORIMACHI et al., 1999).

Em modelo experimental utilizando camundongos temos desenvolvido uma infecção sistêmica com a inoculação intraperitoneal do fungo *S. schenckii*. A reação de hipersensibilidade tardia (*in vivo*) e o teste de transformação linfocitária (*in vitro*) mostraram que a resposta imune celular desses animais está deprimida entre a 4^a e a 6^a semanas de

infecção, quando as células do baço destes animais foram estimuladas com um antígeno solúvel obtido a partir do fungo em sua forma leveduriforme (CARLOS et al., 1994). Neste período também se pôde observar um aumento na multiplicação fúngica no fígado e baço dos camundongos infectados. Essa depressão na imunidade freqüentemente indica um agravamento da infecção, com maior comprometimento do hospedeiro (CARLOS et al., 1992, CARLOS et al., 1999). Esta deficiência na imunidade celular em camundongos infectados pelo *S. schenckii* pode em parte, ser devida à geração anormal de interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) pelos macrófagos ativados, prejudicando assim a amplificação da resposta imune (CARLOS et al., 1994).

A eliminação de microrganismos por macrófagos depende da fagocitose e da liberação de agentes tóxicos, tais como compostos intermediários do oxigênio e nitrogênio e considerando o papel desempenhado pelas citocinas em toda a resposta imunológica, nosso laboratório tem demonstrado que o composto lipídico extraído da parede celular de *S. schenckii* inibiu completamente a fagocitose apresentada por macrófagos peritoneais, e todo esse processo de inibição está intimamente relacionado com NO e a citocina TNF- α (CARLOS et al., 2003).

1.2 SISTEMA IMUNOLÓGICO E ÓXIDO NÍTRICO

O sistema imunológico é um notável sistema de adaptação para defesa que evoluiu nos vertebrados para protegê-los de microorganismos patogênicos invasores. É capaz de gerar um grande número de células e moléculas que podem especificamente ou inespecificamente eliminar uma variedade aparentemente ilimitada de agentes invasores. Essas células e moléculas agem em conjunto proporcionando uma rede dinâmica primorosamente adaptável (GOLDSBY et al., 2000; CHARALAMPOS et al., 2005). Entre elas destacam-se neutrófilos, macrófagos, monócitos com papel essencial na atividade fagocítica e apresentadora de antígeno. (HUFFNAGLE et al., 2003; McCORMACK et al., 2003; ROMANI, 2004).

Os macrófagos desempenham importante papel na resposta imune, seja por atuarem como células apresentadoras de antígenos ou por produzirem e liberarem mediadores inflamatórios e quimiotáticos. Também atuam como primeira linha de defesa do hospedeiro pela liberação de um grande número de fatores, incluindo os intermediários reativos do nitrogênio, como o NO, um potente mediador das respostas imune e inflamatória (HIBBS et al., 1988; JOHNSTON, 1988; LASKIN et al., 1994).

As células dendríticas, altamente especializadas, capturam e processam os antígenos, expressam moléculas co-estimuladoras para os linfócitos, migram para os órgãos linfóides e secretam citocinas para iniciar a resposta imune. São consideradas as principais células apresentadoras

de antígenos e desempenham papel crucial na iniciação da resposta imune primária. Na esporotricose, as células dendríticas podem desempenhar um papel fundamental na resposta imune, através da produção de IL-12, direcionando uma resposta do tipo Th1 (BANCHEREAU e STEINMAM, 1998; KOGA et al., 2001).

A seqüência clássica de diferenciação do sistema mononuclear fagocitário segue de promoblasto para monoblasto, promonócito, monócito e macrófago maduro. Todos esses tipos morfológicos são encontrados na medula óssea, sendo que os monócitos são liberados na corrente sangüínea e, então, se disseminam para todos os tecidos (ZWILLING & EISENSTEIN, 1994).

Uma vez ativados, os macrófagos se caracterizam por um rápido aumento no metabolismo, motilidade e atividade fagocítica, podendo desempenhar funções paralelas além da fagocitose. Essas células também secretam mais de cem produtos, dentre eles, enzimas, componentes do complemento, fatores de coagulação e citocinas (PARSLOW et al., 2000; ROITT et al., 2001).

Em várias doenças fúngicas muitos fatores podem regular a resistência e a suscetibilidade. A dose do antígeno, as células apresentadoras de antígenos e a coestimulação do meio ambiente são alguns cofatores que irão determinar a polarização da resposta imune a ser ativada (BRETSCHER et al., 1992). A natureza do antígeno e o sítio de imunização podem levar a sua apresentação por distintas células apresentadoras de antígenos (FERREIRA et al., 2003).

A interação entre as células apresentadoras de antígenos com os patógenos de natureza fúngica é fundamental para desencadear o tipo de resposta imune. Evidências recentes sugerem que a resposta do hospedeiro contra fungo patogênico pode ser influenciada pelo tipo celular envolvido e pelo perfil de produção de citocinas (BALLOY et al., 2005; CHARALAMPOS et al., 2005). A fagocitose de microorganismos fúngicos aumenta a expressão de dectina-1 nos macrófagos murinos, que é o maior receptor para as β -glucanas da parede celular fúngica (WILLMENT et al., 2003).

Alguns aspectos da fisiologia dos macrófagos são influenciados de alguma forma pelo lipopolissacarídeo (LPS), um produto das bactérias gram-negativas. O LPS induz aumento do consumo de glicose e oxigênio e a célula adquire a capacidade de matar microorganismos e células tumorais. Os macrófagos também desenvolvem um mecanismo refinado para reconhecer o LPS no ambiente e, portanto, é um dos mais potentes estimuladores de macrófagos (ZWILLING & EISENTEIN, 1994).

Os compostos intermediários do nitrogênio (RNI) e do oxigênio (ROI) representam dois importantes mediadores da atividade microbicida e antitumoral dos macrófagos (XIE et al., 1997), contribuindo para a resposta inespecífica do hospedeiro e para o processo inflamatório. Tanto os ROI como os RNI, atuam na sinalização e regulação da resposta inflamatória e imune das doenças infecciosas e fúngicas (BALISH et al., 2005).

O óxido nítrico é produzido por células do sistema imune como as células dendríticas, células NK, mastócitos e macrófagos (BOGDAN, 2001).

Durante o final da década de 80 e início de 90, importantes conhecimentos sobre o NO foram descobertos, sua característica de molécula mensageira (sinalizador inter e intracelular) e como toxina atuando em inúmeros processos patológicos (FLORA FILHO e ZILBERSTEIN, 2000).

O NO é uma molécula gasosa simples, habitualmente encontrada no ar atmosférico em pequenas quantidades, altamente tóxica devido a presença de radical livre que a torna um agente químico altamente reativo. Quando diluído, tem meia vida de menos de 10 segundos devido a sua rápida oxidação a nitrato e nitrito. Liga-se à hemoglobina e outras proteínas que contêm o núcleo heme levando ao término de sua atividade biológica (SNYDER & BREDET, 1992).

Essa pequena e versátil molécula é formada através da oxidação do átomo de nitrogênio do aminoácido L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) e, logo em seguida, se transforma em nitrito (NO_2^-) (MYERS et al., 2003).

A L-arginina é um aminoácido semi-essencial produzido no organismo, porém em quantidades insuficientes. A arginina é utilizada na síntese de creatinina e fornece a ornitina para a síntese de poliaminas (KONTUREK & KONTUREK, 1995).

Proteínas digeridas são degradadas até arginina, podendo ser diretamente absorvidas e utilizadas no ciclo da uréia no tecido hepático, ou transformadas no epitélio intestinal em ornitina, que juntamente com a glutamina são convertidas em citrulina (STUEHR et al., 1991). A citrulina pode ser convertida diretamente em L-arginina no citoplasma das células endoteliais e dos macrófagos (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000).

O NO está envolvido em numerosos processos homeostáticos como regulação do tônus vascular, modulação da citotoxicidade por macrófagos ativados, regulação da proliferação celular, regulação da migração celular, ativação de fatores de transcrição, indução de genes sítio protetores, modulação da produção de citocinas tóxicas e neurotransmissão no sistema nervoso central e periférico (NATHAN et al., 1992).

Em 1991, o primeiro estudo sobre as isoformas de NOS foi publicado por Förstermann (FÖRSTERMANN et al., 1991). Três isoenzimas foram descritas como responsáveis pela produção de NO baseado nos três diferentes genes que foram clonados e seqüenciados, na localização e na sensibilidade à estimulação pelo cálcio: duas isoformas de óxido nítrico sintase constitutivas denominadas de neuronal (nNOS ou NOS I) e endotelial (eNOS ou NOS III) e uma induzível (iNOS ou NOS II) (KIECHLE & MALINSKI, 1993; GILLMAN et al., 2004).

A clonagem molecular revelou que essas isoformas compartilham 50-60% de homologia, sendo que cada isoforma de NOS é codificada por um gene distinto contendo 26 exons (iNOS e eNOS) ou 29

exons (nNOS). Sabe-se ainda que a porção terminal da proteína NOS é semelhante à citocromo P450 redutase (HOBBS *et al.*, 1999).

A expressão da iNOS é regulada principalmente por citocinas. A ativação do gene promotor de iNOS é um importante modo da regulação dessa isoenzima pelas citocinas principalmente em macrófagos murinos (BOGDAN, 2001). Dependendo da citocina, estímulo microbiano e tipo celular, diferentes caminhos de sinalização estão envolvidos em promover ou inibir a expressão de iNOS (KRISTOF *et al.*, 2001).

A NOS II também pode ser regulada positivamente ou negativamente por contato célula-célula (via adesão ou por moléculas coestimulatórias), imunocomplexos, produtos microbianos e virais (proteínas, lipídios, polissacarídeos), poliaminas, ligantes não férricos, pH e vários antibióticos (MACMICING *et al.*, 1997).

No sistema imune o NO interfere em vários processos como o de diferenciação, proliferação e apoptose de células imunológicas, na produção de citocinas e outros mediadores solúveis além da síntese de componentes da matriz extracelular (MARSHALL *et al.*, 2000; BOGDAN *et al.*, 2001).

A exposição prolongada a grandes quantidades de NO, como na ativação da iNOS, inibe a atividade de várias enzimas, como a aconitase, citocromo C oxidase e ribonucleotídeo redutase. Assim o NO pode se tornar citotóxico ou citoestático. Contudo um controle apropriado da homeostase do NO faz com que esse mediador seja um sinal útil em certo

evento fisiológico ou, por outro lado, seja citotóxico devido a uma geração excessiva (ACHIKE & KWAN, 2003).

O NO pode inibir a secreção de citocinas inflamatórias como IFN- γ (interferon- γ) e IL-2 das células T (OKUDA et al., 1996). Um alto nível de NO via iNOS pode destruir não somente os tecidos adjacentes mas também infiltrados de macrófagos ou células T na lesão inflamatória e causar morte apoptótica dessas células inflamatórias, o que é considerado benéfico para eliminar células desnecessárias prevenindo a liberação do conteúdo intracelular, potencialmente tóxicos ao meio extracelular (ALBINA et al., 1993, OKUDA et al., 1996). As alterações produzidas pelo NO podem ser confirmadas pela prevenção dos efeitos da ativação celular em meio restrito de arginina ou em meio contendo um inibidor da NO sintetase, como N^G-monometil L-arginina (L-NMMA), ou aminoguanidina (AG) e N⁶-(1-iminoetil)-L-lisina (NIL) (BRYK & WOLF, 1998)

Contrastando com os outros dois tipos de isoformas, a iNOS possui seqüência alvo de membrana específica, confirmada em macrófagos murinos. A expressão da enzima pode em alguns casos ser protetora, como mostra a supressão mediada por iNOS (KOZUKA et al., 2005). A iNOS é imunoreativa especialmente, em áreas inflamatórias (FÖRSTERMANN et al., 1995). A seqüência de aminoácidos da enzima murina mostra um sítio de ligação para calmodulina apesar da independência de Ca²⁺ para sua atividade (CHO et al., 1992; GOPINATH et al., 2005).

Os efeitos citotóxicos do NO são importantes para a defesa inespecífica do hospedeiro em relação a inúmeros patógenos, incluindo bactérias, fungos, parasitas e protozoários (GREEN et al., 2000). O papel do NO é bem conhecido durante a resposta imune antiparasitária, porém a expressão do óxido nítrico sintase durante a eliminação do patógeno é controversa (VOULDOUKIS et al., 1995).

A indução da transcrição da iNOS é feita pelas citocinas derivadas das células T. As citocinas de padrão Th1, como o IFN- γ e IL-2, regulam positivamente o NO, enquanto que a regulação negativa é feita pela IL-4 e IL-10, citocinas de perfil Th2 (CUNHA et al., 1992; TAYLOR-ROBINSON et al., 1994).

As células Th1 parecem ser mais suscetíveis ao mecanismo regulador do NO que as células Th2 (TAYLOR-ROBINSON et al., 1994). No foco inflamatório os macrófagos são ativados e expressam iNOS, levando a altos níveis de produção de NO, que parecem atuar como um mecanismo efetor (BRÜNE et al., 1998). A indução da iNOS é uma resposta efetora importante de defesa do hospedeiro contra patógenos e tumores (COX et al., 1992, GREEN et al., 1994).

1.3. Perfil Th1/Th2 e Citocinas

A resposta efetiva contra organismos fúngicos requer a contribuição coordenada da imunidade inata e adaptativa. A imunidade

inata consiste de um mecanismo protetor desenvolvido inicialmente que se mantém durante a evolução dos organismos multicelulares. Assim, uma atividade efetora antifúngica é formada com o papel de coordenar às células da imunidade adaptativa por meio da apresentação de antígenos, como também, a produção de mediadores como as citocinas (CHARALAMPOS et al., 2005).

Os linfócitos são as únicas células do organismo com capacidade de reconhecer e distinguir especificamente diferentes determinantes antigênicos, possibilitando o desenvolvimento de subclasses dessas células. Funcionam como reguladores da resposta imune a antígenos protéicos e servem como células efetoras para eliminar microorganismos extracelulares e células neoplásicas. Os receptores das células T (TCR) reconhecem apenas antígenos peptídicos ligados a proteínas codificadas por genes do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) expressa pelas células apresentadoras de antígenos (JANKOVIC et al., 2001).

O sistema imune inato fornece sinais para a ativação do sistema imune adaptativo, que induz a diferenciação dos linfócitos em diferentes fenótipos com ações efetoras ou de memória. Os fenótipos Th1/Th2 refletem o resultado da ativação das células T naive (NOBEN-TRAUTH et al., 2000).

As células T “helper” tipo 1 e T “helper” tipo 2 se referem aos subtipos de células T CD4+ TCR $\alpha\beta$ dependente do estímulo efetor dominante (O’GARRA & ARAI, 2000).

Os clones Th se diferenciam em duas categorias dependentes da citocina produzida. As Th1 produzem IFN- γ , IL-2, TNF- α , e são eficientes na eliminação de patógenos intracelulares, via ativação de macrófagos. As células Th2 liberam IL-4, IL5, IL-6, IL-10, que ativam a imunidade humoral e são secretadas de maneira acentuada na presença de antígenos persistentes (RENGARAJAN et al., 2000). As células Th3, descobertas posteriormente, produzem elevados níveis de fator de crescimento transformante beta (TGF- β), uma citocina imunossupressora que também pode inibir a secreção de células Th1, com quantidades variáveis de IL-4 e IL-10 (WANG et al., 2003).

As citocinas são mediadores solúveis liberados por linfócitos e células do sistema fagocitário, essenciais na comunicação intracelular e em muitos processos fisiológicos e patofisiológicos. Elas também modulam a inflamação e a imunidade regulando o crescimento e a diferenciação de leucócitos e também de células não leucocitárias (OPPENHEIM et al., 1994).

A produção de citocinas é normalmente transitória e rigorosamente controlada. As citocinas atuam através da ligação a receptores específicos na membrana celular, estabelecendo uma cascata

que leva a indução, ao favorecimento ou a inibição de inúmeros genes citocina-regulados no núcleo celular (ABBAS et al., 2000).

O efeito das citocinas em células alvo pode ser inibido ou estimulado por outras citocinas. Várias delas agem de diferentes maneiras na evolução e resolução da resposta inflamatória (KUSHNER, 1998).

Uma gama de citocinas está envolvida na resposta imune contra patógenos fúngicos, entre elas, IL-1, IL-6, IL-10 e TNF- α . Algumas citocinas como a IL-12 e IL-10 apresentam importante papel no desenvolvimento das células T “helper” e na resposta inata. (ROMANI, 2004; HUFFNAGLE et al., 2003; MENCACCI et al., 2000). Após o estímulo, monócitos/macrófagos começam a secretar IL-1 e IL-12, principalmente. A IL-12 ativa linfócitos Th1 que voltam a secretar IL-2, fator de necrose tumoral- β (TNF- β), IFN- γ (KOVALOVSKY et al., 2000).

A IL-1 potencializa as respostas dos timócitos como co-estimuladores para ativação das células T. Embora regule positivamente a resposta do hospedeiro e funcione como adjuvante, ela é a maior citocina pró-inflamatória (O’NEILL et al., 2000).

A produção de IL-1 por fagócitos mononucleares é induzida por produtos bacterianos como o LPS e por outras citocinas como o TNF- α . Tal como o TNF- α , a IL-1 também é produzida por muitos outros tipos celulares. Os efeitos biológicos da IL-1 são similares aos do TNF- α e dependem da quantidade de citocina produzida (DINARELLO, 2000).

Existem duas formas de IL-1, denominadas IL-1 α e IL-1 β , que têm homologia de menos de 30% entre si, mas se ligam ao mesmo receptor celular e medeiam as mesmas atividades imunológicas. Também atuam como pirogênio endógeno (DINARELLO, 1997).

Diante de infecções crônicas, foi descrita uma molécula chamada de caquexina, responsável pela perda de peso dos pacientes. Enquanto o TNF- α por sua vez, foi caracterizado como o responsável pela necrose hemorrágica em tumores. Em 1985, Butler e colaboradores descobriram se tratar da mesma molécula. O TNF- α tem sua ação biológica regulada em função da quantidade que é produzida. Em pequenas quantidades atua como um regulador parácrino e autócrino de leucócitos e células endoteliais. Porém, em maiores quantidades, passa a exercer ação sistêmica atuando de forma endócrina, podendo atingir concentrações externas contribuindo para efeitos letais (EIGLER et al., 1997). Uma das vias sinalizadoras se dá através do NO que regula sua expressão principalmente por reduzir sua meia vida (SINHA et al., 1998).

O TNF- α , que foi purificado, seqüenciado e teve seu gene clonado em meados dos anos 80, é uma citocina multifuncional que possui funções centrais na inflamação aguda e crônica, na resposta antitumoral e nas infecções (PALLADINO et al., 2003). Exerce um papel especial com relação à patogênese de muitas doenças infecciosas e inflamatórias (EIGLER et al., 1997).

O TNF- α é um potente mediador, com efeitos benéficos e maléficos (PARHAM, 2001). Essa citocina é certamente responsável por muitos dos exemplos de destruição de células tumorais pelos macrófagos, junto com o IFN- γ , é poderosamente sinérgica na destruição de tumores susceptíveis (ROITT et al., 2001).

A síntese de TNF- α é estimulada em monócitos/macrófagos por diferentes substâncias exógenas como o LPS e β -glucanas, ou por mediadores como a IL-1. Altas concentrações de TNF- α no plasma foram encontradas em diversas doenças inflamatórias e infecciosas, como sepse, meningite bacteriana, malária cerebral, síndrome da angústia respiratória do adulto, AIDS e artrite reumatóide (EIGLER et al., 1997).

Essa citocina atua no início da resposta imune, regula a cascata de citocinas durante a resposta inflamatória e está envolvida em eventos locais e sistêmicos, contínuos à inflamação (MARKHATADZE, 1998). Como principal função estimula o recrutamento de neutrófilos e monócitos para os locais de infecção e ativar estas células a erradicar os microorganismos. Atua como um pirogênio endógeno, induzindo febre por aumentar a síntese de prostaglandinas (BUTLER, 1995).

O papel do TNF- α no desenvolvimento da resposta protetora do hospedeiro contra a infecção fúngica foi demonstrado através de modelo animal de candidíase, aspergilose e criptococose, através da indução de IFN- γ , IL-1, IL-6 e IL-12 (BAUMAN et al., 2003; NETEA et al., 2004). Em camundongos com aspergilose pulmonar invasiva, o TNF- α parece estar

relacionado com a indução da imunidade protetora e com a resistência do animal ao *Aspergillus fumigatus* (BALLOY et al., 2005).

Na esporotricose a produção de TNF- α e IL-1 estão significativamente reduzidas entre a quarta e sexta semana de infecção fúngica (CARLOS et al., 1994). Outros estudos revelaram que a resposta do hospedeiro parece ser regida pelo perfil local de citocinas, onde se observou a predominância de resposta tipo Th1 (MUGURUMA et al., 1995).

A IL-6 é produzida quando estimulada por citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-1 ou ainda, em resposta a estímulos bacterianos ou virais. Estudos recentes demonstraram a influência de citocinas como a IL-4 e IL-10 na atividade reguladora da IL-6 (STRIZ et al., 1999). Está envolvida na regulação da resposta imune, na hematopoese, na inflamação, na produção de plaquetas, na ativação dos osteoclastos, na proliferação de queratinócitos e das células mesangiais (AKIRA et al., 1990; NAKA et al., 2002). Atua tanto na imunidade inata quanto na adaptativa, uma de suas principais funções é a indução de anticorpos por células B (AKIRA et al., 1990).

Estudos realizados por Schaller et al. (2004), demonstraram que citocinas como a IL-1 β , IL-6 e IL-8 promovem a degranulação, migração e outras atividades antifúngicas de polimorfonucleares em modelo de candidíase oral.

A IL-12 é o principal mediador da resposta imune inata a microorganismos intracelulares e um indutor chave da imunidade mediada

por células, a resposta adaptativa contra esses microorganismos. É produzida principalmente por macrófagos ativados e células dendríticas (GAZZINELLI et al., 1993). É uma proteína heterodimérica composta por duas subunidades denominadas p35 e p40. A subunidade p35 tem homologia com a IL-6 e G-CSF (fator estimulador de crescimento de colônia-granulócitos), enquanto que a subunidade p40 não tem homologia com outras citocinas (TRINCHIERI, 2003).

Foi originalmente descrita como um fator que promove a atividade das células NK e linfócitos T citotóxicos. Mais recentemente a IL-12 tem sido vista como um indutor da secreção de IFN- γ , promovendo o crescimento e ativação das células T e NK, modulando a síntese de IgG e induzir as células T helper para o perfil Th1 (LAMONTI & ADORINI, 1996).

Produtos microbianos associados com diferentes patógenos foram identificados por estimular a produção de IL-12 por célula apresentadora de antígenos e promover resposta do tipo Th1 (GAZZINELLI et al., 1993).

A IL-12 atua em diferentes estágios da resposta imune e está envolvida na sua manutenção e permanência (TRINCHIERI, 2003). É negativamente regulada pela IL-4 e IL-10, que são potentes citocinas indutoras da resposta do tipo Th2 (MENCACCI et al., 2000).

Para o desenvolvimento da resposta protetora Th1 contra infecções fúngicas em modelos experimentais de candidíase, aspergilose, criptococose e paracoccidiodomicose a IL-12 é requerida por seu papel

regulatório mediado pelo IFN- γ (CENCI et al., 1998; KAWAKAMI et al., 2000; ARRUDA et al., 2002).

O desenvolvimento da função de defesa do hospedeiro por macrófagos é mediado em parte por um sinal conhecido como fator ativador de macrófagos (MAF). O IFN- γ é um potente MAF que estimula a expressão de várias proteínas de membranas aumentando ou diminuindo a síntese e secreção de múltiplas enzimas, ressaltando o potencial gerador de reativos intermediários do oxigênio (HAMILTON et al., 1985).

Os efeitos imunoreguladores do IFN- γ influenciam vários efeitos biológicos por ativar positivamente ou negativamente a expressão de muitos genes e proteínas (GESSANI et al., 1998).

O IFN- γ tem sua transcrição potencializada pela IL-2 e IL-12. Dentre suas propriedades reguladoras, destaca-se a ativação de fagócitos mononucleares. Nos macrófagos murinos atua em combinação com TNF- α para induzir a produção de isoformas do óxido nítrico sintase que resulta na síntese de radicais de óxido nítrico (STARK et al., 1998).

Macrófagos ativados via IFN- γ são capazes de gerar TNF- α , IL-6, IL-12 e óxido nítrico que aumentam a habilidade dessas células em controlar o desenvolvimento de patógenos. A estimulação do IFN- γ resulta da ativação iNOS que produz o NO (BRENNAN et al., 2004). O óxido nítrico é produzido em resposta a citocinas, tais como TNF- α , IFN- γ e IL-2 (JANEWAY et al., 1997).

O IFN- γ induz o NO somente em células infectadas. Isso indica que parasitas intracelulares capacitam a geração de óxido nítrico através da ativação pelo IFN- γ (VOULDOUKIS et al., 1995).

Exames imunohistoquímicos das lesões de pele de pacientes com esporotricose linfocutânea revelaram que as citocinas Th1 (como IFN- γ , TNF- α e IL-2) são predominantes antes do início do tratamento, sendo que sua expressão reduz ao longo do tratamento e desaparece no final do tratamento. Isso sugere que a imunidade celular é induzida em pacientes com esporotricose e que ela contribui para a eliminação do fungo nesses locais e prevenção da disseminação para outros órgãos (TANUMA et al., 2001).

Evidências recentes sugerem que a resposta do hospedeiro contra o fungo patogênico pode ser influenciada pelo tipo celular envolvido e pelo perfil de produção de citocinas (BALLOY et al., 2005). O IFN- γ , estimula a migração, aderência e atividade antifúngica de neutrófilos e macrófagos contra *C. albicans*, *A. fulmigatus*, *F. solani*, *T. beigelli* e *P. marneffe*. Também desempenha um importante papel regulador no desenvolvimento da resposta adaptativa Th1 contra fungos patogênicos (CHARALAMPOS et al., 2005).

A IL-2, produzida por células T CD4⁺ e CD8⁺ ativadas, é um fator de crescimento para linfócitos T, células NK e importante na ativação dos macrófagos (RICHARDS, 1997).

A secreção de IL-2 e IFN- γ agem de forma dominante nos mecanismos de resistência em doenças fúngicas (FERREIRA et al., 2003).

Na infecção experimental causada por *Cryptococcus neoformans*, a adição de anticorpos anti-IL-2 reduziu a capacidade das células mononucleares em destruir o fungo *in vitro*. Isso sugere que a falta de IL-2 em condições experimentais induz uma infecção fúngica letal (BIONDO et al., 2003).

A IL-4 foi inicialmente descrita como um coestimulante na resposta proliferativa das células B na presença de uma anti-imunoglobulina, causando aumento das células B em repouso. Seus efeitos biológicos no sistema imune incluem regulação do crescimento de células hematopoiéticas, células T, células B e também, a regulação da síntese de citocinas por células T ativadas (RAMIREZ et al., 1998).

A IL-4 é uma citocina produzida por células T, subclasse Th2. Tem função imunomoduladora, induzindo complexo MHC de classes I e II a expressarem o antígeno, supressão do IFN- γ e indução da produção de iNOS através do estímulo de LPS (KAMBAYASHI et al., 1996). Essa citocina geralmente é considerada um antagonista de Th1, baseada no aumento da produção da bioatividade de IL-12 por células imunológicas murinas e humanas. Macrófagos ativados podem secretar IL-12 juntamente com outras citocinas pró-inflamatórias (HOCHREIN et al., 2000).

Altas concentrações de IL-12 no início da infecção fúngica prejudicam a resposta imune do hospedeiro através da supressão da

resposta Th1, pela inibição da produção de IFN- γ . Em estágios tardios da doença a presença de IL-4 limita o desenvolvimento da doença fúngica (MENCACCI et al., 2000; CHARALAMPOS et al., 2005).

A IL-10 é uma citocina pleiotrópica que expressa propriedades imunossupressoras e antiinflamatórias. Inibe principalmente a atividade antimicrobicida dos fagócitos e a ativação das células T (DEEP, 2003). É produzida por linfócitos Th2, macrófagos, mastócitos e células B. Tem uma variedade de funções incluindo a regulação negativa da ativação das células T, a produção de IFN- γ , IL-1, TNF- α , supressão da proliferação e ativação dos macrófagos, inibição da produção de NO e a produção de anticorpos (CLEMONS, 2000).

Os maiores avanços verificados na imunologia experimental se devem ao importante papel regulador das citocinas na resposta imune inata e adaptativa para infecções fúngicas. Embora algumas citocinas apresentem características marcantes de um perfil Th1 ou Th2, muitas delas, apresentam efeitos pleiotrópicos dependentes de sua dose e tempo de secreção para o desenvolvimento da resposta imune (ROMANI, 2004; CHARALAMPOS et al., 2005). Isso evidencia a importância do delicado balanço entre as citocinas Th1 e Th2 para o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva.

II. OBJETIVOS

O presente trabalho avaliou a inter-relação da imunidade celular e humoral induzida pelo fungo *S. schenckii* em modelo experimental utilizando-se camundongos infectados e não infectados. Dessa forma procurou-se:

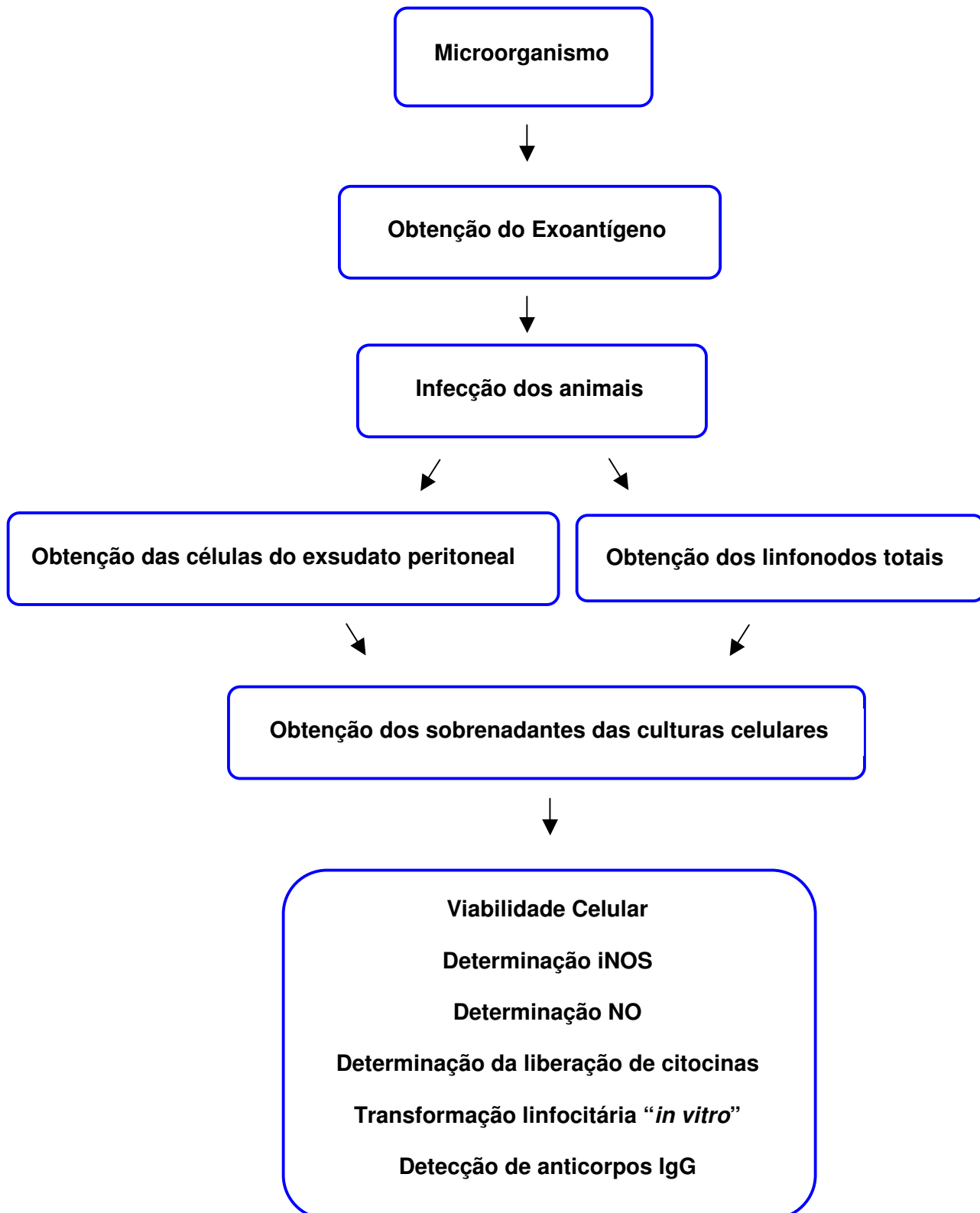
a) Quantificar as citocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α , tentando compreender se a resposta imunológica ao fungo em questão ocorre preferencialmente por células Th1 ou Th2.

b) Avaliar a estimulação dos macrófagos através da liberação de óxido nítrico, devido a sua importância como mediador na resposta imune e correlação com várias citocinas da rede imunológica. Também determinar a presença da enzima NO sintase induzível (iNOS) nos macrófagos, correlacionado-se com a determinação de NO.

c) Compreender a inter-relação entre as respostas imune celular e humoral (Th1 e Th2) e a evolução da infecção na esporotricose através da avaliação da resposta imune humoral utilizando-se teste imunoenzimático, (ELISA), pesquisando-se anticorpos da classe IgG formados pelo ExoAg; e por outro lado, reforçar a presença da resposta imune celular determinando a transformação linfocitária.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Fluxograma de execução dos experimentos



2. Microorganismo e condições de cultivo

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

3. Obtenção do exoantígeno

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 em seguida novamente submetida à radiação UV por mais uma hora. Em seguida acrescentou-se mertiolate a uma concentração final de 1/5000. A suspensão celular foi congelada a – 20°C por 48 h. Após esse período, foi realizado teste de esterilidade em ágar Sabouraud. A suspensão celular foi centrifugada e o sobrenadante filtrado. O filtrado obtido foi concentrado 50 a 100 vezes em concentrador (Amicon). A dosagem de proteínas foi feita pelo método de Lowry et al., (1951), fornecendo valor de 7,58 mg/mL. Para a realização dos testes, o

exoantígeno foi diluído a 1/160 em solução salina tamponada de fosfatos (PBS) estéril, pH 7,4, numa concentração final de 47,40 µg/mL, de acordo com testes prévios realizados em nosso laboratório.

4. Animais de experimentação

Camundongos Swiss, machos, pesando entre 25 e 30g, com idade entre 45-60 dias, foram obtidos do Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP. Estes animais foram mantidos em gaiolas, em condições estáveis de ambiente (23°C, 56% de umidade relativa do ar) e ciclos claro/escuro de 12 h, sendo oferecido água e ração (PURINA) *ad libitum*.

5. Infecção dos animais

Durante 10 semanas de infecção, um grupo de 5 animais por semana, foram infectados com suspensão fúngica em PBS, pH 7,4, contendo 10⁶ células leveduriformes de *S. schenckii*. Tomou-se uma alíquota do caldo BHI, onde estavam sendo cultivadas as formas leveduriformes do fungo, que foi centrifugada (Centrífuga Fanem, Ind. Bras.) a 2500 rpm por 10 min. O sedimento obtido foi ressuspendido em 1 mL de PBS para a contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Germany). A suspensão foi ajustada à concentração de 1x10⁷ células/mL e cada animal foi inoculado intraperitonealmente (i.p.) com 0,1 mL desta suspensão celular. Os animais foram eutanasiados

semanalmente por inalação de éter para a coleta dos macrófagos peritoneais e das células dos linfonodos totais com posterior realização dos testes biológicos. Parecer n° 13/2005 – Comitê de Ética em Pesquisa.

6. Obtenção das células do exsudato peritoneal

Os animais em diferentes períodos da infecção e os normais foram previamente estimulados pela inoculação intraperitoneal de 3,0 mL de tioglicolato de sódio (DIFCO Lab. LTDA) a 3,0% três dias antes de serem eutanasiados por inalação de éter (Merck). Estes animais tiveram a pele da região abdominal retirada assepticamente em câmara de fluxo laminar Classe 100 (Veco) e o peritônio exposto. Posteriormente foram inoculados 5,0 mL de PBS, pH 7,2 gelado na cavidade abdominal. O líquido peritoneal resultante foi coletado com seringa e agulha, transferido para um tubo cônico estéril com capacidade de 15,0 mL (Corning, Inc.) e centrifugado a 2000 rpm durante 5 min (Centrífuga Fanem, Ind. Bras.) e o sedimento celular lavado três vezes com 3,0 mL de PBS. Após a última lavagem as células foram ressuspensas em 1,0 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma) contendo 2 β -mercaptoetanol (Sigma) a 2×10^{-5} M, penicilina 100 U/mL (Sigma), estreptomicina 100 U/mL (Sigma), L-glutamina 2mM (Sigma) e 5% de soro fetal bovino (Cultilab), sendo o meio assim composto designado de RPMI-1640 completo (RPMI-1640-C) para a contagem de células. O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica tipo Neubauer (Boeco, Germany) e a

suspensão celular ajustada à concentração de 5×10^6 células para realização dos testes propostos.

6.1. Obtenção dos sobrenadantes das culturas de células peritoneais

As células peritoneais foram ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL em meio RPMI-1640-C e distribuídas em placas de cultura de tecidos de 24 cavidades (Corning, Inc.). A cada cavidade foi adicionado 1,0 mL da suspensão celular e as placas foram incubadas a 37°C por 60 min em estufa contendo tensão constante de 5% de CO_2 (Forma Scientific). Após esta incubação, as células não aderentes foram retiradas por lavagens com o meio de cultura RPMI-1640-C. Aos macrófagos que ficaram aderidos à placa foi adicionado volume igual ao inicial de RPMI-1640-C e ainda acrescentados $34\mu\text{L}$ do exoantígeno a $47,40\mu\text{g/mL}$ ou LPS a $10\mu\text{g/mL}$ como controle positivo ou somente RPMI-1640-C como controle de células. Estas placas foram novamente incubadas a 37°C em estufa com tensão constante de 5% de CO_2 (Forma Scientific) por mais 24 h. Após esta incubação, as placas foram centrifugadas em centrífuga refrigerada (Hettich, Inc.) a 4°C durante 10 min a 4000 rpm. Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram coletados, aliquotados e estocados em freezer a -80°C até o momento da determinação das citocinas.

7. Obtenção dos linfonodos totais

Os animais infectados e normais foram eutanasiados por inalação de éter e, em câmara de fluxo laminar Classe 100 (Veco), tiveram a pele da região abdominal retirada, com auxílio de pinça de metal e o peritônio aberto para a extração dos linfonodos axiais, mesentérico e periaórtico. Os linfonodos foram retirados e macerados em malha de nylon em uma placa de Petri estéril (Corning, Inc.) contendo 3,0 mL de RPMI-1640-C), gelado, para liberação das células. O conteúdo da placa foi aspirado por seringa de 3,0 mL e agulha 25 x 7,0mm para obtenção de suspensão celular homogênea. Após este procedimento as células foram transferidas para tubo cônico estéril (Corning, Inc.) de 15,0 mL e centrifugadas em RPMI-1640-C três vezes a 2000 rpm por 5 min (Centrífuga Fanem, Ind. Bras.). As células sedimentadas foram novamente ressuspendidas em 1,0 mL de meio RPMI-1640-C e a contagem do número de células viáveis foi feita em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Germany) através da técnica de exclusão com Azul de Trypan a 0,04%. Após a contagem, as suspensões celulares foram ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL para determinação de citocinas e a $2,8 \times 10^6$ células/mL para a determinação da transformação linfocitária.

7.1. Obtenção do sobrenadante das células dos linfonodos totais

A suspensão celular contendo as células totais dos linfonodos foram ajustadas a 5×10^6 células/mL, obtidas como descrito no item anterior, distribuídas em placas de cultura de tecidos de 24 cavidades (Corning, Inc), 1,0 mL por cavidade e acrescentadas de 34 μ L do estímulo (exoantígeno na concentração de 47,40 μ g/mL ou concanavalina A (ConA) na concentração de 0,5 μ g/mL – usada como controle positivo) ou somente meio de cultura nos controles de células. As placas foram incubadas a 37°C em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific) por 24 h. Após esta incubação, as placas foram centrifugadas em centrífuga refrigerada (Hettich, Inc.) a 4°C durante 10 min a 4000 rpm. Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram coletados, aliqüotados e estocados a –80°C para posterior dosagem de citocinas.

8. Avaliação da viabilidade celular dos macrófagos

Em placa de microtitulação de 96 cavidades de fundo plano (Corning, Inc.) foram distribuídos 100 μ L por cavidade das suspensões de células do exsudato peritoneal de animais infectados e normais, ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL em meio de cultura RPMI-1640-C em presença de 100 μ L de exoantígeno na concentração de 47,40 μ g/mL, de LPS a 10 μ g/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 CO₂ (Forma Scientific). Após esta incubação as células aderentes foram tratadas com 100 µL de uma solução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio), (Across Organics) a 0,5 mg/mL em RPMI-1640. A placa foi então incubada por mais 3 h nas mesmas condições anteriores. Após esta incubação os sobrenadantes foram descartados e as células aderentes tratadas com 100µL 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.

9. Determinação da atividade da óxido nítrico sintase (iNOS)

Os reagentes de Tampão Tris – pH 7,4, N_w-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), sulfeto de p-fenil metil sulfonil fluoreto (PMSF), sal sódico de HEPES, ácido etileno diamino tetracético (EDTA), L-arginina foram utilizados na preparação da resina de troca iônica DOWEX 50wx-8-400 (Sigma® cat.#DWX8-400) e detecção da iNOS. A resina na forma ácida foi lavada sob agitação durante 2 horas na presença de NaOH 1M. Lavou-se sucessivamente com tampão HEPES e HCl acertando o pH para 5,4. Preencheu cada coluna de filtragem com a resina pronta. As células peritoneais foram submetidas ao sonicador, por 5 min a 50W. Os reagentes foram acrescentados, respectivamente, ao sobrenadante das células

sonicadas e passados pela primeira filtragem na resina. Incubou-se os eluídos a 37°C, sob agitação constante, durante 30min. A reação foi interrompida com tampão HEPES, voltando a passar a mistura pela resina. Foi adicionado líquido de cintilação e a leitura realizada em espectrofotômetro de cintilação (Top Count, Packard).

10. Determinação da produção de óxido nítrico

O NO foi quantificado espectrofotometricamente pelo acúmulo de nitrito no sobrenadante da cultura de células através da reação de diazotação com o reagente de Griess (composto de 1 g de sulfanilamida (Merck), 0,1 g de dicloro N(1-naftil)etilenodiamina (Merck), 2,5 mL de ácido ortofosfórico (Mallinckrodt Chemical) e água deionizada q.s.p 100 mL), conforme descrito por Green et al. (1982).

Alíquotas de 50 µL dos sobrenadantes das culturas de células do exsudato peritoneal, foram transferidas para outra placa de cultura de células não estéril contendo 96 cavidades de fundo planas (Corning, Inc.) e acrescidas de igual volume de reagente de Griess. Após 10 min de incubação em temperatura ambiente ao abrigo da luz, a absorbância foi determinada em UV/visível com filtro de 540nm em espectrofotômetro (Microplate Reader, Multiskan Ascent, Labsystems). As concentrações de NO liberado nos sobrenadantes das culturas celulares foram calculadas a partir de uma curva padrão, previamente estabelecida, com concentrações

molares conhecidas de nitrito de sódio e os valores foram expressos em μmols de nitrito/ 5×10^5 células.

11. Determinação da liberação de citocinas

As citocinas IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α foram quantificadas nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais, enquanto que o IFN- γ , IL-4, IL-2 e IL-10 foram quantificados nos sobrenadantes das culturas de células dos linfonodos totais através do teste imunoenzimático ELISA de captura para cada citocina. Para isso foi utilizado o Kit DuoSet[®], R&D Systems e BD Pharmingen (IL-2 e TNF- α) de acordo com as instruções dos fabricantes.

As placas de 96 orifícios (Corning Inc.) foram adsorvidas com anticorpo de captura, monoclonal, obtidos de rato, anti-citocina de camundongo, na concentração adequada para cada citocina em PBS, pH 7,2 (100 μL por cavidade) e incubadas “overnight” à temperatura ambiente. No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS, pH 7,2, contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T) e bloqueadas com 300 μL /cavidade de BSA a 1% em PBS (PBS/BSA, com 5% de sacarose e 0,5% de azida sódica) à temperatura ambiente por 60 min. Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T. Após a última lavagem foram adicionados a cada cavidade 100 μL do padrão de citocinas ou dos sobrenadantes das culturas de células a serem testados. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 120 min, e lavadas 3 vezes com

PBS/T. Em seguida, foram adicionados 100 μL /cavidade de anticorpo monoclonal de cabra (anticorpo anti-citocina de camundongo) marcado com biotina, diluído à concentração adequada de cada citocina em diluente de reagente (1%BSA, 0,05% de Tween 20 em PBS, pH 7,2-7,4). As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 120 min e lavadas 3 vezes com PBS-T, sendo então adicionados 100 μL /cavidade do conjugado peroxidase-estreptavidina diluído 1/200 em diluente de reagente e incubadas novamente à temperatura ambiente por 20 min. Após este período de incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e em seguida adicionadas de 100 μL do substrato [10mM de tampão citrato-fosfato, contendo 0,4mM de tetrametilbenzidina (SIGMA) e 1,2mM de H_2O_2 (Mallinckrodt Chemical)] a cada cavidade. A reação foi interrompida adicionando-se 50 μL de H_2SO_4 2N a cada cavidade. A absorbância foi lida a 450nm em espectrofotômetro UV/visível para microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems), e as concentrações de cada citocina foram quantificadas utilizando-se uma curva padrão previamente estabelecida com quantidades conhecidas dos padrões das citocinas. Os resultados foram expressos em pg/mL.

12. Transformação linfocitária (teste “in vitro”)

Os animais em diferentes tempos de infecção e normais (não infectados) foram sacrificados com éter. Os linfonodos foram colhidos assepticamente e colocados em placa de Petri contendo 3,0 mL de meio de

cultura RPMI-1640-C (SIGMA). Após obtenção das células dos linfonodos e lavagem com o meio, foi preparada uma suspensão a $2,8 \times 10^6$ células/mL. Desta suspensão foram adicionados 180 μ L/cavidade em placas de cultivo de células com fundo chato (Corning). Foram acrescentados 50 μ L de ExoAg ou 50 μ L da solução de ConA (SIGMA, type IV-S) , incubados a 37 °C em uma atmosfera com 5% de CO₂ durante 48 horas. Decorrido este tempo foi adicionada a timidina triciada numa concentração de 0,5 uCi (15,1 uCi/mmol) (Amershan Pharmacia), continuando-se a incubação por mais 18 horas nas mesmas condições anteriores. As células foram obtidas utilizando uma placa apropriada contendo filtro com fibra de vidro através de um coletador múltiplo de amostras (Filtermater Harvester, Packard). Após a secagem da placa, foi acrescentado líquido de cintilação (Microsint, Packard) e a radioatividade foi detectada em cintilador Top Count- NXT™ Microplate Scintillation & Luminescence Counter, Packard.

13. Detecção de anticorpos IgG durante o período de infecção

Os anticorpos IgG foram detectados através de soros de camundongos em diferentes tempos de infecção. As placas de 96 orifícios (Corning Inc.) foram adsorvidas com exoantígeno diluído na proporção de 1/280 em tampão carbonato (100 μ l por cavidade) e incubadas “overnight” à temperatura ambiente. No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS, pH 7,2, contendo 0,1% de Tween-20 (PBS-T) e bloqueadas com 100 μ L/cavidade de leite molico 0,5% em PBS por 60 min em estufa de Co₂

à 37°C em câmara úmida. A placa foi lavada com PBS/T utilizando Multi Wash II (TriContinent). Os soros inativados à 56°C foram diluídos em tampão PBS, pH 7,2 na concentração inicial de 1/20 e adicionados 100µl às cavidades da placa. Após incubação de 1 hora nas mesmas condições anteriores, a placa foi novamente lavada e 100 µl do conjugado diluído em sua concentração ótima adicionado. Após incubação de 1 hora em estufa a 37°C e lavagem automática da placa, 100 µl do substrato (0,01g de OPD, 25 mL de tampão citrato e 10µl de H₂O₂) foi adicionado em seguida. A reação foi interrompida adicionando-se 50 µl de HCl 3N, e a absorbância lida em 490nm utilizando leitor de ELISA UV/visível de microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems Research Tech. Div., Helsinki, Finland). A leitura final foi determinada em triplicata e a média comparada com o *cut-off* de 0,067±0,010 determinado a partir da análise de soros normais de camundongos.

14. Análise dos Resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada por intermédio do programa estatístico GraphPad InStat aplicando-se análise de variância com determinação do nível de significância para $p < 0,05$, através de comparações múltiplas (teste de Tukey). Todos os experimentos foram realizados usando cinco animais por semana de infecção e cada determinação foi executada em triplicata.

IV. Resultados

1. Determinação da Viabilidade Celular

A determinação da viabilidade celular foi realizada utilizando células do exsudato peritonial obtidas de camundongos infectados em diferentes períodos de infecção e do grupo controle. As células foram mantidas em cultura por 24 horas em meio RPMI-1640C.

Os diferentes resultados obtidos no decorrer da infecção foram expressos em percentual de viabilidade como média \pm desvio padrão de 5 animais por semana estudada e estão ilustrados na Figura 1 e Tabela 1.

Nas células tratadas com o exoantígeno (ExoAg), observou-se uma variação na viabilidade das células, entre a segunda e a sétima semanas e entre a sétima e nona, com $p < 0,001$ em todos os casos.

Quando as células foram tratadas com LPS, foi observada uma menor variação na viabilidade celular dos animais infectados, comparando-se a primeira e quinta semanas, com $p < 0,001$.

Comparando-se os grupos tratados com ExoAg e LPS, houve maior viabilidade celular nas células tratadas com LPS, demonstrando menor toxicidade desse último.

Quando cultivadas na ausência de estímulo, observou-se que as células dos animais infectados estão mais suscetíveis a mudanças das condições de cultura em relação aos animais não infectados,

principalmente entre a terceira e quartas semanas de infecção, com $p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente, mostrando que a infecção pelo fungo interfere na viabilidade das células quando mantidas em cultura.

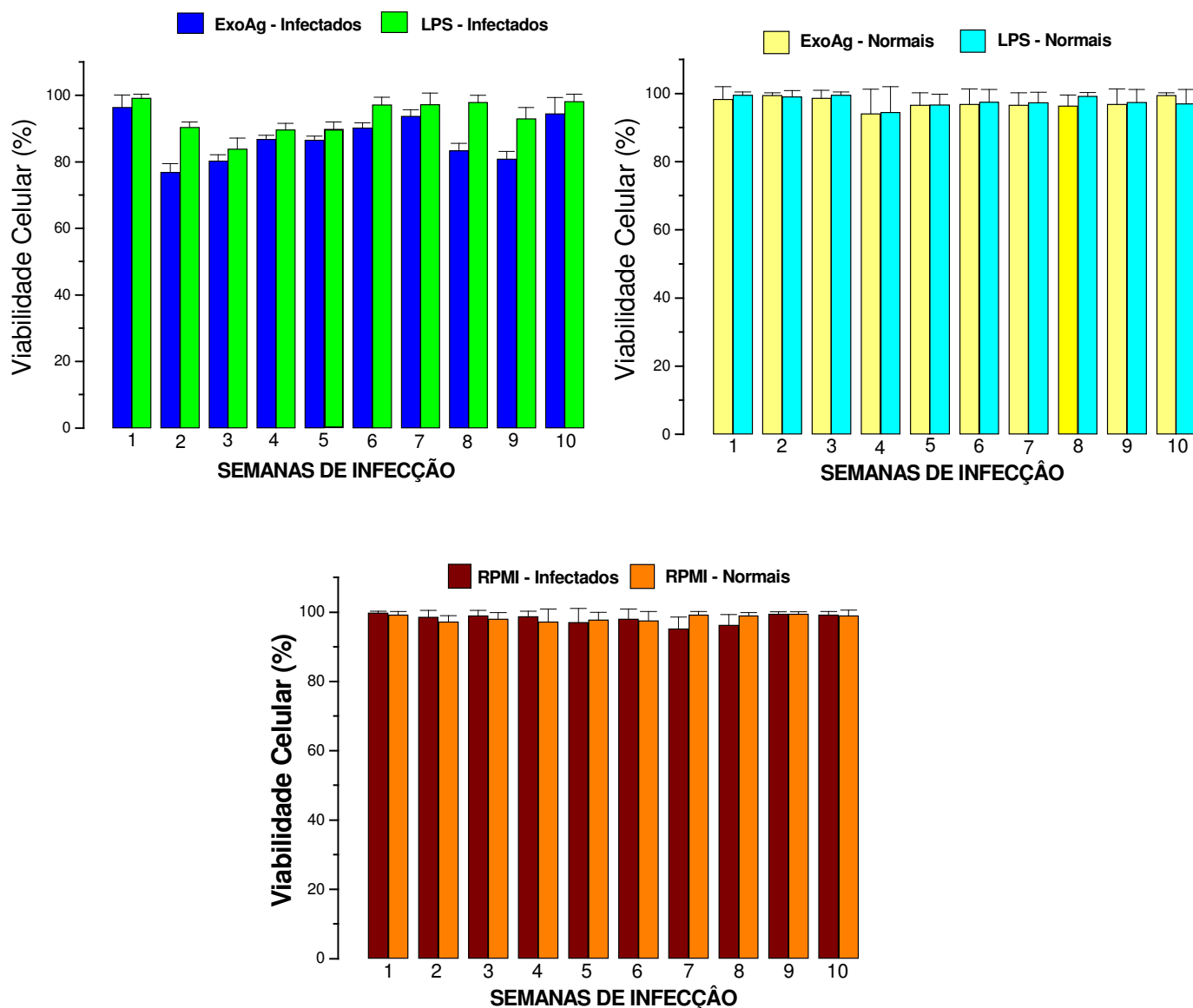


Figura 1 – Viabilidade das células do exsudato peritoneal (PEC) de camundongos Swiss infectados e normais com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas. Os macrófagos peritoneais de animais infectados e não infectados foram cultivados em presença de ExoAg, LPS ou somente em presença do meio RPMI-1640C como controle de células. Cada animal estudado foi avaliado em triplicata no momento de execução do teste. Os resultados foram expressos em percentual (%) como média \pm desvio padrão de cinco animais por semana de infecção.

2. Determinação da Atividade da Enzima iNOS

A determinação da iNOS foi realizada em sobrenadantes de cultura de células lisadas do exsudato peritoneal de camundongos infectados com o fungo *S. schenckii* e do grupo controle. A cultura foi realizada na presença de exoantígeno (ExoAg), LPS e somente meio RPMI-1640C. Os resultados obtidos nas diferentes semanas de infecção estão representados na Figura 2 e Tabela 2.

Analisando-se a detecção de iNOS, foi observado um aumento significativo na presença de LPS, comparado com o ExoAg em todas as semanas de infecção (exceto décima semana), $p < 0,001$.

Entre a terceira e quarta semanas de infecção foi observado um aumento estatisticamente significativo na indução da enzima iNOS, com $p < 0,001$, entre os animais infectados (ExoAg e LPS) em relação aos animais controles, com $p < 0,01$.

O decréscimo da atividade da enzima a partir da sétima semana se manteve nos dois grupos (ExoAg e LPS) até a décima semana com valores estatisticamente significativos entre elas com $p < 0,001$ para ambos.

O maior pico na indução da enzima foi observado no sobrenadante de cultura de macrófagos dos animais infectados na presença de LPS, demonstrando que o LPS é um potente estimulador de iNOS para a produção de NO.

Nos grupos controles não houve valores significativos nas diferentes semanas de infecção quanto à detecção da enzima iNOS.

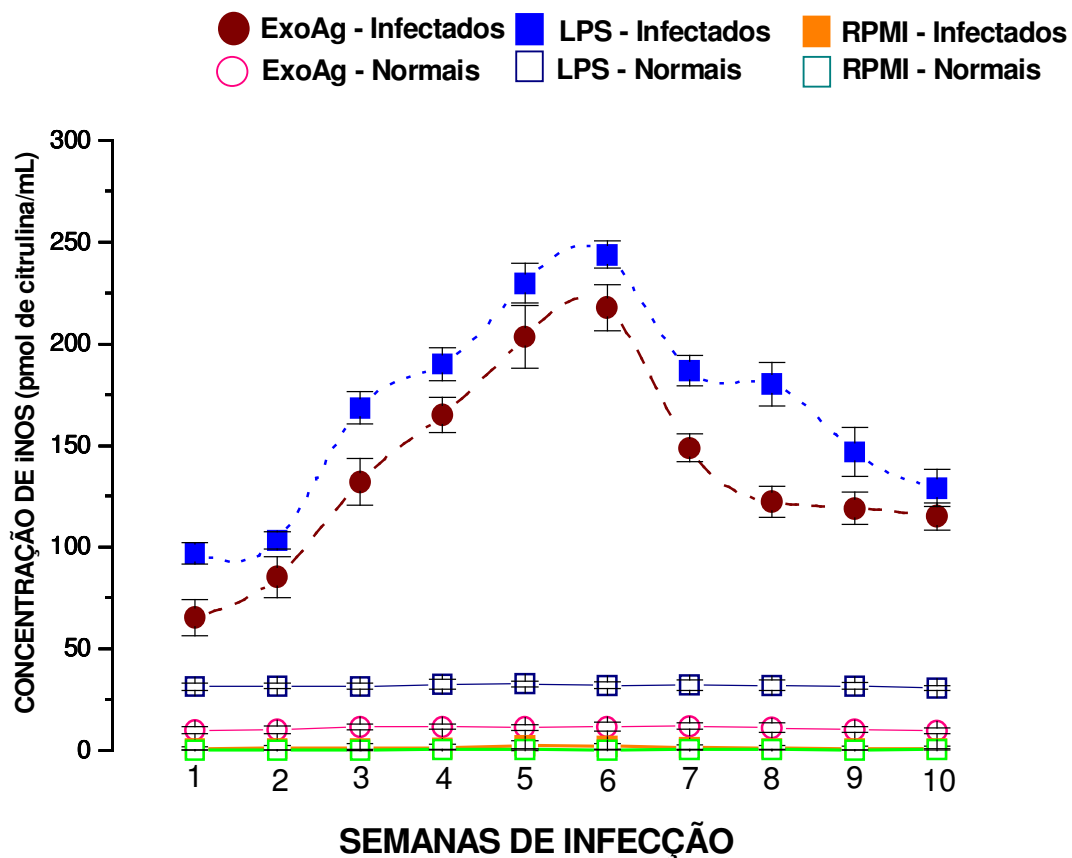


Figura 2 – Produção de iNOS por macrófagos peritoneais lisados e infectados com o fungo *Sporothrix schenckii* durante dez semanas de infecção. Os macrófagos peritoneais dos animais infectados e não infectados foram cultivados em presença de ExoAg, LPS ou somente em presença do meio RPMI-1640C como controle de células. Cada animal estudado foi avaliado em triplicata no momento de execução do teste. Os resultados foram expressos em pmol/mL de L-citrulina, como média \pm desvio padrão de triplicata de cinco animais por semana de infecção.

3. Determinação da Liberação de Óxido Nítrico

A determinação do NO foi realizada em sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos infectados com o fungo *S. schenckii* e do grupo controle. A cultura foi realizada na presença de ExoAg do fungo, LPS e somente meio RPMI-1640C. Os resultados obtidos nas diferentes semanas de infecção estão representados na Figura 3 e Tabela 3.

Foi observado aumento significativo na liberação de NO em presença de LPS, comparado com o ExoAg entre todas as semanas de infecção, $p < 0,001$. A partir da quarta semana de infecção foi observado um aumento significativo, com $p < 0,01$ entre a terceira e quarta semanas (LPS), mantendo-se até a sexta semana. Os níveis de NO reduziram a partir da sétima semana de infecção, com $p < 0,001$, coincidindo com o período de remissão da doença, confirmado pelo estado geral apresentado pelos animais.

Observou-se menor liberação de NO nas células obtidas de animais não infectados em presença do exoantígeno e LPS do que as mesmas células obtidas dos animais infectados, com $p < 0,01$, comparando as dez semanas entre si.

Quando as células dos animais infectados e normais são cultivadas na ausência de estímulo, encontra-se baixa produção de NO durante todo o período estudado. Contudo, os animais infectados

produziram maior quantidade de NO quando comparados com os animais não infectados, com $p < 0,001$.

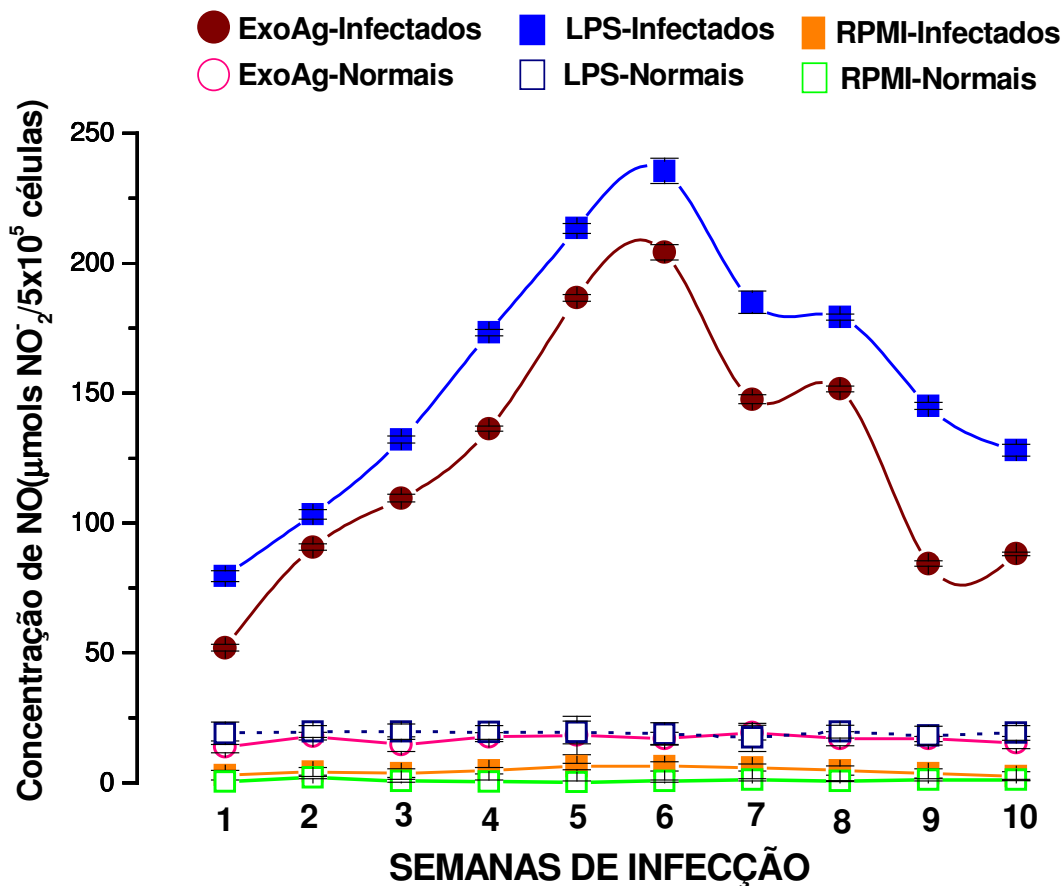


Figura 3 – Produção de NO por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss infectados com o fungo *Sporothrix schenckii* durante dez semanas de infecção. Os macrófagos dos animais infectados e não infectados foram cultivados em presença de ExoAg, LPS e somente meio RPMI-1640C. Cada animal estudado foi 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 (NaNO₂) e os resultados expressos em µmols de nitrito/5x10⁵ células, como média ± desvio padrão de 5 cinco animais por semana de infecção.

4. Determinação da Liberação de IL-1 β

A determinação da liberação de IL-1 β foi realizada nos sobrenadantes de culturas de macrófagos de camundongos em diferentes períodos de infecção. A cultura foi realizada na presença de ExoAg, LPS e somente RPMI-1640C, Tabela 4 e Figura 4.

As células dos animais infectados quando cultivadas na presença de ExoAg, apresentaram uma redução significativa de IL-1 β , $p < 0,01$, a partir da quinta semana de infecção.

O LPS, usado como controle positivo da liberação de IL-1 β , estimulou mais a produção de IL-1 β do que o ExoAg nas células dos animais infectados, com perfil semelhante, apenas com diferenças menos significativas entre as semanas. Observou-se, como ocorre com o exoantígeno, um período de depressão na produção de IL-1 β entre a quarta e sexta semanas, com $p < 0,001$ quando comparada com a primeira e a décima. O mesmo acontece com o ExoAg, coincidindo com o padrão de resposta apresentado anteriormente pelo TNF- α .

Observando as células dos animais normais frente ao ExoAg e LPS, ocorre uma menor produção de IL-1 β quando comparados com os animais infectados, com $p < 0,001$.

Na ausência de estímulo os macrófagos de camundongos infectados liberaram maior concentração de IL-1 β nos sobrenadantes das

culturas comparadas com os macrófagos de camundongos não infectados, com $p < 0,01$.

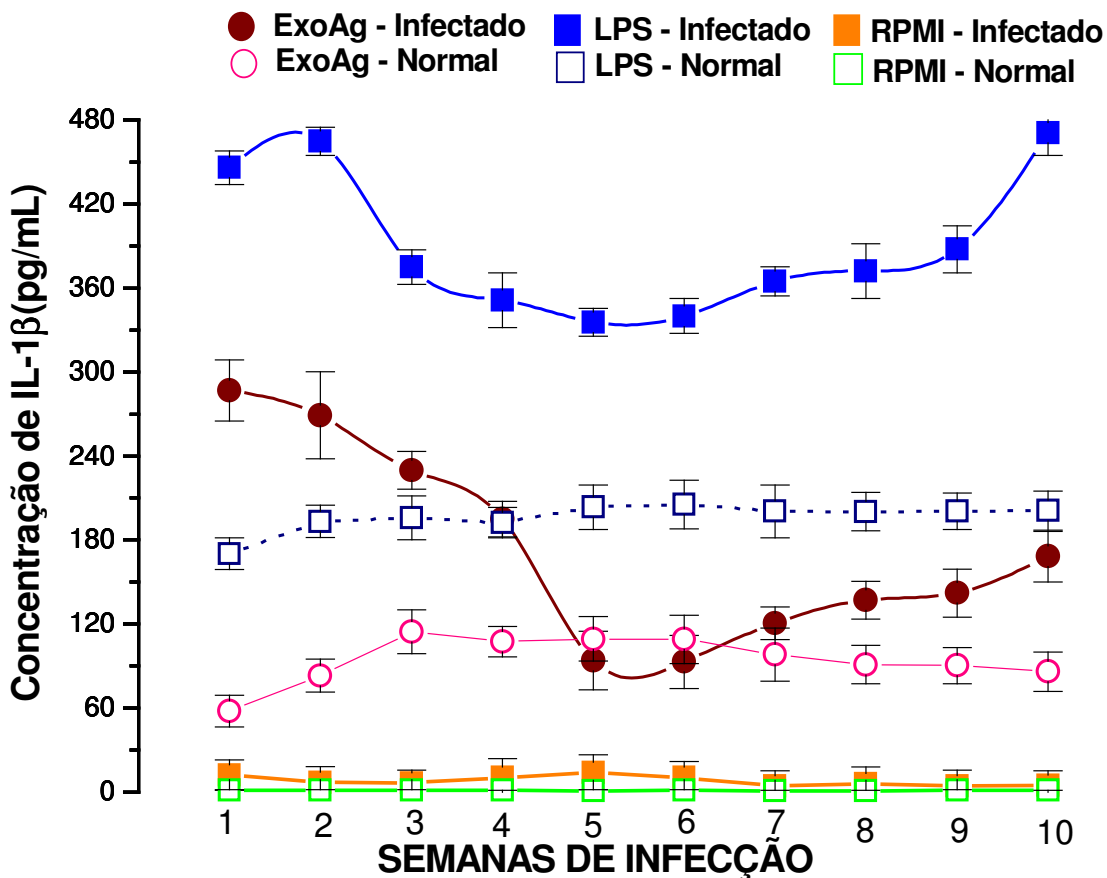


Figura 4 – Concentração de IL-1 β liberado nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss infectados e não infectados com *S. schenckii* durante dez semanas de infecção. As culturas de macrófagos de animais infectados e não infectados foram cultivadas em presença de ExoAg, LPS e somente meio RPMI-1640C de. As concentrações de IL-1 β foram calculadas através de teste imunoenzimático (ELISA) utilizando uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas de IL-1 β . Os resultados foram expressos em pg/mL, como média \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção.

5. Determinação da Liberação de TNF- α

A determinação de TNF- α foi feita no sobrenadante das culturas de macrófagos em presença do ExoAg do fungo, LPS e somente meio RPMI-1640C. Os resultados obtidos nas diferentes semanas de infecção estão representados na Tabela 5 e Figura 5.

A presença do ExoAg do fungo no meio de cultura das células dos animais infectados estimulou acentuada produção de TNF- α na primeira semana, apresentando uma diminuição a partir da segunda semana, com a menor concentração na quarta semana de infecção ($p < 0,001$) voltando a aumentar a partir da sétima semana.

Em resposta ao LPS, as mesmas células dos animais infectados, liberaram maior quantidade de TNF- α quando comparado os valores absolutos dos dois antígenos, sendo as diferenças estatisticamente significativas com $p < 0,001$. Tal como observado no gráfico do ExoAg, o LPS também apresentou uma diminuição dos valores de TNF- α entre a quarta e sexta semanas de infecção. Essa redução coincide com o aumento das concentrações de NO no mesmo período, sugerindo a presença de uma imunossupressão na esporotricose.

As células dos animais normais quando cultivadas na presença de LPS produzem elevadas concentrações de TNF- α , de forma relativamente constante, com pequeno aumento na nona e décima

semanas. Em presença do ExoAg essas mesmas células produziram quantidades estatisticamente menores comparadas com o LPS, $p < 0,001$.

Quando cultivada na ausência de estímulo, os macrófagos peritoneais dos camundongos infectados produziram maiores quantidades de TNF- α quando comparadas com os normais, $p < 0,01$.

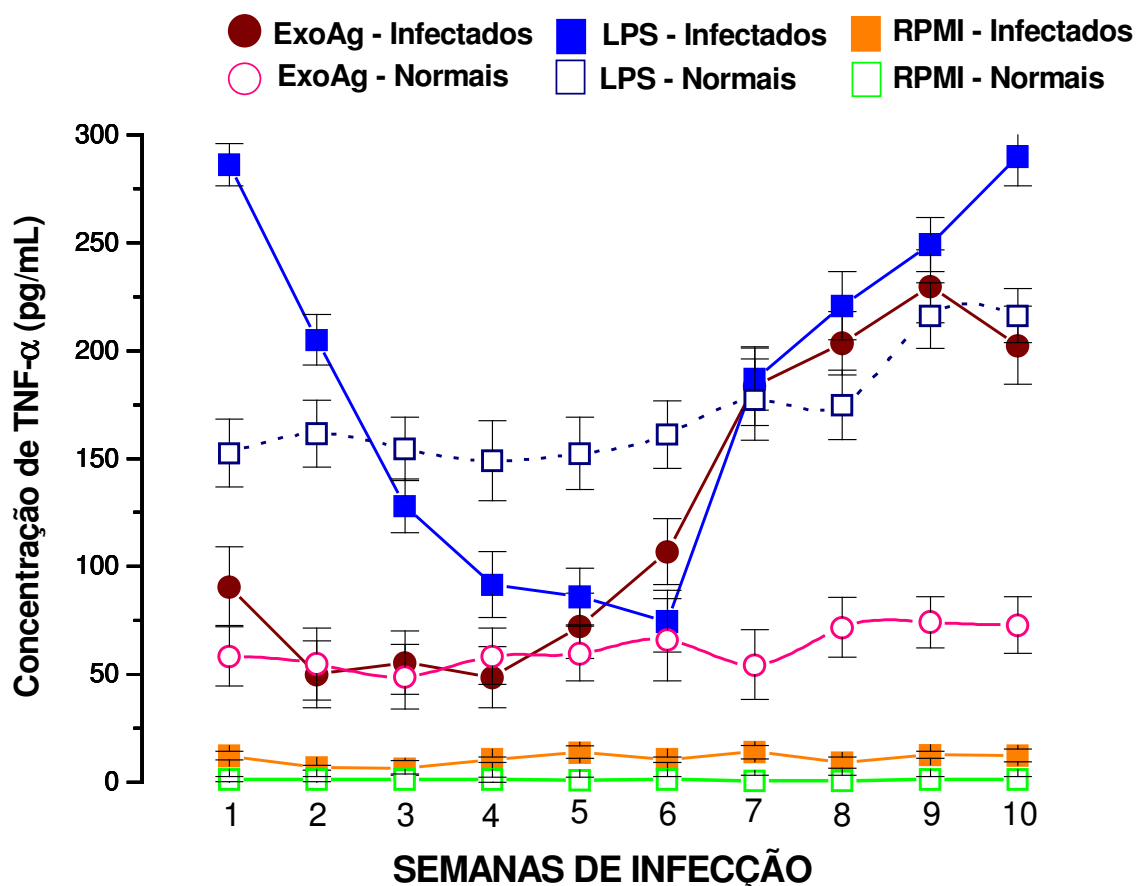


Figura 5 – Concentração de TNF- α liberado nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos infectados e não infectados com *S. schenckii* durante dez semanas de infecção. As culturas de macrófagos de animais infectados e não infectados foram cultivadas em presença de ExoAg, LPS e somente meio RPMI-1640C. As concentrações de TNF- α foram calculadas através de teste imunoenzimático (ELISA) utilizando uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas de TNF- α . Os resultados foram expressos em pg/mL, como média \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção.

6. Determinação da Liberação de IL-12 p40

A cultura celular de macrófagos foi incubada na presença de ExoAg, LPS e somente meio RPMI-1640C. Os resultados obtidos nas diferentes semanas de infecção estão representados na Figura 6 e Tabela 6 .

Na presença de LPS as células dos animais infectados apresentaram um aumento da concentração da citocina estatisticamente significativo entre a primeira e sexta semanas de infecção, com $p < 0,01$. As maiores concentrações de IL-12 foram vistas entre a quarta e sexta semanas de infecção ($p < 0,001$), mostrando resultados semelhantes aos obtidos nas concentrações de IFN- γ no mesmo período.

Foi observado um aumento significativo na liberação de IL-12 em presença de LPS, comparado com o ExoAg entre todas as semanas de infecção, com $p < 0,001$.

Observou-se ainda, um aumento significativo entre a primeira e terceira semanas ($p < 0,01$) de infecção com ExoAg e LPS. Entre a sétima e décima semanas ($p < 0,01$) houve uma redução nas concentrações dessa citocina, com ExoAg e LPS.

Os macrófagos peritoneais dos animais normais quando cultivados em presença do exoantígeno ou LPS, não foram estimulados a produzir IL-12. Não houve diferenças estatisticamente significativas, com $p > 0,05$, durante todas as semanas de infecção entre ExoAg e LPS.

Observou-se uma diferença estatisticamente significativa quando comparamos animais infectados e não infectados em presença de meio RPMI-1640C nas dez semanas de infecção, com $p < 0,01$, para ambos os grupos de estudo.

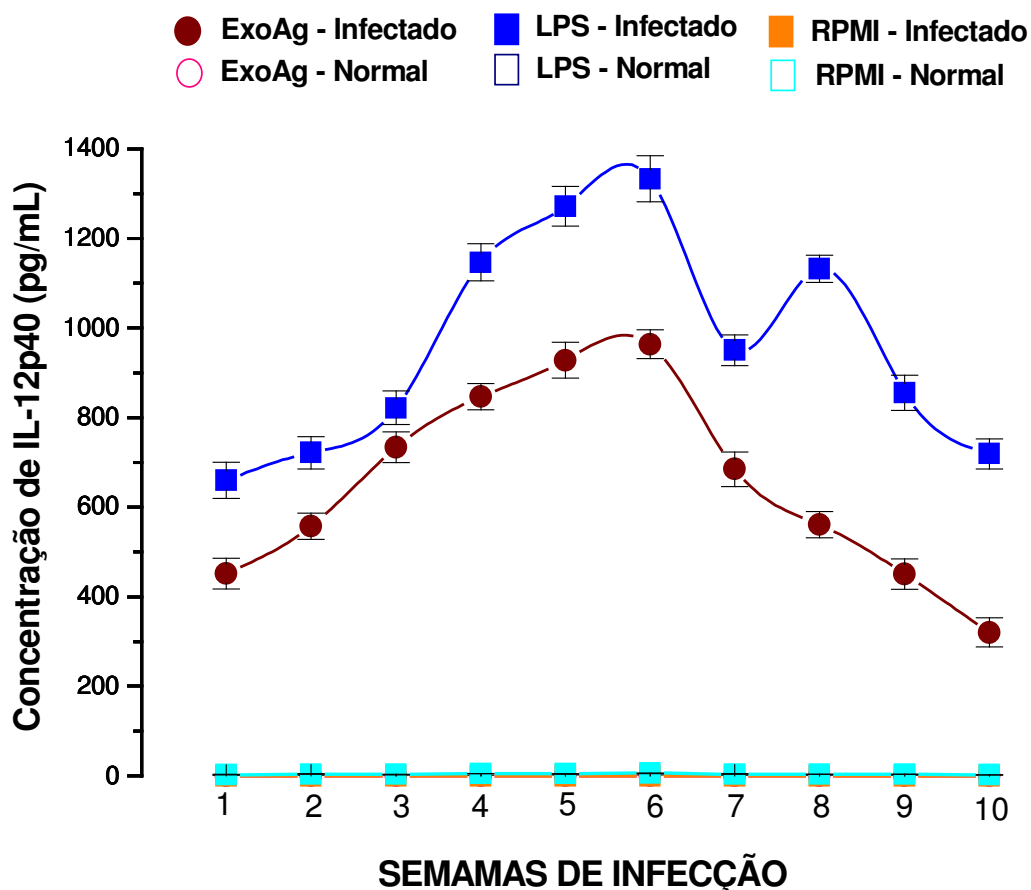


Figura 6 – Concentração de Interleucina 12 p40 (IL-12) liberada nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss infectados e não infectados com *S. schenckii* durante dez semanas. As culturas de células aderentes de animais infectados e não infectados foram mantidas em presença de ExoAg, LPS e somente meio RPMI-1640C. As concentrações de IL-12 foram calculadas através de teste imunoenzimático (ELISA) utilizando uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas de IL-12. Os resultados foram expressos em pg/mL, como média \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção.

7. Determinação da Liberação de IFN- γ

A cultura celular foi realizada na presença de Concanavalina-A (ConA), ExoAg e somente meio RPMI-1640C. Os resultados obtidos nas diferentes semanas de infecção estão representados na Tabela 7 e Figura 7.

Na presença de ExoAg, as células dos linfonodos totais dos animais infectados apresentaram um aumento significativo da concentração de IFN- γ a partir da terceira semana de infecção ($p < 0,01$). Por outro lado, entre a sexta e sétima semanas ocorreu um decréscimo gradativo nas concentrações dessa citocina, com $p < 0,001$, quando comparado com o ExoAg.

Observou-se ainda que na décima semana os valores encontrados foram menores que aquele das primeiras semanas na presença de ExoAg, com $p < 0,01$.

A produção de IFN- γ na presença de ExoAg foi estável nas primeiras semanas da infecção, principalmente até a 3^a semana ($p < 0,01$), caracterizando provavelmente o perfil Th1 da resposta. O sobrenadante tratado com ConA, mostrou um aumento gradativo até a sexta semana de infecção ($p < 0,001$), diferindo dos padrões na presença de ExoAg.

O pico máximo observado na liberação de IFN- γ foi entre a quarta e sexta semanas de infecção, com $p < 0,01$ (ExoAg) e $p < 0,001$ (ConA).

Esse resultado é semelhante aos encontrados na liberação de NO nas mesmas semanas de infecção.

Tanto as células dos animais infectados quanto à dos não infectados, quando cultivados na ausência de estímulo (ExoAg e LPS), produzem quantidades muito pequenas de IFN- γ , embora as células dos animais infectados sejam capazes de liberar maior quantidade que as células dos animais normais, com uma diferença estatisticamente significativa quando comparamos todas as semanas de infecção, com $p < 0,01$.

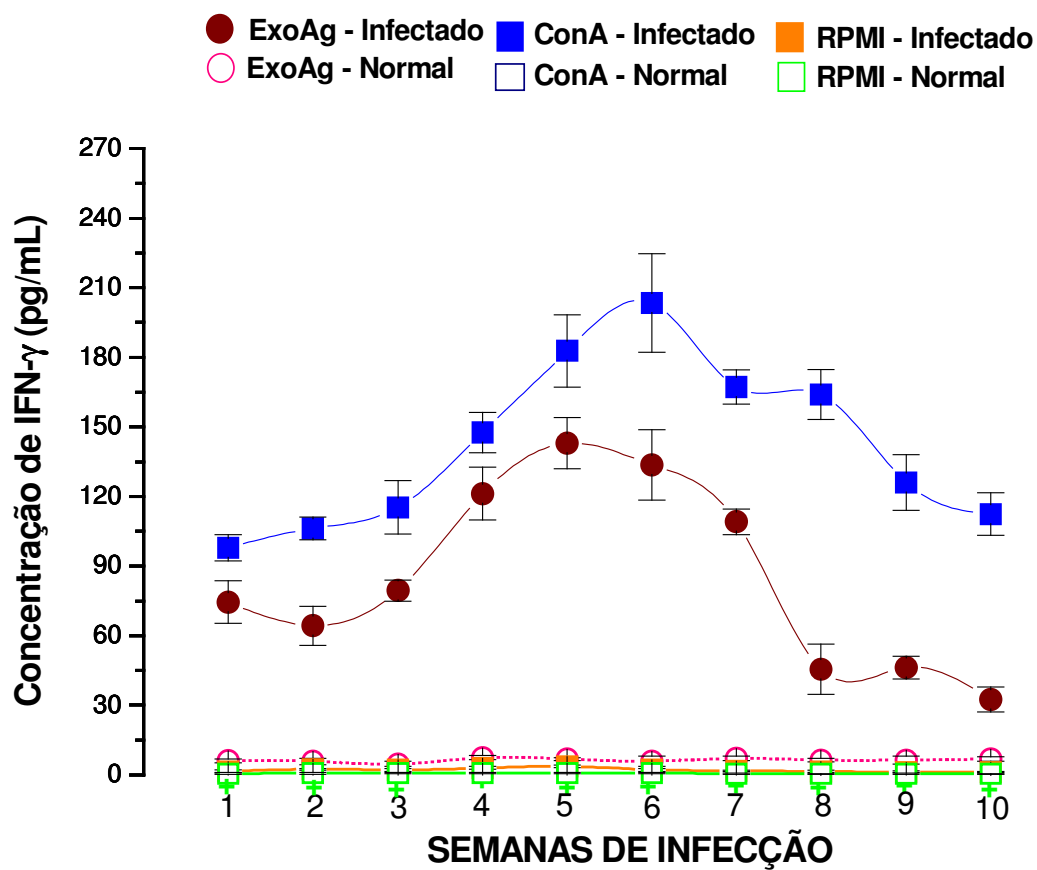


Figura 7 – Concentração de IFN- γ liberado nos sobrenadantes de cultura de células totais de linfonodos de camundongos Swiss normais e infectados com *S. schenckii* durante dez semanas. As células totais dos linfonodos de camundongos infectados e normais foram cultivadas em presença de exoantígeno, ConA e somente meio RPMI-1640C. As concentrações de IFN- γ foram calculadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IFN- γ . Os resultados foram expressos em pg/mL, como média \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção.

8. Determinação da Liberação de IL-2

A determinação da liberação de IL-2 foi realizada nos sobrenadantes das culturas de células totais dos linfonodos de camundongos Swiss normais e infectados durante dez semanas em presença do exoantígeno do fungo, ConA ou somente meio de cultura RPMI-1640-C como controle. Os resultados foram calculados através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IL-2 e estão representados na Figura 8 e Tabela 8.

Em presença do exoantígeno, as células totais dos linfonodos dos animais infectados produziram altas concentrações de IL-2 nas três primeiras semanas de infecção, com pico de liberação entre a primeira e terceira semanas, com $p < 0,01$ quando comparada estas semanas com a décima, e decréscimo a partir da quarta até a décima semana, sendo $p < 0,001$ quando se compara a quarta semana com a décima.

As células dos animais infectados quando estimuladas com a ConA, liberaram quantidades decrescentes de IL-2 até a quarta semana, sendo $p < 0,001$ quando se compara a primeira semana com a quarta semana, e com decréscimo a partir da quinta até a décima semana de infecção, com $p < 0,01$ entre a quinta e a décima semanas.

Quando as células dos animais infectados foram cultivadas em presença de ConA ou do exoantígeno, observa-se que a liberação de IL-2 em presença de qualquer destes estímulos ocorre de forma relativamente

constante no decorrer das dez semanas estudadas. Mas pode-se verificar também que a ConA é mais eficaz em estimular a liberação de IL-2 pelas células totais dos linfonodos que o exoantígeno em quase todas as semanas estudadas (exceto oitava) com $p < 0,05$ entre elas.

Tanto as células dos animais infectados quanto aquelas dos não infectados, quando cultivadas na ausência de estímulo produzem quantidades muito pequenas de IL-2 não havendo diferenças significativas quando se comparam as dez semanas entre si.

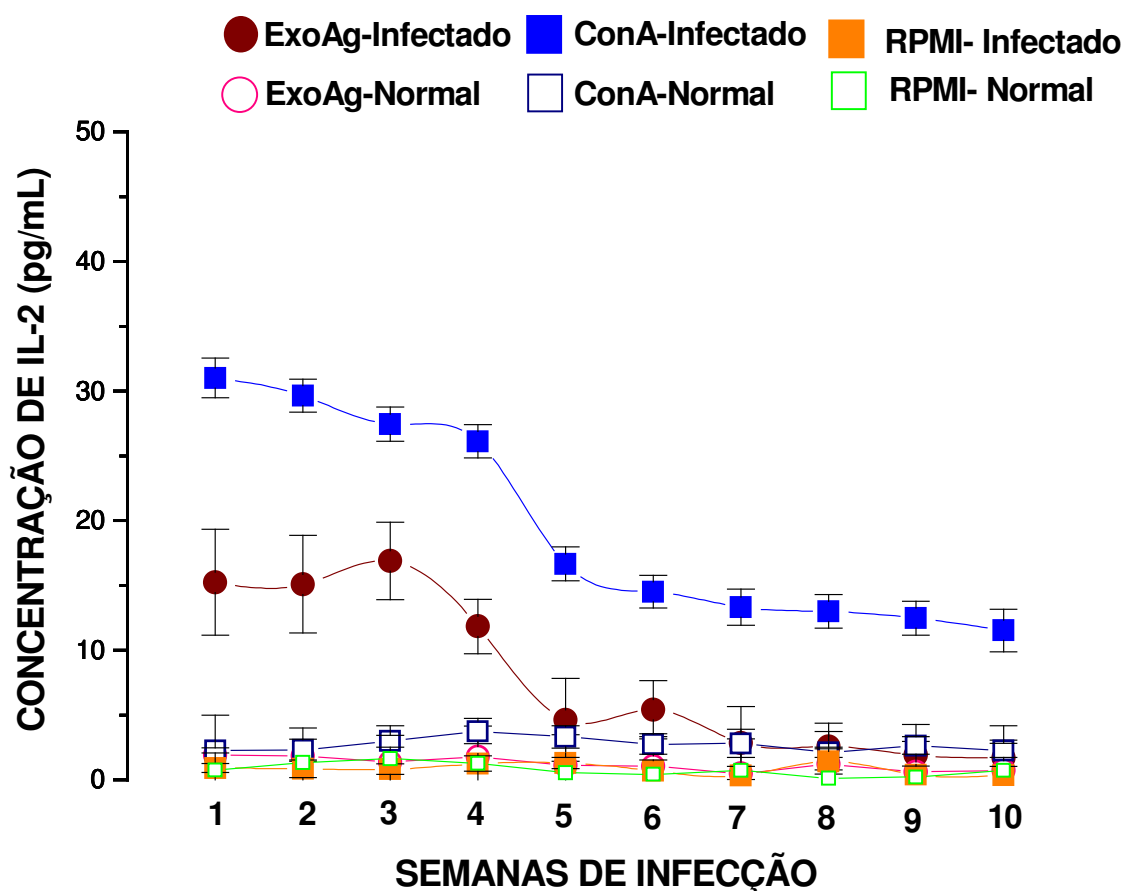


Figura 8 – Concentração de IL-2 liberada nos sobrenadantes de cultura de células totais de linfonodos de camundongos Swiss normais e infectados com *S. schenckii* durante dez semanas. As células totais dos linfonodos de camundongos infectados e normais foram cultivadas em presença de exoantígeno, ConA e somente meio RPMI-1640C. As concentrações de IL-2 foram calculadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IL-2. Os resultados foram expressos em pg/mL, como média \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção.

9. Determinação da Transformação Linfocitária

A determinação da transformação linfocitária foi realizada empregando-se culturas de células totais de linfonodos de camundongos Swiss normais e infectados durante dez semanas em presença do exoantígeno do fungo, ConA ou somente meio de cultura RPMI-1640-C como controle. Os resultados estão representados na Figura 9 e Tabela 9.

Em presença do exoantígeno observou-se aumento da incorporação da timidina durante as três primeiras semanas e após este período, uma baixa linfoproliferação entre a quarta e sexta semanas, com diferenças estatisticamente significativas entre a primeira e a quarta semanas e entre a sexta e a décima, com $p < 0,001$ para ambas.

Quando cultivadas em presença de ConA observou-se uma alta incorporação de timidina na primeira semana, com um declínio na incorporação até a sexta semana ($p < 0,001$) e a partir daí, aumento até a décima semana, com $p < 0,01$ quando se compara a sexta com a décima semana. Observou-se que em presença da ConA houve maior incorporação de timidina do que quando usamos o exoantígeno do fungo como estímulo, com diferenças estatisticamente significativas quando comparamos as dez semanas entre si tratadas com a ConA e o exoantígeno, com $p < 0,001$. As células dos animais infectados em presença de ConA incorporaram mais timidina triciada do que em presença do ExoAg em todas as semanas de infecção com $p < 0,001$ entre elas.

Quando as células dos animais normais são cultivadas na ausência de estímulo, verifica-se baixa incorporação de timidina durante todo o período estudado não havendo diferença estatisticamente significativa entre o ExoAg e a ConA.

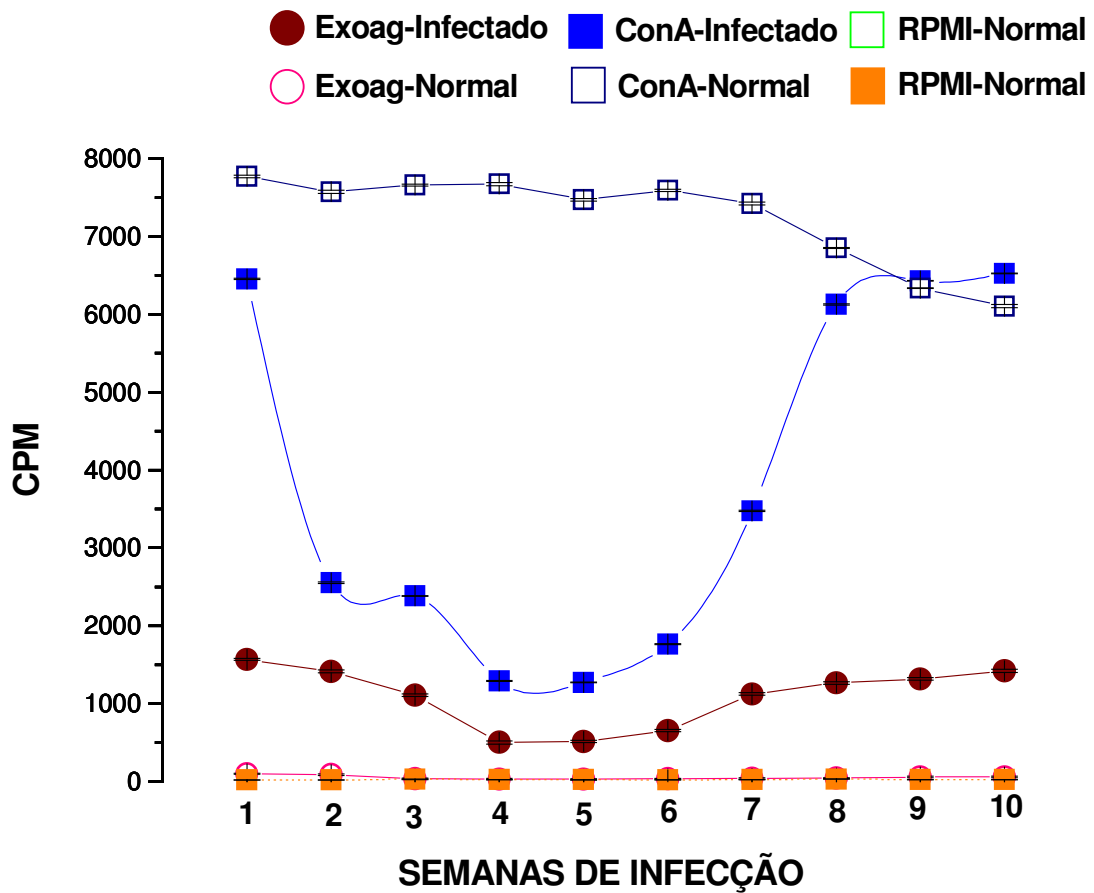


Figura 9 – Incorporação da timidina tritiada em cultura de células totais de linfonodos de camundongos Swiss infectados e não infectados com *S. schenckii* durante dez semanas de infecção. As culturas de células totais de linfonodos foram cultivadas em presença de ExoAg, ConA e somente meio RPMI-1640C de animais infectados e normais. Os resultados foram expressos em CPM, como média \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção.

10. Determinação da Liberação de IL-6

A cultura celular foi acrescida de LPS, ExoAg e somente meio RPMI-1640C. Os resultados obtidos nas diferentes semanas de infecção estão representados na Tabela 10 e Figura 10.

As células dos animais infectados frente ao ExoAg, apresentaram altos níveis de concentração de IL-6 entre a primeira e a sexta semanas de infecção, com $p < 0,001$ em ambas. As maiores concentrações de IL-6 observadas durante a quarta e sexta semanas de infecção coincidem com o aumento dos níveis de NO através da ativação de macrófagos. A partir da sétima semana, houve um decréscimo na liberação de IL-6, persistindo até a décima semana, tanto utilizando o ExoAg como o LPS.

Já as células dos animais infectados expostas ao LPS, apresentaram o mesmo perfil de resposta quando expostas ao ExoAg, porém maiores a partir da quarta semana, com níveis de significância $p < 0,01$ entre eles.

Os macrófagos peritoneais dos animais normais, frente ao ExoAg e LPS, produziram elevadas concentrações de IL-6. Verificou-se que o ExoAg foi mais eficiente em estimular a liberação de IL-6 pelas células dos animais não infectados do que o LPS, com $p < 0,01$ em quase todas as semanas (exceto sexta semana).

Ao contrário do que se esperava, o exoantígeno foi mais eficiente em estimular a liberação de IL-6 pelas células dos animais não infectados do que o LPS.

Na ausência de estímulos, tanto as células dos animais infectados quanto os normais produziram baixas concentrações de IL-6. Porém, as células dos animais infectados liberam mais IL-6 que os normais, sendo as diferenças estatisticamente significativas, com $p < 0,01$ comparando as dez semanas entre si.

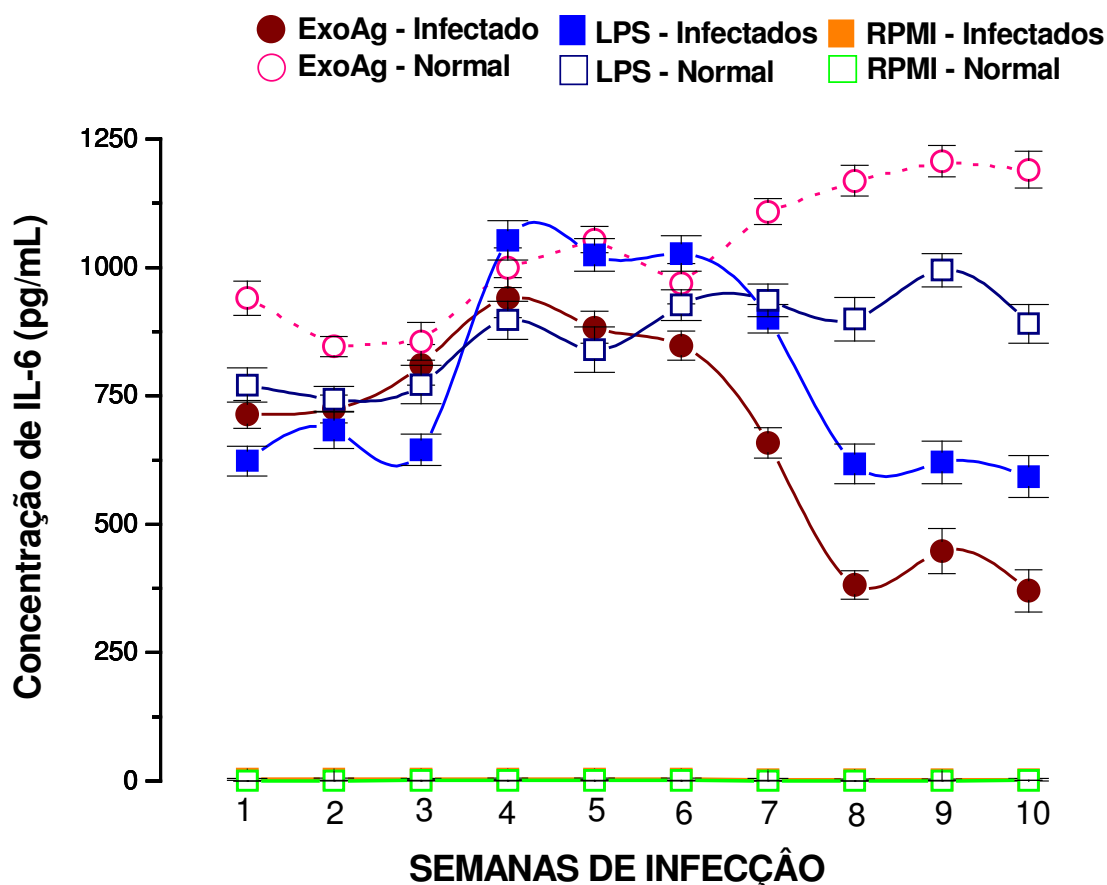


Figura 10 – Concentração de IL-6 liberada nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss infectados e não infectados com *S. schenckii* durante dez semanas de infecção. As culturas de macrófagos de animais infectados e não infectados foram cultivadas em presença de ExoAg, LPS e somente meio RPMI-1640C. As concentrações de IL-6 foram calculadas através de teste imunoenzimático (ELISA) utilizando uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas de IL-6. Os resultados foram expressos em pg/mL, como média \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção.

11. Determinação da Liberação de IL-10

A determinação da liberação de IL-10 foi realizada nos sobrenadantes das culturas de células totais dos linfonodos de camundongos Swiss normais e infectados durante dez semanas em presença do exoantígeno do fungo, ConA ou somente meio de cultura RPMI-1640-C como controle. Os resultados foram calculados por reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IL-10 e estão representados na Figura 11 e Tabela 11.

Em presença do exoantígeno, as células totais dos linfonodos dos animais infectados produziram altas concentrações de IL-10 nas três primeiras semanas de infecção, com pico de liberação entre a primeira e quarta semanas, com $p < 0,01$ quando se compara esta semana com a décima, e decréscimo a partir da sétima até a décima semana, sendo $p < 0,001$ quando se compara a quinta semana com a décima.

As células dos animais infectados quando estimuladas com a ConA, liberaram quantidades praticamente constantes de IL-10 até a quinta semana, sendo $p < 0,001$ quando se compara a primeira semana com a sexta semana, e com decréscimo a partir da sexta até a décima semana de infecção, com $p < 0,01$ entre a sexta e a décima semana.

Quando as células dos animais não infectados foram cultivadas em presença de ConA ou do exoantígeno, observa-se que a liberação de IL-10 em presença de qualquer destes estímulos ocorre de forma relativamente constante no decorrer das dez semanas estudadas. Mas

pode-se verificar também que a ConA é mais eficaz em estimular a liberação de IL-10 pelas células totais dos linfonodos que o exoantígeno .

Tanto as células dos animais infectados quanto aquelas dos não infectados, quando cultivadas na ausência de estímulo produzem quantidades muito pequenas de IL-10.

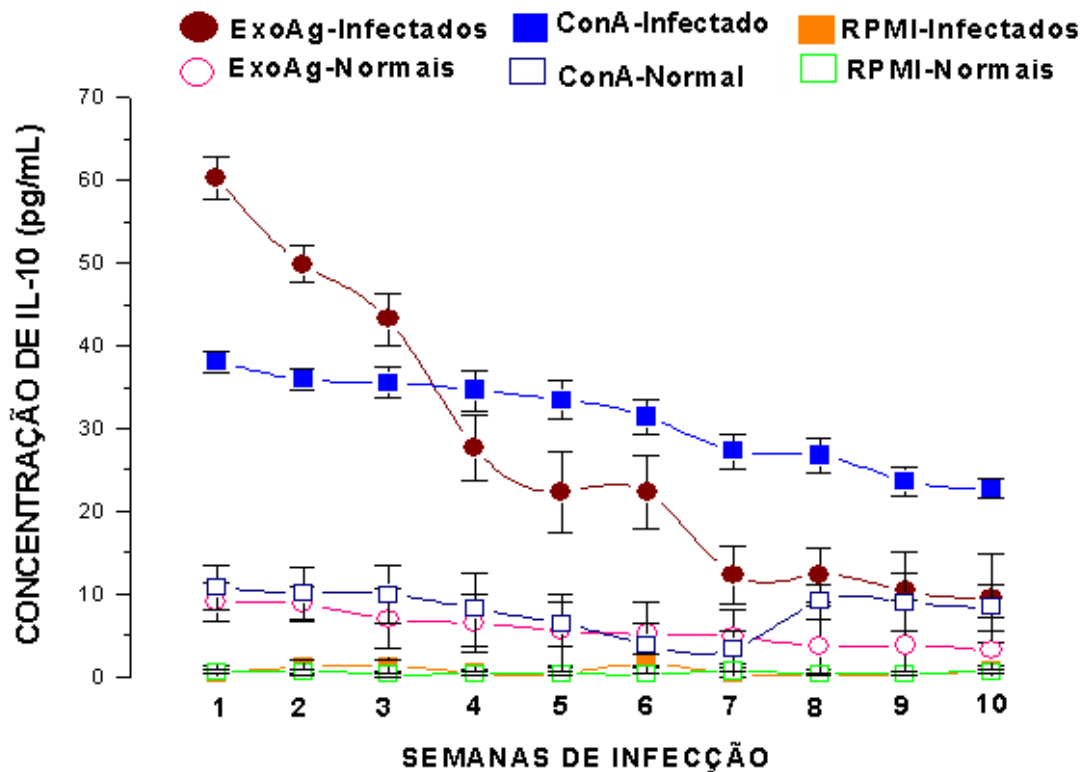


Figura 11 – Concentração de IL- 10 liberada nos sobrenadantes de cultura de células totais de linfonodos de camundongos Swiss normais e infectados com *S. schenckii* durante dez semanas. As células totais dos linfonodos de camundongos infectados e normais foram cultivados em presença de exoantígeno, ConA e somente meio RPMI-1640C. 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 animais por semana de infecção.

12. Determinação da Liberação de IL-4

A cultura celular foi realizada na presença de ConA, ExoAg e somente meio RPMI-1640C. Os resultados obtidos nas diferentes semanas de infecção estão representados na Figura 12 e Tabela 12.

Observou-se no sobrenadante das células totais dos linfonodos dos animais infectados tratadas com ExoAg, um aumento gradativo, a partir da primeira semana de infecção, da concentração durante todas as semanas de infecção, com nível de significância de $p < 0,001$ entre todas elas. A maior concentração de IL-4 foi notada durante a décima semana ($p < 0,001$) de infecção fúngica.

Na presença de ConA, as mesmas células infectadas apresentaram um padrão de resposta que difere daquele observado com o ExoAg diminuindo gradativamente no decorrer das dez semanas de infecção, com $p < 0,01$.

Em presença de ConA, as células dos linfonodos totais dos animais normais liberam maior quantidade de IL-4 comparando-se com as mesmas células frente ao ExoAg em todas as semanas de infecção, com $p < 0,01$.

A produção de IL-4 pelas células de camundongos infectados quando comparadas com as dos normais foi pouco expressiva. Porém, verificou-se que as células dos animais infectados liberam mais IL-4 que os

animais não infectados, sendo as diferenças estatisticamente significativas, com $p < 0,01$ comparando as dez semanas entre si.

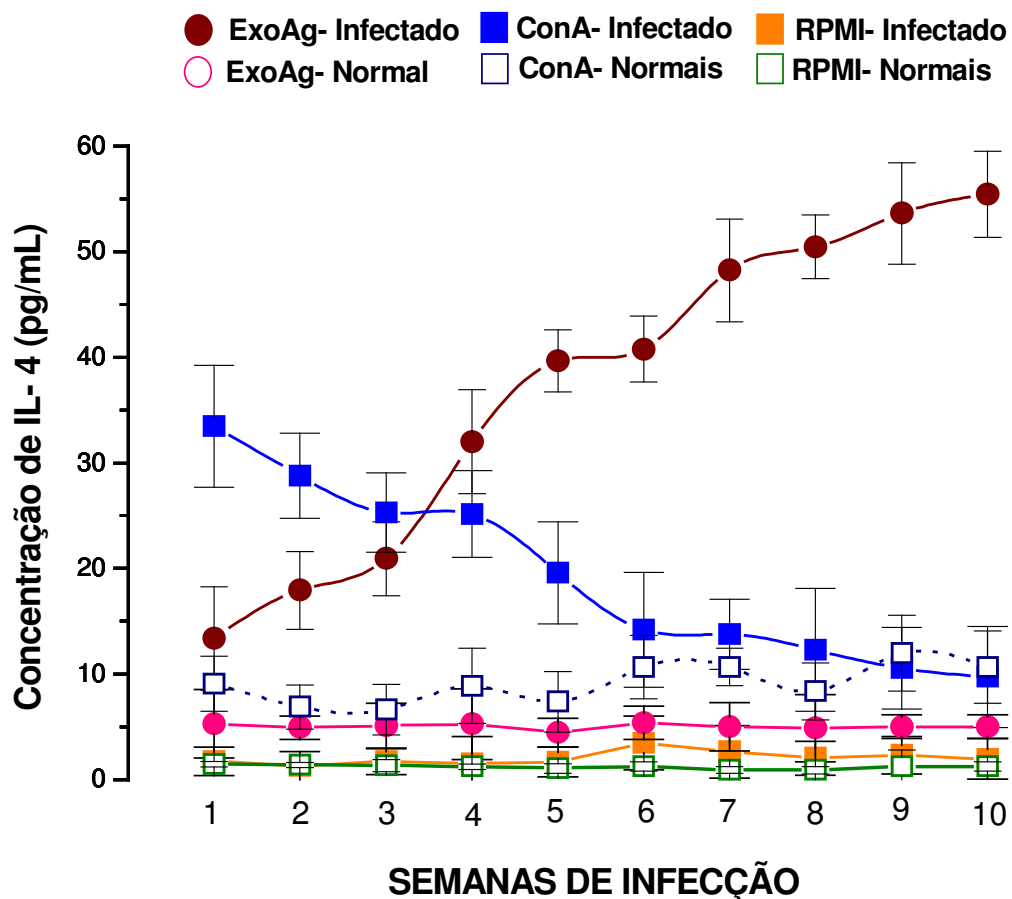


Figura 12 – Concentração de IL-4 liberada de células totais de linfonodos de camundongos Swiss infectados e não infectados com *S. schenckii* durante dez semanas. As culturas de células de linfonodos totais foram cultivadas em presença de ExoAg, ConA e somente meio RPMI-1640C de animais infectados e não infectados. As concentrações de IL-4 foram calculadas através de teste imunoenzimático (ELISA) utilizando reta padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas de IL-4. Os resultados foram expressos em pg/mL, como média \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção.

13. Detecção de anticorpos IgG durante o período de infecção

A detecção de IgG foi realizada utilizando soro inativado de animais infectados e com o fungo *Sporothrix schenckii*. Foram selecionadas quatro diluições dos soros obtidos dos animais infectados para detectar a presença de IgG durante as dez semanas de infecção. Os resultados obtidos nas diferentes semanas de infecção estão representados na Figura 13 e Tabela 13.

Observou-se na diluição 1/20 resultados significativos para a detecção de IgG, quando se compara a segunda com a quarta semana de infecção com $p < 0,01$ e a segunda com a décima semana, com $p < 0,001$ considerado extremamente significativo.

Na diluição de 1/320 observou-se valores significativos para a presença de IgG entre a segunda e sexta semana, com $p < 0,01$ e segunda com a décima com $p < 0,05$ para as semanas estudadas.

Com relação à diluição de 1/2560 os valores foram significativos quando comparadas a segunda com a sexta semana de infecção, $p < 0,05$, e quarta com a décima semana com $p < 0,01$, considerado extremamente significativo.

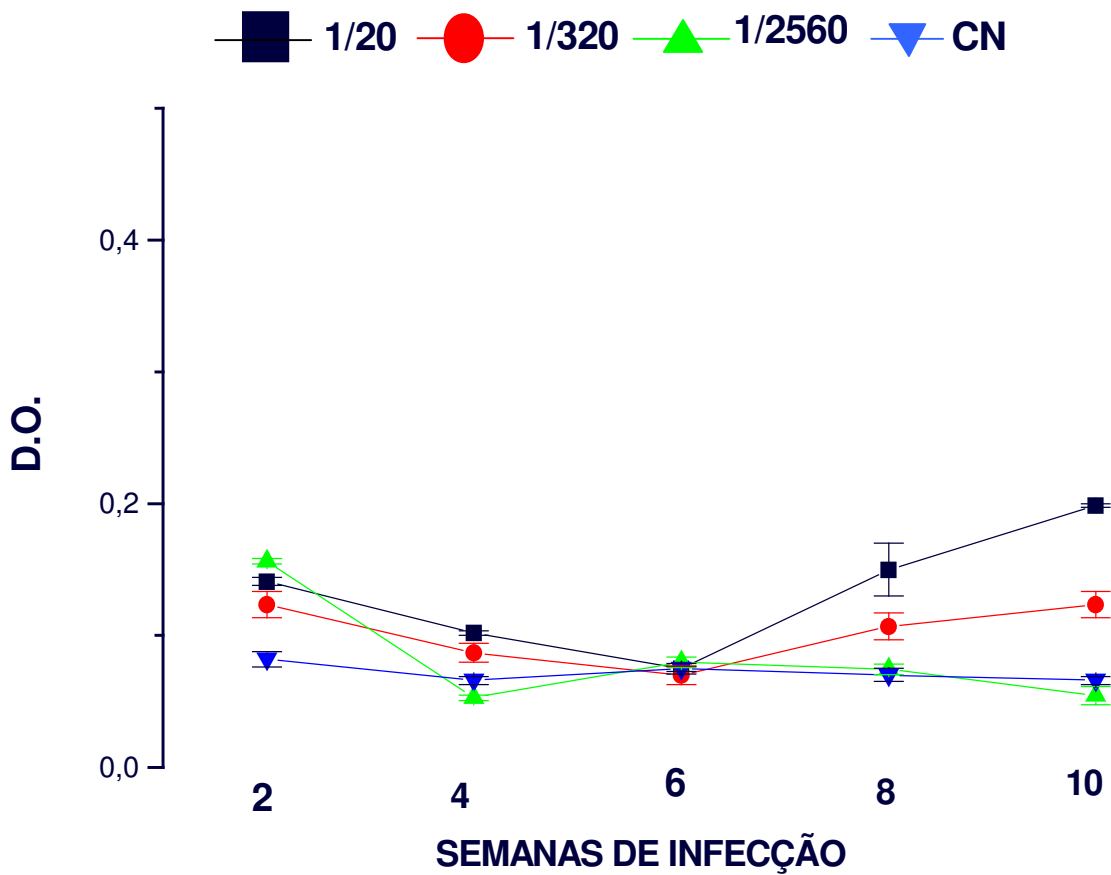


Figura 13 – Detecção de IgG do soro de camundongos Swiss infectados com *S. schenckii* durante dez semanas nas diluições de 20, 320, 2560. O valor de referência “cut off” determinado com soros de animais normais foi de $0,067 \pm 0,010$ de absorvância. Os resultados foram expressos em D.O., como média \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção.

Quadro1 - Representação dos resultados observados na esporotricose experimental:

Resultados animais infectados frente ExoAg	1 ^a a 3 ^a Semana	4 ^a a 6 ^a Semana	7 ^a a 10 ^a Semana
Viabilidade Celular	↑	↓	↑
Atividade da enzima iNOS	↓	↑	↓
Liberação de óxido nítrico	↓	↑	↓
Liberação de IL-1 β	↑	↓	↑
Liberação de TNF- α	↓	↓	↑
Liberação de IL-12 p40	↓	↑	↓
Liberação de IFN- γ	↓	↑	↓
Liberação de IL-2	↑	↓	↓
Transformação linfocitária	↑	↓	↑
Liberação de IL-6	↓	↑	↓
Liberação de IL-10	↑	↓	↓
Liberação de IL-4	↓	↑	↑
Detecção de anticorpos IgG	↑	↓	↑

V. DISCUSSÃO

O estudo da resposta do hospedeiro para vários fungos patogênicos tem crescido significativamente nos últimos anos, especialmente devido ao aumento de infecções diagnosticadas em pacientes imunocomprometidos (CLEMONS, 2000). Está claro que os componentes inato, mediado por células e humoral desempenham papel fundamental na resposta imune aos fungos (ROMANI e KAUFMANN, 1998).

A esporotricose é uma micose subcutânea, causada pelo fungo *Sporothrix schenckii*, geralmente é localizada, atingindo a pele e os vasos linfáticos, algumas vezes o pulmão, ossos e articulações (BELKNAP, 1989). A capacidade da resposta imune do hospedeiro determina o grau de invasão do fungo patogênico (ALBONORZ et al., 1986).

Os mecanismos imunológicos envolvidos no controle da esporotricose envolvem ambas as imunidade celular e humoral. Nesse trabalho foi analisada a inter-relação da imunidade inata e adaptativa através de seus mediadores que podem agir de maneira coordenada ao longo da infecção sistêmica induzida pelo *Sporothrix schenckii*.

A participação efetiva dos macrófagos ativados por células T CD4+ foi confirmada na esporotricose experimental (SILVA et al., 2001). Esse mecanismo tem sua importância na defesa contra o *Sporothrix schenckii* juntamente com as células T que possuem papel fundamental na resistência a esta infecção, inibindo o crescimento do fungo nos órgãos (SHIRAISHI et al., 1992).

Para avaliar a resposta imune à infecção pelo *Sporothrix schenckii*, neste trabalho foram utilizados macrófagos obtidos do exsudato peritoneal e células de linfonodos de camundongos infectados, em comparação com as mesmas células de animais normais, ou seja, não infectados.

O primeiro questionamento do trabalho foi avaliar como a viabilidade das células do hospedeiro se comportaria ao longo da infecção experimental. A análise da citotoxicidade do exoantígeno (ExoAg) obtido a partir do meio de cultivo do *Sporothrix schenckii* foi realizada para avaliar o comportamento das células em cultura.

Nos resultados apresentados nesse trabalho, observou-se que as células dos animais infectados estão mais suscetíveis às condições de cultura, seja em presença de estímulo (ExoAg e LPS – Figura 1) ou mesmo na ausência desses, quando comparadas com as células dos animais não infectados nas mesmas condições de cultivo. Isso provavelmente ocorra porque as células dos animais normais não entraram em contato com o fungo, ao contrário dos animais infectados, onde as células já sensibilizadas estão em processo de defesa no animal.

Na literatura, a interação entre macrófagos e *Sporothrix schenckii* foi demonstrada em um modelo de esporotricose crônica na qual nódulos testiculares se formaram após a inoculação intraperitoneal em camundongos. Foi verificada a presença de macrófagos e fungos fagocitados, onde os nódulos apresentaram leveduras viáveis por seis meses, apesar de estarem internalizadas nos macrófagos (HIRUMA et al., 1998).

Na infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* os macrófagos ativados via IFN- γ , TNF- α e LPS produziram dois tipos de produtos com ação citotóxica: reativos intermediários do oxigênio e reativos intermediários do nitrogênio (GONZALEZ et al., 2000).

A geração de óxido nítrico pela isoenzima óxido nítrico sintase induzível ou NOS II, tem sido demonstrada na atividade antimicrobiana de macrófagos ativados contra uma variedade de patógenos intracelulares entre eles *Leishmania major* e *Leishmania monocytogenes* (RIVERA et al., 2002).

A iNOS induz a produção de grande quantidade de NO com importante atividade microbida antitumoral e antiparasítica. Os macrófagos são considerados os maiores produtores de iNOS por ativação dependente de citocinas (FORSTERMANN, 1995).

Nossos resultados demonstraram um aumento significativo da iNOS comparando o ExoAg e o LPS em todas as semanas de infecção (Figura 2). Houve maior produção de iNOS entre a quarta e sexta semana de infecção, seja em resposta ao exoantígeno ou ao LPS, provavelmente demonstrando uma tentativa de eliminação do fungo pelos macrófagos, através de uma via dependente de NO. O maior pico de produção da enzima foi observado no sobrenadante de cultura de macrófagos dos animais infectados na presença de LPS, demonstrando sua capacidade estimuladora de iNOS para a produção de NO. Os animais normais apresentaram valores muito baixos de expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível.

Kawakami et al. (1997) demonstraram que a iNOS estimula a geração de citocinas expressas por macrófagos ativados em uma cooperação conjunta da defesa do hospedeiro contra a infecção por *Cryptococcus neoformans*.

A estrutura do LPS é anfipática, composta de uma porção polissacarídica covalentemente ligada à região hidrofóbica da região do lipídio A. As respostas celulares dos macrófagos ao LPS são numerosas, praticamente cada aspecto da fisiologia dessas células é de algum modo influenciado pelo LPS. O LPS induz um aumento no consumo de glicose e oxigênio e então as células adquirem alta capacidade funcional, como a capacidade de matar microorganismos e células tumorais. Desse modo, os macrófagos desenvolveram um eficiente mecanismo para o reconhecimento do LPS, e portanto essa substância está entre os mais potentes estimuladores de macrófagos (ZWILLING & EISENSTEIN, 1994).

As moléculas de LPS são liberadas após a bacteriólise ou durante períodos de rápida proliferação bacteriana. Estão relacionados a várias respostas patofisiológicas em infecções bacterianas severas causadas por gram-negativos e inflamação generalizada (LANGHAS, 1996).

O conhecimento da importância do NO nos estados fisiológicos e patofisiológicos abriu uma gama de possibilidades, especialmente no entendimento dos mecanismos que modulam essa molécula efetora. A ativação da iNOS leva à produção de níveis micromolares de NO, quantidade muito maior do que o nível nanomolar gerado pela enzima constitutiva eNOS e nNOS (ACHIKE & KWAN, 2003).

Um grande número de modelos animais de doenças infecciosas e auto-imunes demonstrou que o óxido nítrico gerado pela iNOS possui propriedades imunoreguladoras e citotóxicas (LIANG-ZHAO, 2001).

Se por um lado o NO derivado da iNOS confere proteção contra muitas bactérias intracelulares e parasitas, ele também ajuda a combater várias infecções virais e está envolvido no controle de tumores. Por outro lado, a iNOS também promove a angiogênese tumoral e a metástase, e também destruição tecidual e doenças em vários modelos animais de auto-imunidade (BOGDAN, 1998).

O NO é uma molécula mensageira envolvida na regulação de diversos processos fisiológicos incluindo a contração da musculatura lisa, a reatividade plaquetária, a neurotransmissão central e periférica e as ações citotóxicas de células imunológicas. Essa molécula é crucial para muitas funções fisiológicas e a sua liberação inapropriada está ligada a numerosas patologias (HOBBS,1999).

Nessa pesquisa realizada com o exoantígeno obtido do *Sporothrix schenckii*, foi possível observar uma grande produção de NO (Figura 3), ocasionada pela estimulação dos macrófagos por LPS. Os maiores níveis de NO nas dez semanas estudadas foram observados entre a quarta e sexta semana de infecção. Esse período coincide com o período de supressão verificado em estudos anteriores realizados em nosso laboratório (CARLOS et al., 1992; 1994; 1999). Isso sugere que a produção de NO durante a infecção causada pelo *S. schenckii* tem efeito supressor no período entre a quarta e

sexta semana, e que a redução da produção nas semanas posteriores está relacionada à atividade microbicida dos macrófagos e à remissão da infecção. Os animais normais produziram quantidades relativamente constantes de NO no decorrer das dez semanas, seja em presença de LPS ou Exoag. Quando na ausência de estímulo os animais infectados produziram baixa concentração de NO, durante todo o período estudado.

Esses resultados são concordantes com aqueles observados por Bocca et al. (1998) onde, através de estudos com o fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, observaram que há produção espontânea de NO com depressão da resposta ao antígeno do fungo ou a mitógenos (ConA), com um visível aumento das lesões pulmonares. Quando a produção de NO foi inibida nesses animais observou-se aumento na liberação do TNF- α que reverteu a falha da capacidade imunoproliferativa e reduziu as lesões pulmonares, porém com elevação da carga fúngica nos pulmões. Portanto, apesar do NO ser importante na eliminação do fungo, a produção de NO durante a infecção contribuiu para um estado de imunossupressão durante a mesma.

Os macrófagos esplênicos de camundongos infectados com *Histoplasma capsulatum* expressam iNOS e esta expressão está correlacionada à gravidade da doença. Assim foi observado que a produção de NO está associada à atividade supressora dos macrófagos nesta infecção e parece também estar relacionada à resposta anti-proliferativa das células do baço de camundongos infectados (LANE et al., 1994).

Nascimento et al. (2002) demonstraram que camundongos suscetíveis ao *P. brasiliensis* produziram maiores concentrações de NO e por maior período enquanto que os animais resistentes produziram maiores quantidades de TNF- α . Com isso, acredita-se que o aumento na produção de NO e TNF- α está relacionado à suscetibilidade ou resistência à infecção. A inibição do NO permite que os animais apresentem lesões teciduais extensivas com o aumento da carga fúngica em suas vísceras, quando comparados com os controles. Assim, o NO derivado da iNOS parece ser essencial para a resistência ao fungo *P. brasiliensis*, mas a produção excessiva dessa molécula efetora está associada a suscetibilidade.

A iNOS é necessária para a resposta imune contra infecções. Em pacientes com esporotricose observou-se que a produção de IFN- γ pelas células do granuloma está, provavelmente, relacionada à geração de hipersensibilidade tardia, direcionando a resposta para um perfil Th1 (KOGA et al., 2002).

Gonzalez et al. (2000) observaram que a produção de NO pelos macrófagos peritoneais induzida pelo IFN- γ foi capaz de restringir o crescimento intracelular do *P. brasiliensis*, indicando um mecanismo efetor importante. O IFN- γ exerce efeito protetor na paracoccidiodomicose e parece ser o principal mediador da resistência contra a infecção fúngica em modelo murino, promovendo ação antifúngica dos macrófagos através da produção de NO.

Em modelo experimental de leishmaniose, a incapacidade de controlar a infecção foi correlacionada com a ausência na produção de IFN- γ pelas células

T e na falha da ativação de macrófagos em destruir o parasita intracelular. Estudos demonstraram que em macrófagos ativados via TNF- α e iNOS o parasita conseguia ser eliminado pelas células fagocíticas (MOSSALAYI et al., 1999).

Remeteria et al. (1995) observaram que a *Candida albicans* estimula a produção de iNOS em macrófagos peritoneais murinos aumentando a capacidade dessas células em destruir estes microorganismos.

O NO tem sido mostrado em modelos de doenças inflamatórias, como um mecanismo importante para aumentar o fluxo sangüíneo no local da inflamação e assim, permitir o recrutamento de células efectoras Th1 (REDEGELD et al., 1997).

A produção de NO, também tem sido relacionada à supressão nas doenças bacterianas. Estudos verificaram que o NO está envolvido na imunossupressão causada pela bactéria *Listeria monocytogenes* (MACFARLAN et al., 1998).

Goldeman et al. (2000) observaram a exacerbação da infecção por *C. neoformans* em camundongos através da inibição da síntese de iNOS através da administração de análogos da arginina. No modelo estudado, a redução da expressão da iNOS proporciona uma infecção persistente. Ainda demonstram que as células do granuloma formado pela infecção fúngica produzem baixos níveis de iNOS.

A síntese de NO através da iNOS é induzida por várias citocinas incluindo IFN- γ , IL-1 β , TNF- α e linfotoxinas. A IL-1 β é uma citocina potente que tem sido associada com várias condições patológicas como infecção, inflamação e condições de malignidade. O aumento da produção dessa citocina pode ser correlacionado com o aumento da citotoxicidade e da eficácia da atividade bactericida das células efetoras imunológicas (BOSE & FARNIA, 1995).

A amplitude dos sinais intracelulares induzidos pelas citocinas IL-1 β e TNF- α depende do número de ligantes solúveis e de receptores de membrana expressos pela célula alvo (SPÖRRI et al., 2001).

Em nosso trabalho, obtivemos resultados muito interessantes em relação a IL-1 β . Ocorreu uma depressão na liberação dessa citocina entre a quarta e sexta semana de infecção quando as células dos animais infectados foram cultivadas em presença do ExoAg ou LPS (Figura 4). Essa depressão coincide com o período de maior liberação de NO e iNOS, caracterizado por ser um período de imunossupressão e de maior comprometimento do animal. As células dos animais normais produziram quantidades relativamente constantes no decorrer das dez semanas de infecção quando cultivadas na presença de ExoAg e LPS. Na ausência de estímulo, tanto as células dos animais normais quanto as dos infectados produziram baixas quantidades de IL-1 β .

Esses resultados são compatíveis com trabalhos anteriores realizados por Carlos et al. (1994) onde a produção de IL-1 e TNF- α ocorrem principalmente nos estágios iniciais e finais da esporotricose experimental, e

esta redução na produção de IL-1 e TNF- α entre a quarta e sexta semana de infecção parecem estar relacionadas à depressão na resposta apresentada neste período.

Os resultados de liberação de IL-1 β são concordantes com aqueles observados na liberação de TNF- α , visto que são citocinas que atuam em conjunto, pois ambas são consideradas como mediadores pró-inflamatórios produzidos por macrófagos ativados. Assim, também foi encontrada baixa liberação de TNF- α entre a quarta e sexta semana de infecção quando as células dos animais infectados foram cultivadas em presença de ExoAg e LPS (Figura 5), período de maior comprometimento do hospedeiro, com picos de liberação dessa citocina nas semanas finais de infecção, o que reflete a recuperação do hospedeiro. As células obtidas de animais normais quando em presença do LPS, produziram elevada quantidade de TNF- α quando comparada com o ExoAg. Os animais infectados e normais na ausência de estímulo produziram baixas quantidades de TNF- α durante as dez semanas de infecção.

A baixa produção de TNF- α entre a quarta e sexta semana está relacionada ao período de imunossupressão observado na infecção provocada pelo *Sporothrix schenckii*. Uma vez que o TNF- α é uma citocina muito importante na regulação da resposta imune e inflamatória, essa redução na sua produção pode estar favorecendo uma depressão na cascata de citocinas que participam da resposta imune, gerando um estado de imunossupressão. O TNF- α também participa no processo de recuperação tecidual e de cicatrização

(BEUTLER,1995). A alta produção de TNF- α nas semanas finais da infecção fúngica indica a eliminação do patógeno e reparo tecidual.

Sisto et al. (2003) demonstraram uma via dependente de TNF- α e IFN- γ no desenvolvimento de uma imunidade protetora na infecção por *Penicillium marneffe*. Estudos com outros patógenos demonstraram que a ausência de IFN- γ não diminui a produção da outra. O TNF- α e o IFN- γ são essenciais para expressão de iNOS nos macrófagos. Em estudos realizados utilizando camundongos nocaute para IFN- γ , esses sofreram uma deficiência na expressão de iNOS que pode levar ao desenvolvimento de uma infecção fatal por *P. marneffe*. Isso demonstra que o NO contribui para a morte celular do patógeno por células de macrófagos murinos *in vitro*.

Isso leva a crer que a depressão apresentada entre a quarta e sexta semana de infecção por *S. schenckii* na liberação de TNF- α parece comprometer o organismo hospedeiro. Correlacionando com os altos índices de NO apresentados anteriormente no período citado, a liberação de TNF- α é suprimida levando a uma maior suscetibilidade do hospedeiro frente a infecção esporotricótica (MAIA, 2005- anexo II).

Souto et al. (2000) investigaram o papel do TNF- α e IFN- γ na resistência a infecção pelo fungo *P. brasiliensis* em camundongos. Observaram que animais deficientes em receptores para essas duas citocinas eram incapazes de controlar o crescimento das células leveduriformes e sucumbiam frente à infecção. Por outro lado, animais selvagens (normais) produziram altos níveis

de NO resultando em baixa proliferação das células T em resposta a ConA. Assim, concluíram que a produção de TNF- α e IFN- γ medeiam a resistência à infecção pelo *P. brasiliensis* e induz a produção de NO que determina a não responsividade das células T.

A IL-12 é uma citocina heterodimérica composta pelas cadeias p35 (constitutiva) e p40 (induzível) que se encontram ligadas covalentemente e exercem um grande número de efeitos pleiotrópicos (KOBAYASHI et al., 1989; BRUNDA et al., 1994). Ela é produzida por macrófagos e, em menores proporções, por linfócitos B. A IL-12 atua sobre células NK induzindo a produção de IFN- γ (D'ANDREA et al., 1992; GAZZINELLI et al., 1993) Além disso, a IL-12 induz a diferenciação de células CD4+ Th1 e subseqüentemente o desenvolvimento da resposta imune celular. Dessa forma, ela pode constituir uma importante ligação entre os mecanismos da resistência inata e da imunidade adquirida (TRINCHIERI, 1994).

Os resultados de determinação de IL-12 durante esse trabalho pelos macrófagos peritoneais de camundongos infectados com o *S. schenckii* evidenciaram um aumento crescente na produção da citocina até a sexta semana de infecção com posterior declínio até o final da infecção em presença de ExoAg e LPS (Figura 6), sugerindo a participação de uma resposta Th1 ou imune celular. As células dos animais não infectados não responderam ao estímulo do ExoAg e LPS para liberação de IL-12.

Koga et al. (2001) realizaram estudos demonstrando que as células dendríticas também estão presentes no granuloma da esporotricose, seja

atuando como célula apresentadora de antígeno ou pela produção de IL-12 gerando uma resposta Th1.

Cenci et al., (2000) reportaram que a resistência a aspergilose pulmonar invasiva em camundongos imunocomprometidos foi dependente de baixos níveis de TNF- α , IL-12 e IFN- γ . Desse modo verificaram que a suscetibilidade à doença estava condicionada a não produção dessas citocinas.

A IL-12 é muito importante na imunossupressão induzida pelo NO em infecção causada pela bactéria *S. typhimurium*, através de sua capacidade de estimular a produção de IFN- γ por macrófagos supressores, produtores de NO (SCHAWACHA & EISENSTEIN, 1997).

As células T “helper” agem como papel central na regulação da resposta imune por secretar citocinas que modulam o desenvolvimento das atividades imuno efetoras (MENCACCI, 1998).

A produção precoce de IFN- γ pelas células T durante uma infecção pode afetar significativamente a resistência do microorganismo patogênico por induzir preferencialmente a diferenciação de células Th1, que favorece a resposta mediada por célula, contra a Th2 que favorece uma resposta humoral, freqüentemente insuficiente à infecção (D'ANDREA et al., 1992).

Os resultados de determinação de IFN- γ durante esse trabalho pelos linfócitos de camundongos infectados com o *S. schenckii* coincidem com aqueles apresentados quanto à produção de IL-12, já que a IL-12 ativa as células T a secretarem IFN- γ . Observou-se baixa produção de IFN- γ nas

primeiras três semanas de infecção, com picos de liberação entre a quarta e sexta semana de infecção tanto para as células frente ao ExoAg como frente à ConA (Figura 7). Ainda em contato a esses antígenos, ocorreu um decréscimo na produção de IFN- γ a partir da sétima semana, persistindo até a décima semana de infecção. Os animais normais apresentaram baixa liberação de IFN- γ durante as dez semanas de infecção tanto quando estimulados com ExoAg ou ConA. Os animais infectados e normais apresentaram pouca produção de IFN- γ na ausência de estímulo.

Em estudos realizados com a infecção causada por *P. brasiliensis*, uma alta produção de IFN- γ apresenta papel protetor em diferentes grupos de camundongos, se comportando como o maior mediador na resistência contra a infecção fúngica no camundongo, associada à produção de NO (GONZALEZ et al., 2000).

A IL-18 foi clonada como um fator indutor de IFN- γ , que juntamente com a IL-12, ativa sinergicamente a produção de IFN- γ em células T, B e NK. A importância da produção de IFN- γ na resposta a *Listeria monocytogenes* e *Toxoplasma gondii* está na ativação de macrófagos por essa citocina em produzir IL-12 e IL-18 que irão levar à formação de altas concentrações de IFN- γ e desenvolver uma resposta imune celular protetora (FUKAO et al., 2000).

Durante a infecção experimental murina com o fungo *H. capsulatum* observou-se que os efeitos protetores da IL-12 são mediados através da indução de IFN- γ (ZHOU et al., 1995).

Zhang et al. (1997) relataram que a IL-12 e a IL-18 agem sinergicamente na indução da produção de IFN- γ e NO por células do exsudato peritoneal, estimulando a atividade fungicida dessas células contra o *C. neoformans*.

Cano et al. (1998) demonstrou em modelo animal de paracoccidiodomicose que a depleção de IFN- γ juntamente com a administração de anticorpos anti- IFN- γ exacerbam a infecção fúngica deixando o animal suscetível à infecção. Isso indica a necessidade de IFN- γ para o desenvolvimento da imunidade protetora e a eliminação do fungo em modelo de paracoccidiodomicose pulmonar.

A IL-6 é uma citocina multifuncional que atua regulando a resposta imune, hematopoiese, proteínas de fase aguda, entre outras funções indicando que esta citocina desempenha um papel central nos mecanismos de defesa do hospedeiro (KISHIMOTO, 1989).

Os resultados apresentados nesse trabalho mostram elevada produção de IL-6 pelos macrófagos peritoneais de camundongos infectados com *S. schenckii* ao longo de todo o período estudado. Os picos na produção de IL-6 foram vistos principalmente entre a quarta e sexta semanas de infecção quando em presença de LPS e ExoAg (Figura 10). Foi verificado que o ExoAg foi mais eficiente em estimular a produção de IL-6 nos animais normais do que o LPS em quase todas as semanas de infecção (exceto na sexta). Na ausência de estímulo tanto as células dos animais infectados quanto as dos normais produziram baixas concentrações de IL-6.

Como em estudos anteriores de Carlos et al. (1999) revelaram que a fração FB (peptídeo-polissacarídea) extraída da parede do *S. schenckii*, apresentou atividade mitogênica quando adicionada aos linfócitos de camundongos não infectados, semelhantes aquela estimulada pelo mitógeno ConA, pretende-se futuramente conduzir uma investigação dessa atividade paralela, mitogenicidade X IL-6. Outros mitógenos como o LPS, fitohemaglutinina e o SAC (*Staphylococcus aureus* Cowan I) induzem a produção de IL-6 em tecidos linfóides assim como em monócitos, células T e B (TAKA & KISHIMOTO, 1992).

A administração de IL-6 reduz a severidade da infecção induzida por *C. neoformans*, sugerindo um papel dessa citocina na defesa do hospedeiro contra o fungo (BEENHOUWER, 2001).

Um método clássico para estimular a proliferação de células NK in vitro é cultivá-las em presença de IL-2. Essa citocina tem importância fundamentada na resposta antimicrobica exercida pelas células T (O'GARRA et al., 1998).

Estudando-se a liberação de IL-2 durante a infecção pelo *S. schenckii* nos sobrenadantes das culturas de linfócitos murinos verificou-se uma produção dessa citocina nas três semanas iniciais da infecção tanto na presença de ExoAg como na presença de ConA (Figura 8). Os animais infectados apresentaram uma liberação de IL-2 mais expressiva durante as dez semanas de infecção frente ao mitógeno ConA do que ao ExoAg. Os animais normais apresentaram baixa produção de IL-2 durante as dez semanas de infecção. O

mesmo aconteceu na ausência de estímulo, tanto nas células dos animais infectados como normais.

Os resultados obtidos na liberação de IL-2 são condizentes com os resultados apresentados por Granucci et al. (2004) em que células murinas têm a capacidade de produzir IL-2 no início da infecção induzida por produtos bacterianos em conjunto com o IFN- γ , podendo assim modular uma resposta de perfil Th1.

Koga et al. (1994) observaram que as células mononucleares, quando cultivadas em presença da esporotriquina, produzem IFN- γ , IL-2 e GM-CSF e que na ausência de IFN- γ não há produção significativa das demais citocinas. A resposta tardia parece desempenhar papel importante na resistência à infecção pelo *S. schenckii*. As células Th1 podem servir como um evento iniciador através da liberação de IL-2 no local, com subsequente ativação de outras células Th1, uma vez que essa citocina atua como indutor da proliferação dessas células.

Muguruma et al. (1995) estudando o perfil de citocinas nas lesões da esporotricose observaram que as citocinas de perfil Th1, como a IL-2 e o IFN- γ , são predominantes, embora se encontre a presença de TNF- α e iNOS nas mesmas lesões.

Para confirmar a presença da imunidade celular foi realizado nesse trabalho o teste de transformação linfocitária in vitro (Figura 9), utilizando cultura de linfócitos extraídos dos linfonodos totais. Os animais infectados pelo

S.schenckii apresentaram uma depressão na resposta celular entre a quarta e sexta semana de infecção frente ao ExoAg e a ConA. A ConA apresentou melhor desempenho em incorporar a timidina triciada em comparação com o ExoAg, fazendo jus à consideração daquela como potente estimulador da resposta imune celular. Na ausência de estímulo os animais apresentaram baixos índices de incorporação de timidina triciada em todas as semanas de infecção.

A partir da sétima semana de infecção houve aumento da incorporação da timidina pela ConA. Em trabalhos realizados por Carlos et al. (1992), foram encontrados resultados semelhantes, porém o antígeno usado foi o antígeno solúvel (AgS) extraído do *S. schenckii*. Houve uma depressão entre a quarta e sexta semana de infecção e posterior aumento na quantidade de timidina incorporada pelas células esplênicas murinas.

Em estudos com *T. cruzi* foi demonstrado que durante a fase aguda da infecção ocorre intensa supressão da proliferação de células T em resposta a mitógenos ou antígenos do parasita. Uma diminuição da proliferação celular coincide com elevados níveis de IFN- γ e NO e redução de IL-2 nos animais testados. A supressão da resposta proliferativa seria o resultado do aumento da produção de NO por macrófagos ativados por IFN- γ , aliados a produção insuficiente de IL-2 (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1995).

Esses resultados são compatíveis com os encontrados nesse trabalho em relação aos índices de liberação de IL-2 e IFN- γ , pois no mesmo período de depressão apresentado no teste de transformação linfocitária (4^a e 6^a), houve

aumento significativo na detecção de IFN- γ e pouca quantidade de IL-2 liberada.

A partir dos anos 80, tornou-se aparente que a regulação das citocinas deveria ser firmemente controlada. Sabe-se que o funcionamento do sistema imunológico é equilibrado pela atividade de mediadores pró e antiinflamatórios. A atividade não regulada desses mediadores pode levar ao desenvolvimento de doenças inflamatórias sérias.

A polarização dos subtipos Th1 e Th2 desenvolvida da mesma célula T precursora e a diferenciação em dois fenótipos, dependem da dose do antígeno e co-estimulação para o início da diferenciação Th (CONSTANT & BOTTOMLY, 1997).

A dicotomia entre o papel da imunidade celular e humoral contra patógenos, foi determinada no contexto da diferenciação dos subtipos de células T, ajudando a formar as bases da relação Th1/Th2 (MOSMANN & COFFMAN, 1989).

As células Th1 produzem IFN- γ , IL-2, TNF- β , e são eficientes na eliminação de patógenos intracelulares, via ativação de macrófagos. As células Th2 liberam IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 que ativam a imunidade humoral e são secretadas de maneira acentuada na presença de antígenos persistentes (MOSMANN et al., 1986; RENGARAJAN et al., 2000).

A IL-10 foi originalmente descrita como uma citocina produzida por células Th2, modulando efeitos antiinflamatórios, agindo primeiramente em fagócitos e células apresentadoras de antígenos (TRINCHIERI, 2001).

Nesse trabalho, avaliou-se a liberação de IL-10 por células de linfonodos totais em camundongos infectados e normais com *S. schenckii*. Verificou-se um aumento significativo na liberação de IL-10 nos animais infectados frente ao ExAg e ConA nas quatro primeiras semanas de infecção com posterior declínio até a décima semana de infecção. Os animais normais apresentaram baixos níveis de liberação de IL-10 quando comparados com os infectados.

A secreção de IL-10 no início da infecção foi observada por FARAH et al. (2001) em modelo experimental de candidíase orofaríngea. Eles descreveram sua secreção por neutrófilos e posteriormente o desenvolvimento de uma resposta mediada por células T, que voltam a modular as funções dos neutrófilos em um processo de “feedback”. Esses resultados estão de acordo com os encontrados nesse trabalho, pois no início da infecção esporotricótica há o aparecimento de altos níveis de IL-10 até a terceira semana de infecção (Figura 10).

Analisando-se os resultados de IL-10 apresentados nesse trabalho podemos verificar uma correlação com os baixos níveis de IFN- γ nas primeiras três semanas de infecção (Figura 11). Isso vem de encontro com os achados de Deep et al. (2003) que observaram o aumento dos níveis de IFN- γ em camundongos deficientes em IL-10, uma citocina criteriosamente envolvida no controle da carga fúngica na histoplasmose. Isso confirma a auto-regulação observada na cascata de citocinas.

Cenci et al. (2000) reportaram que em modelo de aspergilose murina o animal se torna resistente ao fungo devido a altos níveis de TNF- α , IL-12 e IFN-

γ . Por outro lado observaram que os camundongos se tornam suscetíveis ao fungo quando se encontram altos níveis de IL-10 e IL-4 ao mesmo tempo.

A presença de IL-10 e IL-4 durante a ativação da célula T em resposta ao *H. capsulatum* suprime a geração de IFN- γ nas fases iniciais da infecção, atrasando, mas não afetando a produção de IFN- γ . Quando as citocinas antagonistas diminuem, a produção de IFN- γ pelas células T imediatamente recomeça (PENG, 2005).

A IL-4 é uma citocina de característica Th2 expressa por células T. Possui um importante papel no crescimento e desenvolvimento das células B, além de proporcionar o controle de alguns processos através da secreção de alguns isotipos de IgG como IgG1 e de IgE (GROS et al., 1990).

A IL-4 pode afetar positivamente ou negativamente a função efetora antifúngica das células fagocíticas (LEZAMA-DAVILA, 1992).

Os níveis de IL-4 foram dosados no sobrenadante da cultura de linfócitos obtidos dos linfonodos totais. Os animais infectados com *S. schenckii* quando em contato com o ExoAg, apresentaram um aumento gradativo a partir da primeira semana de infecção. A maior concentração foi notada durante a décima semana de infecção. Em presença de ConA as mesmas células infectadas apresentaram padrão de resposta oposto ao ExoAg, diminuindo gradativamente durante as dez semanas de infecção. Isso provavelmente ocorra devido ao comportamento mitogênico que a ConA conhecidamente exerce sobre a resposta imune celular Th1. Os animais normais liberaram baixa

concentração de IL-4 durante todo o período de infecção, sendo que a ConA estimulou uma maior liberação dessa citocina do que o ExoAg (Figura 11).

No camundongo geneticamente deficiente em IL-4, levado à infecção por toxoplasmose observam-se diferentes papéis para essa citocina. Os estudos realizados por MENCACCI (1998) demonstraram que a IL-4 parece ser requerida nos estágios tardios da doença para desempenhar papel protetor contra o *T. gondii*.

Esses resultados são concordantes com os apresentados no padrão de liberação de IL-4 na esporotricose aqui observado. A liberação de IL-4 é crescente a partir da quarta semana de infecção e seus maiores níveis são detectados entre a nona e décima semana de infecção frente ao ExoAg (Figura 11).

A IL-4 é um dos mediadores que leva à liberação de altos níveis de IL-6, que por sua vez, é conhecida em regular receptores de IL-4 em camundongos. Esse pode ser considerado um resultado benéfico entre a IL-6 e IL-4 no camundongo com candidíase (ROMANI, 1996). Em nossos resultados observamos um padrão de resposta diferente. Os níveis de IL-6 estão baixos durante as últimas semanas de infecção perante o ExoAg (Figura 10) enquanto que os de IL-4 apresentam seus maiores níveis. Por outro lado, os níveis de IL-6 são condizentes com os resultados apresentados pela IL-12 (Figura 6) e IFN- γ (Figura 7). Muito provavelmente possamos ter o envolvimento de outras citocinas imunoreguladoras nesse processo. Novamente, o papel da IL-6 na

esporotricose necessita de mais estudos, os quais poderão ser realizados num futuro próximo.

Uma vez que a resposta desencadeada pelo perfil Th2 é essencialmente humoral, procurou-se detectar a presença de anticorpos (Ac) da classe IgG durante as dez semanas de infecção através da realização de um teste imunoenzimático padronizado em nosso laboratório (dados ainda não publicados).

Na Figura 13, nossos resultados demonstraram a detecção de Ac a partir da quarta semana de infecção com o *S. schenckii* em todas as diluições realizadas com o ExoAg. Esse resultado mostra uma depressão até a sexta semana. Nas semanas posteriores foi possível detectar a presença de Ac até a décima semana de infecção.

Esses dados confirmam os resultados discutidos anteriormente em relação a IL-4. No caso da IL-4 (Figura 10), citocina de perfil Th2, os maiores índices de produção são encontrados durante as sete semanas finais de infecção pelo *S. schenckii*. A partir da sétima semana de infecção os níveis de IL-4 estão altos, persistindo até o final da infecção. Nesse mesmo período ocorre um aumento na detecção de anticorpos nessa infecção fúngica. Acreditamos que um dos motivos da remissão da doença esporotricótica esteja relacionado aos altos níveis de IL-4 com papel protetor devido à detecção de anticorpos durante o mesmo período.

Estudos realizados por Cano et al. (1998) em que os autores trataram células de animais infectados com *P. brasiliensis* mais anticorpo anti-IFN- γ , foi

observada alta produção de anticorpos. Isso vai de encontro com os dados obtidos nesse trabalho que mostram uma grande produção de IFN- γ entre a quarta e sexta semana (Figura 7) de infecção esporotricótica e uma supressão na detecção de anticorpos pelo ELISA nas mesmas semanas.

Em vista de todos esses resultados, conclui-se existir uma efetiva inter-relação entre a resposta Th1 e Th2 nesse modelo experimental de esporotricose.

VI. CONCLUSÕES

1. As células dos animais infectados estão mais suscetíveis às condições de cultura que as células dos animais não infectados, seja em presença de estímulo (ExoAg ou LPS) ou mesmo na ausência deles.
2. Foi observada uma depressão da resposta imune na detecção de NO e iNOS entre a 4^a e 6^a semana de infecção, demonstrando que altos níveis desses mediadores durante a esporotricose experimental promove alterações nas funções dos macrófagos e na liberação de citocinas.
3. Observa-se uma depressão na produção de IL-1, TNF- α e na proliferação de células T entre a quarta e sexta semana de infecção, período de maior comprometimento do hospedeiro, coincidente com o período de imunossupressão observado nas determinações de iNOS/NO.
4. Verificou-se maior liberação de IL-12 e IFN- γ no período entre a quarta e sexta semana. Tanto a IL-12 como o IFN- γ são importantes mediadores da resposta imune celular tipo Th1. A presença de IL-2 no início da infecção colabora para a proteção do hospedeiro contra o fungo.
5. A IL-10 parece estar ligada a suscetibilidade do organismo hospedeiro perante a infecção do fungo *S. schenckii*.

6. A elevada produção de IL-6 e IL-4 nos períodos finais de infecção pode ser caracterizada como um perfil Th2 de proteção pela produção de anticorpos, possibilitando a remissão da doença esporotricótica.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Cellular and Molecular Immunology**. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000. 553p.

ABRAHAMSOHN, I.A.; COFFMAN, R.L. Cytokine and nitric oxide regulation of immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.**, v.155, n.8, p.3956-3963, 1995.

ACHIKE, F. I.; KWAN, C. Y. Nitric oxide, human diseases and the herbal products that affect the nitric oxide signalling pathway. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v.30, n.9, p. 605-15, 2003.

AKIRA, S.; HIRANO, R.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL1 and TNF). **Faseb J.**, v.4, n.11, p.2860-2867, 1990.

ALBINA, J.E.; CUI, S.; MATEO, R.B.; REICHNER, J.S. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. **J. Immunol.**, v.150, n.11, p.5080-5085, 1993.

ALBORNOZ, M.B.; VILLANUEVA, E.; DE TORRES, E.D. Application of immunoprecipitation techniques to the diagnosis of cutaneous and

extracutaneous forms of sporotrichosis. **Mycopathologia**, v.85, n.3, p.177-183, 1984.

AL-TAWFIQ, J.A.; WOOLS, K.K. Disseminated sporotrichosis and *Sporothrix schenckii* fungaemia as the initial presentation of human immunodeficiency virus infection. **Clin. Infec. Dis.**, v.26, n.6, p.1406-1409, 1998.

ALVIANO, C. S., PEREIRA, M. E. A., TRAVASSOS, L.R. Sialic acids are surface components of *Sporothrix schenckii* yeast forms. **FEMS Microbiology Letters**, v.15, n.3, p.223-227, 1982.

ALVIANO, C.S.; TRAVASSOS, L.R.; SCHAUER, R. Sialic acids in fungi: a minireview. **Glycoconj. J.**, v.16, n.9, p.545-554, 1999.

ARRUDA. C.; FRANCO, M. F.; KASHINO, S. S.; NASCIMENTO, F. R.; FAZIOLI, R. A.; VAZ, C. A.; RUSSO, M.; CALICH, V. L. Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. **Clin. Immunol.**, v. 103, p. 185-195, 2002.

BALISH, E.; WARNER, T. F.; NICHOLAS, P. J.; PAULLING, E. E.; WESTWATER, C.; SCHOFIELD, D. A. Susceptibility of germfree phagocytosis oxidase- and nitric oxide synthase 2-deficient mice, defective in the production of reactive metabolites of both oxygen and nitrogen, to mucosal and systemic candidiasis of endogenous origin. **Infect. Immun.**, v.73, p. 1313-1320, 2005.

BALLOY, V.; HUERRE, M.; LATGE, J.P.; CHIGNARD, M. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. **Infect. Immun.**, v.73, p. 494-503, 2005.

BANCHEREAU. J.; STEINMAN, R.M. Dendritic cells and the control of immunity.

Nature, v.392, n.6673, p.245-52, 1998.

BARROS, M. B.; SCHUBACH, A. O.; DO VALLE, A. C.; GUTIERREZ, G. M. C.; CONCEIÇÃO-SILVA, T. M.; REIS, R.S.; WANKE, B.; MARZOCHI, K. B.; CONCEIÇÃO, M. J. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. **Clin Infect Dis.**, v. 15, p. 529-535, 2004.

BARROS, M.B.L.; SCHUBACH, T.M.P.; GALHARDO, M.C.G.; MONTEIRO, P.C.F.; REIS, R.S.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; LAZÉRA, M.S.; MAYA, T.C.; MOITA, T.C.; WANKE, K.B.F.M.B.;VALLE, A.C.F. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 777-779,2001.

BAUMAN, S. K.; HUFFNAGLE, G. B.; MURPHY, J.W. Effects of tumor necrosis factor alpha on dendritic cell accumulation in lymph nodes draining the immunization site and the anticryptococcal cell- mediated immune response. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 68-74, 2003.

BEENHOUWER, D. O.; SHAPIRO, S.; FELDMESSER, M.; CASADEVALL, A.; SCHARFF, M. Both Th1 and Th2 cytokines affect the ability of monoclonal antibodies to protect mice against *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v.69, n.10, p. 6445-6455, 2001.

BELKNAP, B.S. Sporotrichosis. **Dermatol. Clin.**, v.7, n.2, p.193-202, 1989.

BEUTLER, B. TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. **Journal of Investigative Medicine**, v.43, p.227-235, 1995.

BEUTLER, B.; CERAMI, A., Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. **Nature**, v.320, n.6063, p.584-588, 1986.

BEUTLER, B.; GREENWALD, D.; HULMES, J. D.; CHANG, M.; PAN, Y. C. E.; MATHISON, J.; ULEVITCH, R. and CERAMI, A. Identity of tumor necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. **Nature**, London, v. 316, p.552-554, 1985.

BIONDO, C.; BENINATI, C.; BOMBACI, M.; MESSINA, L.; MANCUSO, G.; MIDIRI, A.; GALBO, R.; TETI, G. Induction of T helper type 1 response by a polysaccharide deacetylase from *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v.71, p. 5412-5417, 2003.

BOCCA, A.L.; HAYASHI, E.E.; PINHEIRO, A.G.; FURLANETTO, A.B.; CAMPANELLI, A.P.; CUNHA, F.Q.; FIGUEIREDO, F. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. **J. Immunol.**, v.161, n.6, p.3056-3063, 1998.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat. Immunol.**, New York, v.2, n.10, p. 907-916, 2001.

BOGDAN, C. The multiplex function of nitric oxide in (auto) immunity. **J. Exp. Med.**, New York, v. 187, n. 9, p. 1361-1365, 1998.

BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Macrophage deactivation by Interleukin-10. **J. Exp. Med.**, v.174, n.6, p.1549-1555, 1991.

BORGHANS, J. A.; TAAMS, L. S.; WAUBEN, M. H.; DE BOER, R. J. Competition for antigenic sites during T cell proliferation: a mathematical interpretation of in vitro data. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 96, p. 10782-10787, 1999.

BOSE, M.; FARNIA, P. Proinflammatory cytokines can significantly induce human mononuclear phagocytes to produce nitric oxide by a cell maturation-dependent process. **Immunol Lett.**, v.48,n.1, p59-64, 1995.1995.

BRENNAN, R.E.; RUSSEL, K.; ZHANG, G.; SAMUEL, J. E. Both inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase contribute to the control of virulence phase I *Coxiella burnetti* infections. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 6666-6675, 2004.

BRETSCHER, P. A.; WEI, G.; MENON, J. N.; BIELEFELDT-OHMANN, H. Establishment of stable cell-mediated immunity that makes susceptible mice resistente to *Leishmania major*. **Science**. V.257, n.5069, p.539-542, 1992.

BRUNDA, M.J. Interleukin-12. **J. Leuk. Biol.**, v.55, n.2, p.280-288, 1994.

BRYK, K.; WOLFF, D. J. Mechanism of inducible nitric oxide synthase inactivation by aminoguanidine and L-N6-(1-iminoethyl)lysine. **Biochemistry**, v.37, n.14, p.4844-4852,1998.

CANO, D. A.; MOUSLIM, C.; AYALA, J. A.; GARCIA-DEL PORTILLO, F.; CASADEUS, J. Cell division inhibition in *Salmonella typhimurium* histidine-constitutive strains: an *ftsI*-like defect in the presence of wild-type penicillin-binding protein 3 levels. **J Bacteriol.**, v.180, n.19, p.5231-5234,1998.

CARLOS, I.Z.; SGARBI, D.B.G.; 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, p.139-144, 1992.

CARLOS, I.Z.; ZINI, M.M.C.; 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.189-194, 1994.

CARLOS, I.Z.; SGARBI, D.B.G.; PLACERES, M.C.P. Host organism defense by peptide-polysaccharide extracted from the fungus *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia**, v.144, p.9-14, 1999.

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- α . **Scand. J. Immunol.**, v.57, n.3, p.214-220, 2003.

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.91-94, 1990.

CENCI, E.; MENCACCI, A.; DEL SERO, G.; BACCI, A.; MONTAGNOLI, C.; D'OSTIANI, C. F.; MOSCI, P.; BACHMANN, M.; BISTONI, F.; KOPF, M.; ROMANI, L. The human immune response during cutaneous leishmaniasis: NO problem. **Parasitol Today**, v. 6, p. 1957-1968, 1998.

CHARALANPOS, A.; ROILIDES, E. Cytokines and fungal infections. **J. Hematol.**, v. 129, p. 583-596, 2005.

CHO, H. J.; XIE, Q. W.; CALAYCAY, J.; MUMFORD, R. A.; SWIDEREK, K. M.; LEE, T. D.; NATHAN, C. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. **J Exp Med.**, v. 176, p. 599-604, 1992.

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.

COFFMAN, R.L.; LEBMAN, D.A.; ROTHMAN, P., Mechanisms and regulation of immunoglobulin isotype switching. **Adv. Immunol.**, v.54, p.229-270, 1993.

CONSTANT, S. L.; BOTTOMLY, K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. **Annu Rev Immunol.** ,v.15, p.297-322, 1997.

COX GW, MELILLO G, CHATTOPADHYAY U, MULLET D, FERTEL RH, VARESIO L. Tumor necrosis factor-alpha-dependent production of reactive nitrogen intermediates mediates IFN-gamma plus IL-2-induced murine macrophage tumoricidal activity. **J Immunol.**, v. 15, p.3290-6, 1992.

CUNHA FQ, POOLE S, LORENZETTI BB, FERREIRA SH. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia.

Br J Pharmacol., v. 107, p.660-4,1992.

D'ANDREA, A.; RENGARAJU, M.; VALIANTE, N.M.; CHEHIMI, J.; KUBIN, M.; ASTE, M.; CHAN, S.H.; KOBAYASHI, M.; YOUNG, D.; NICKBARG, E.; CHIZZONETE, R.; WOLF, S.F.; TRINCHIERI, G. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. **J Exp**

Med., v.176, n.5, p.1387-1398, 1992.

DE ARAÚJO, T.; MARQUES, A.C.; FERDEL, F. Sporotrichosis. **Int. J. Dermatol.**, v.40, n.12, p.737-742, 2001.

DEEP, G. S. JR.; GIBBONS, R. S. Protective and memory immunity to *Histoplasma capsulatum* in absence of IL-10. **J. Immunol.**, v.171, p. 5353-5362, 2003.

DIAS, I. A. C. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. **Mycopathologia**, v.108, p.113-116, 1989.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 8, p. 253-265, 1997.

DINARELLO, C.A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, v.118, n.2, p.503-508, 2000.

EIGLER, A.; GRETEN, T. F.; SINHA, B.; HASLBERGER, C.; SULLIVAN, G. W.; ENDRES, Endogenous adenosine curtails lipopolysaccharide-stimulated tumour necrosis factor synthesis. **Scand J Immunol.**, v. 45. p. 132-139, 1997.

EIGLER, A.; Sinha, B.; Endres, S. Nitric Oxide- releasing agents enhance cytokine- induced tumor necrosis factor synthesis in human mononuclear cells. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v.1, p.494-501,1993.

EIGLER, A.; SINHA, B.; HARTMANN, G.; ENDRES, S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. **Immunol. Today**, Cambridge, v.18, n.10, p.487-492, 1997.

FARAH, C. S.; ELAHI, S.; PANG, G.; GOTJAMANOS, T.; SEYMOUR, G. J.; CLANCY, R. L.; ASHMAN, R. B. T cells augment monocyte and neutrophil function in host resistance against oropharyngeal candidiasis. **Infect Immun.**, v. 10, p. 6110-6118, 2001.

FERNANDES, K.S.; METHEWS, H.L.; LOPES BEZERRA, L.M. Differences in virulence of *Sporothrix schenckii* conidia related to culture conditions and cell-wall components. **J. Med. Microbiol.**, v.48, n.2, p.195-203, 1999.

FERREIRA, M. A. Cytokine expression in allergic inflammation: systematic review of in vivo challenge studies. **Mediators Inflamm.**, v. 12, p. 259-267, 2003.

KONTUREK, S. K.; KONTUREK, P. C. Role of nitric oxide in the digestive system. **Digestion.**, v. 56, p. 1-13, 1995.

FIGUEIREDO, C.C.; LIMA, O.C.; CARVALHO, L.; LOPES-BEZERRA, L.M.; MORANDI, V. The in vitro interaction of *Sporothrix schenckii* with human endothelial cells is modulated by cytokines and involves endothelial surface molecules. **Microbial Pathog.**, v.36, p.177-188, 2004.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, São Paulo, v. 46, n.3, p.265-271, 2000.

FÖRSTERMANN, U.; BOISSEL, J. P., KLEINERT, H. Expressional control of the “constitutive” isoforms of NOS (NOSI and NOSII). **FASEB**, v.12, n.10, p.773-790, 1991.

FUKAO, T., SATOSHI, M., KOYASU, S. SYnergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12 dependente IFN- γ production by dendritic cells. **Journal of Immunol.**, v. 164, p. 64-71, 2000.

GAZZINELLI, R. T. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection. **J. Immunol.**, V.153, p.2533-2543,1994.

GAZZINELLI, R.T.; HIENY, S.; WYNN, T.A.; WOLF, S.; SHER, A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon γ by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, n.13, p.6115-6119, 1993.

GESSANI, S.; BELARDELLI, F. IFN- γ expression in macrophage and its possible biological significance. **Cytokine & Growth Factor Revs.** v 9, n.2, p.117-123, 1998.

GILLMAN, B. M.; BATCHELDER, J.; FLAHERTY, P.; WEIDANZ, W. P. Suppression of Plasmodium chabaudi parasitemia is independent of the action of reactive oxygen intermediates and/or nitric oxide. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 6359-6366, 2004.

GOLDMAN, D. L.; LEE, S. C.; MEDNICK, A. J.; MONTELLA, L.; CASADEVALL, A. Persistent Cryptococcus neoformans pulmonary infection in the rat is associated with intracellular parasitism, decreased inducible nitric oxide synthase expression, and altered antibody responsiveness to cryptococcal polysaccharide. **Infect Immun.** ,v.68, n.2,p.832-838, 2000.

GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B.A.W.H. **Kuby immunology**. New York: W.H. Freeman and company, 4ed., p.670, 2000.

GONZALES, A.; DE GREGORI, W.; VELEZ, D.; RESTREPO, A.; CANO, L.E. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Infect. Immun.**, v.68, n.5, p.2546-2552, 2000.

GOPINATH, V. K.; MUSA, M.; SAMSUDIN, A. R.; LALITHA, P.; SOSROSENO, W. Role of nitric oxide in hydroxyapatite-induced phagocytosis by murine macrophage cell line (RAW264.7). **Arch Oral Biol.**, 2005.

GORI, S.; LUPETTI, A.; MOSCATO, G.; PARENTI, M.; LOFARO, A. Disseminated sporotrichosis in patients with AIDS: case report and review of the literature. **Acta Cytol.**, v.41, n.2, p.519-521, 1997.

GRANUCCI, F.; ZANONI, I.; PAVELKA, N.; DOMMELEN, S. L. H.; BELARDELLI, F. A contribution of mouse dendritic cell-derived IL-2 for NK cell activation. **J.Exp.Med.**, v.200, n.3, p.287-295, 2004.

GREEN K, CAMPBELL G. Nitric oxide formation is involved in vagal inhibition of the stomach of the trout (*Salmo gairdneri*). **J Auton Nerv Syst.**, v.15, p. 221-229, 1994.

GREEN, J. T.; RICHARDSON, C.; MARSHALL, R. W.; RHODES, J.; MCKIRDY, H. C.; THOMAS, G. A.; WILLIAMS, G. T. Nitric oxide mediates a therapeutic effect of nicotine in ulcerative colitis. **Aliment Pharmacol Ther.**, v. 14, p. 1429-1434, 2000.

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, n.1, p.131-138, 1982.

GROS, G.; BEN-SASSON, S. Z.; SEDER, R.; FINKELMAN, F. D.; PAUL, W. E. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. **J Exp Med.**, v. 172, n.3, 1990.

HAMILTON, T. A.; BECTON, D. L.; SOMERS, S. D.; GRAY, P. W.; ADAMS, D. O. Interferon-gamma modulates protein kinase C activity in murine peritoneal macrophages. **J Biol Chem.**, v. 260, n. 3, p.1378-1381, 1985.

HIBBS, J.B., Jr; TAINTOR, R.R.; VAVRIN, Z.; RACHLIN, E.M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.157, n.1, p.87-94, 1988.

HIRUMA, M.; YAMAJI, K.; SHIMIZU, T.; OHATA, H.; KUKITA, A. Ultrastructural study of tissue reaction of mice against *Sporothrix schenckii* infection. **Arch. Dermatol. Res.**, v.280, Suppl: S94-100, 1988.

HOBBS, A. J.; HIGGS A.; MONCADA, S. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, Palo Alto, v.39, p.191–220, 1999.

HOCHREIN, H.; O'KEEFEE, M.; LUFT, T.; VANDENABEELE, S.; GRUMONT, R. J.; MARASKOVSKY, E.; SHORTMAN, K. Interleukin (IL)-4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL-12 production by mouse and human dendritic cells. **J Exp Med.**, v.192, n.6, p.823-833, 2000.

HOGAN, L.H.; KLEIN, B.S.; LEVITZ, S.M. Virulence factors of medically important fungi. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.9, n.4, p.469-488, 1996.

HUFFNAGLE, G. B.; DEEP, G.S. Innate and adaptive determinants of host susceptibility to medically important fungi. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 6, p. 344-350, 2003.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P. Immunobiology the immune system in health and disease. 3rd ed. New York: **Garland Publ**,1997.

JANKOVIC, D.; LIU, Z.; GAUSE, W. C. Th-1 and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. **Trends in Immunology**. v.22, n.8, p.450-457, 2001.

JOHNSTON, R.B., Jr. Current concepts in immunology: monocytes and macrophages. **N. Engl. J. Med.**, v.318, n.12, p.747-752, 1988.

KAJIWARA, H.; SAITO, M.; OHGA, S.; UENOTSUCHI, T.; YOSHIDA, S. Impaired host defense against *Sporothrix schenckii* in mice with chronic granulomatous disease. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 5073-5079, 2004.

KAMBAYASHI, T.; JACOB, C. O.; STRASSMANN, G. IL-4 and IL-13 modulate IL-10 release in endotoxin-stimulated murine peritoneal mononuclear phagocytes. **Cell Immunol.**, v. 171, p. 153-158, 1996.

KAUFFMAN, C.A. Sporotrichosis. **Clin. Infect. Dis.**, v.29, n.2, p.231-236, 1999.

KAWAKAMI, K.; ZHANG, T.; QURESHI, M.; SATTO, A. Cryptococcus neoformans inhibits nitric oxide production by murine peritoneal macrophages stimulated with interferon-gamma and lipopolysaccharide. **Cell and Immunol.**, v.180, p. 47-54, 1997.

KIECHLE, F. L.; MALINSKI, T. Nitric oxide. Biochemistry, pathophysiology, and detection. **Am J Clin Pathol.** ,v.100, n.5, p.567-575, 1993.

KISHIMOTO, T. The biology of interleukin-6. **Blood**, v.74, n.1, p.1-10, 1989.

KOBAYASHI, A.; WATANABE, H.; OZAWA, K.; YAMAZAKI, N. Oxygen-derived free radicals related injury in the heart during ischemia and reperfusion. **Jpn Circ J.**, v.53, n.9, p. 1122-1131, 1989.

KOGA, T.; DUAN, H.; FURUE, M. Immunohistochemical detection of interferon- γ -producing cells in granuloma formation of sporotrichosis. **Med. Mycol.**, v.40, n.2, p.111-114, 2002.

KOGA, T.; DUAN, H.; URABE, K.; FURUE, M. Immunohistochemical localization of activated and mature CD83⁺ dendritic cells in granulomas of sporotrichosis. **Eur. J. Dermatol.**, v.11, n.6. p.527-529, 2001.

KOGA, T.; MATSUDA, T.; ODA, K.; ISHIZAKI, H.; MATSUMOTO, T.; HORI, Y. Cytokine production of peripheral blood mononuclear cells in patient with sporotrichosis. **Acta Derm. Venereol. (Stokh)**, v.74, n.4, p.328, 1994.

KOVALOYSKY, D.; REFOJO, D.; HOSBOER, F.; ARZT, E. Molecular mechanisms and Th1/Th2 pathways in corticosteroid regulation of cytokine production. **J Neuroimmunol.**, v.109, n.1, p.23-29, 2000.

KOZUKA, N.; ITOFUSA, R.; KUDO, Y.; MORITA, M. Lipopolysaccharide and proinflammatory cytokines require different astrocyte states to induce nitric oxide production. **J Neurosci Res.**, 2005.

KRISTOF, A. S.; MARKS-KONCZALIC, J.; MOSS, J. Mitogen-activated protein kinases mediate activator protein-1-dependent human inducible nitric-oxide synthase promoter activation. **J Biol Chem.**, v. 276, n.11, p.8445-8452, 2001.

KUSHNER, I. Semantics, inflammation, cytokines and common sense. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 9, p. 191-196, 1998.

LAGHANS, W. Bacterial products and the control of ingestive behavior: clinical implications. **Nutrition**, New York, v. 12, n.5, p.303-315, 1996.

LAMONT, A. G.; ADORINI, L. IL-12: a key cytokine in immune regulation. **Immunol Today**, v.17, n.5, p.214-217, 1996.

LANE, T. E.; OTERO, G. C.; WU-HISIEH, B. A.; HOWARD, D. H. Expression of inducible nitric oxide synthase by stimulated macrophages correlates with their antihistoplasma activity. **Infect Immun.**, v. 62, p.1478-1490.

LASKIN, J.D.; HECK, D.E.; LASKIN, D.L. Multifunctional role of nitric oxide in inflammation. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 5, n.9, p.377-382, 1994.

LEZAMA-DAVILA, C. M.; WILLIAMS, D. M.; GALLAGHER, G.; ALEXANDER, J. Cytokine control of Leishmania infection in the BALB/c mouse: enhancement and inhibition of parasite growth by local administration of IL-2 or IL-4 is species and time dependent. **Parasite Immunol.**, v.14, n.1, p.37-48, 1992.

LIANG ZHAO, M.; MEE-OHK, K.; MORGELLO, S.; SUNHEE C. L. Expression of inducible nitric oxide synthase, interleukin-1 and caspase-1 in HIV-1 encephalitis. **J. Neuroimmunology**, v.115, n.2, p 182-191, 2001.

LLOYD, K.O.; BITTON, M.A. Isolation and purification of a peptidomannan from yeast form of *Sporothrix schenckii*. Structural and immunochemical studies. **J. Immunol.**, v. 107, n.3, p.663-671, 1971.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Proteins measurement with folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** v.193, n.1, p.265-275, 1951.

LYON, G.; ZURITA, S.; CASQUERO, J.; HOLGADO, W.; GUEVARA, J.; BRANDT, M.; DOUGLAS, S.; SHUTT, K.; WARNOCK, D.; HAJJEH, R. A. Population-based surveillance and a case-control study of risk factors for endemic lymphocutaneous sporotrichosis in Peru. **Clin. Infect. Dis.**, v. 36, p. 34-39, 2003.

MACFARLANE, A.S.; HUANG, D.; SCHWACHA, M.G.; MEISSLER, J.J.JR.; GAUGHAN, J.P.; EISENSTEIN, T.K. Nitric oxide mediates immunosuppression induced by *Listeria monocytogenes* infection: quantitative studies. **Microb. Pathog.**, v.25, n.2, p.267-277, 1998.

MacMICKING, J.; QIAO-WEN X.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol.**, Palo alto, v.15, p.323-350, 1997.

MAIA, D.C.G.; SASSÁ, M.F.; PLACERES, M. P.; CARLOS, I. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*, impress, 2005.

MAKHATADZE, N.J. Tumor necrosis factor locus: genetic organisation and biological implications. **Hum Immunol.**, v.59, n.9, p.571-579, 1998.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J Biol Chem.**, v. 268, p. 12231-12240, 1993.

MARSHALL, H. E.; STAMLER, J. S. NO waiting to exhale in asthma. **Am J Respir Crit Care Med.**, v.161, p.685-687, 2000.

MATTER, S.E.; BAILEY, D.M.; SEXTON, D.J. Immune deficiency presenting as disseminated sporotrichosis. **J. Okla. State Med. Assoc.**, v.77, n.4, p.144-117, 1984.

McCORMACK, F. X.; GOBBONS, R.; WARD, S. R.; KUZMENKO, A.; WU, H.; DEEP, G. S. Macrophage-independent fungicidal action of the pulmonary collectins. **J. Infect. Dis.**, v.278, p. 36250-36256, 2003.

MCKEE, M.; SCAVONE, C.; NATHANSON, J. A. Nitric oxide, cGMP and hormone regulation of active sodium transport. **Proceedings of the national Academy of Sciences (PNAS)**. v. 91, p.12056-12060, 1994.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. **Immunol Rev.**, v.173, p.89-97, 2000.

MENCACCI, A.; CENCI, E.; BACCI, A.; MONTAGNOLI, C.; BISTONI, F. ROMANI, L. Cytokines in candidiasis and aspergillosis. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, v.1, p. 235-251, 2000.

MENCACCI, A.; SERO, G.; CENCI, E.; OSTIANI, C.; BACCI, A. Endogenous IL-4 is required for development of protective CD4 T helper type 1 cell response to *Candida albicans*. **J. Exp. Med.**, v.187, n.3, p.307-317, 1998.

MENDÉZ-TOVAR, L. J.; FONSECA, A. E. A.; GONZALEZ, G. P.; MANZANO-GAYOSSO, P.; LÓPEZ-MARTINEZ, R.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, F.; ALMEIDA-ARVIZU, V. M. Esporotricosis cutánea fija incógnita. **Ver. Iberiam. Micol.**, v. 21, p. 150-152, 2004.

MORRIS-JONES, R. Sporotrichosis. **Clin. Exp. Dermatol.**, v.27, n.6, p. 427-431, 2002.

MORRIS-JONES, R.; YOUNGCHIM, S.; GOMEZ, B.L.; AISEN, P.; HAY, R.J.; NOSANCHUK, J.D.; CASADEWALL, A.; HAMILTON, A.J. Synthesis of melanin-like pigment by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. **Infect. Immun.**, v.71, n.7, p.4026-4033, 2003.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and survival: Application and Citotoxicity Assays. **J. Immunol. Methods**, v.65, n1-2, p.55-63, 1983.

MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Ann. Rev. Immunol.**, v.7, p.145-174, 1989.

MOSSALAYI, M. D.; AROCK, M.; MAZIER, D.; VINCENDEAU, P.; VOULDOUKIS, I. The human immune response during cutaneous leishmaniasis: NO problem. **Parasitol Today**, v. 1999.

MUGURUMA, K.; FUJIMURA, T.; MASUZAWA, M.; HASHIMOTO, A.; OHTA, Y.; KATSUOKA, K. Analysis of cytokine profiles in sporotrichosis. **J. Dermatol. Sci.**, v.10, p.92, 1995.

MYERS, J. T.; TSANG, A.W.; SWANSON, J.A. Localized reactive oxygen and nitrogen intermediates inhibit escape of *Listeria monocytogenes* from vacuoles in activated macrophages. **J. Immunol.**, v. 171, p.5447-5453, 2003.

NAKA, T.; NISHIMOTO, N.; KISHIMOTO, T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. **Arthritis Res.**, v.4, suppl. 3, p. 233-242, 2002.

NASCIMENTO, F.R.F.; CALICH, V.L.G.; RODRÍGUEZ, D.; RUSSO, M. Dual role of nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **J. Immunol.**, v.168, n.9, p.4593-4600, 2002.

NASCIMENTO, R. C.; ALMEIDA, S. R. Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis. **FEMS Immunol. and Med. Microbiol.**, v. 43, p.241-247, 2005.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J.**, v. 6, n.12, p. 3051-3064, 1992.

NETEA, M. G.; KULLBERG, B. J.; VAN DER MEER, J. W. Proinflammatory cytokines in the treatment of bacterial and fungal infections. **Biodrugs**, v.18, p. 9-22, 2004.

NEYRA, E.; FONTEYNE, P.; SWINNE, D.; FAUCHE, F.; BUSTAMANTE, B.; NOLARD, N. Epidemiology of human sporotrichosis investigated by amplified fragment length polymorphism. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, p. 1348-1352, 2005.

NOBEN-TRAUTH, N. Conventional naive CD4⁺ T cells provide an initial source of IL-4 during Th2 differentiation. **J. Immunol.**, v. 165, p.3620-3625,2000.

O'GARRA, A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. **Immunity**, v. 8, n.3, p. 275-283, 1998.

O'GARRA, A.; ARAI, N. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. **Trends Cell Biol.** v.10, n.12, p.542-550, 2000.

O'NEILL, L. A.; DINARELLO, C. A. The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. **Immunol Today**, v. 21, n.5, p.206-209, 2000.

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.

OKUDA, Y., SAKODA, S., SHIMAOKA, M., YANAGIHARA, T. Nitric oxide induces apoptosis in mouse splenic T lymphocytes. **Immunology Letters**. v.52, p.135-138,1996.

OPPENHEIM, J. J.; RUSCETTI, F. W.; FALTYNEK, C. R. Cytokines. In: STITES, D. P.; STOBO, J. D.; WELLS, J. V. **Basic clinical immunology**. 8. ed. Connecticut: Appleton & Lange, 1994. cap. 9, p. 105-123.

PALLADINO, M. A.; BAHJAT, F. R.; THEODORAKIS, E. A.; MOLDAWER, L. L. Anti TNF- α therapies: the next generation. **Nat. Rev. Drug Disc.**, London, v.2, p.736-746, 2003.

PALUKA, K.; BANCHEREAU, J. Linking innate and adaptive immunity. **Nat Med.**, v.5, n.8, p.868-870, 1999.

PAPPAS, P.; TELLEZ, I.; DEEP, A.; NOLASCO, D.; HOLGADO, H.; BUSTAMANTE. Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, p. 65-70, 2000.

PARHAM, P. **O sistema immune**. Porto Alegre: Artmed . 2001, p.372.

PENG, J. K.; LIN, J. S.; KUNG, J. T.; FINKELMAN, F. D.; WU-HSIEH, B. A. The combined effect of IL-4 and IL-10 suppresses the generation of, but does not change the polarity of, type-1 T cells in *Histoplasma* infection. **Int Immunol.**, v. 2, p. 193-205, 2005.

POLONELLI, L.; MORACE, G. Exoantigens studies of *Sporothrix schenckii*, *Ceratocystis minor*, and *Graphium penicillioides* cultures. **J. Clin. Microbiol.**, v. 15, n.3, p.362-365, 1982.

RAMIREZ, F.; STUMBLES,P.; PUKLAVEC, D. M. Rat interleukin-4 assays. **Journal of Immunol. Methods.** v 221, p.141-150,1998.

REDEGELD, F. A.; HEIJDRRA, B.; KNIPPELS, M. C.; GARSSSEN, J.; NIJKAMP, F. P.Nitric oxide production by macrophages stimulated by antigen-binding T-cell factors. **Immunol Lett.**,v.57, p.147-149, 1997.

REMETERÍA, A.; GARCIA-TOBALINA, R.; SEVILLA, M.J. Nitric oxide-dependent killing of *Candida albicans* by murine peritoneal cells during an experimental infection. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v.11, p.157-162, 1995.

RENGARAJAN, J.; SZABO, S. J.; GLIMCHER, L. H. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. **Immunol Today**, v.21, n.9, p.479-483, 2000.

RESTREPO-GUTIERREZ, S.; ARANGO-ARTEAGA, M.; URIBE-JAMILO, F.; ZULUAGA-CADENA, A.I.; RETREPO-MORENO, A. Course of experimental murine infection induced by *Sporothrix schenckii* conidia according to depth of inoculation **J. Med. Vet. Mycol.**, v.31, p.411-420, 1993.

RICHARDS, A.L. Tumour Necrosis Factor and Associated Cytokines in the host's response to malaria. **Int. J. Parasitol.**, v.27, n.10, p.1251-1263, 1997.

RIPPON, J.W., Sporotrichosis. *In* RIPPON, J.W., **Medical Mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic actinomyces**. 2nd Ed, Chicago: W. B. Saunders, 1982. p.277-302.

RIVERA, A.; CHEN, C. C.; RON, N.; DOUGHERTY, J. P.; RON, Y. Role of B cells as antigen-presenting cells in vivo revisited: antigen-specific B cells are essential for T cell expansion in lymph nodes and for systemic T cell responses to low antigen concentrations. **Int Immunol.**, v.13, n.12, p.1583-1593,2002 .

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunology**. 6th ed. London: Mosby, 2001. 481p.

ROITT, I.M.; DELVES, P.T. **Roitt's Essencial Immunology**. 10th . Malben: Blackwell Science, 2001, 481p.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Rev. Immunol.**, v.4, p. 1-23, 2004.

ROMANI, L. The T cell response against fungal infections. **C.Op. in Immunol.**, v. 9, p. 484-490,1997.

ROMANI, L.; KAUFMANN, S.H.E. Immunity to fungi. **Res. Immunol.**, v.149, n.4-5, p. 277-281, 1998.

ROMERO-MARTINEZ, R.; WHEELER, M.; GUERRERO-PLTA, A.; RICO, G.; TORRES-GUERRERO, H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 3696-3703, 2000.

SCHALLER, M.; BOELD, U.; OBERBAUER, S.; HAMM, G.; HUBE, B.; KORTING, H. C. Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) induce protective Th1-type cytokine epithelial responses in an in vitro model of oral candidosis. **Microbiology**, v. 150, p. 2807-2813, 2004.

SCHWACHA, M.G.& EISENSTEIN, T.K. Interleukin-12 is critical for induction of nitric oxide-mediated immunosuppression following vaccination of mice with attenuated *Salmonella typhimurium*. **Infect Immun.**, v.65, n.12, p.4897-4903, 1997.

SHIMONAKA, H.; NOGUCHI, T.; KAWAI, K.; KASEGAWA, I.; NOZAWA, Y.; ITO, Y. Immunochemical studies on the human pathogen *Sporothrix schenckii*: effects of chemical and enzymatic modification of the antigenic compounds upon immediate and delayed reactions. **Infect. Immun.**, v.11, n.6, p.1187-1194, 1975.

SHIRAISHI, A.; NAKAGAKI, K.; ARAI, T. Role of cell-mediated immunity in the resistance to experimental sporotrichosis in mice. **Mycopathologia**, v.120, n.1, p. 15-21, 1992.

SILVA, A. C.; BEZERRA, L. M.; AGUIAR, T. S.; TAVARES, D.; ARAUJO, L. M.; PINTO, C. E.; RIBEIRO, O. G. Effect of genetic modifications by selection for immunological tolerance on fungus infection in mice. **Microbes Infect.**, v. 3, p. 215-222, 2001.

SINHA, B.; EIGLER, A.; BAUMANN, K. H.; GRETEN, T. F.; MOELLER, J.; ENDRES, S. Nitric oxide down regulates tumour necrosis factor mRNA in RAW 264.7 cells. **Res. Immunol.**, v. 149, p. 139-150, 1998.

SISTO, F.; MILUZIO, A.; LEOPARDI, O.; MIRRA, M.; BOELAERT, J.R.; TARAMELLI, D. Differential cytokine pattern in the spleens and livers of BALB/c mice infected with *Penicillium marneffe*: protective role of gamma interferon. **Infect Immun.**, v.71, n.1, p.465-473, 2003.

SNYDER, S. H.; BREDET, D. S. Biological roles of nitric oxide. **Sci Am.**, v.266, n.5, p.74-77, 1992.

SORIMACHI, K.; AKIMOTO, K.; HATTORI, Y.; IEIRI, T.; NIWA, A. Secretion of TNF- α , IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with polyanions, and

involvement of interferon- γ in the regulation of cytokine secretion. **Cytokine**. v. 11, p. 571-578, 1999.

SOUTO, J.T.; FIGUEIREDO, F.; FURLANETTO, A.; PFEFFER, K.; ROSSI, M.A.; SILVA, J.S. Interferon- γ and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Am. J. Pathol.**, v.156, n.5, p.1811-1820, 2000.

SPÖRRI, B.; BICKEL, M.; DOBBELAERE, D.; MACHADO, J. Soluble interleukin-1 receptor--reverse signaling in innate immunoregulation. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v.12, n.1, p.37-32, 2001.

STARK, G.R.; KERR, I.M.; WILLIAMS, B.R.G.; SILVERMAN, R.H.; SCHREIBER, R.D. How cells respond to interferons. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 67, p. 227-264, 1998.

STRIZ, I.; MIO, T.; ADACHI, Y.; ROMBERGER, D. J.; RENNARD, S.I. Th2-type cytokines modulate IL-6 release by human bronchial epithelial cells. **Immunol Lett.**, v.70, n.2, p. 83-88, 1999.

STUEHR, D. J. Purification and properties of nitric oxide synthases. **Methods Enzymol.**, v. 268, p. 324-333, 1996.

TACHIBANA, T.; MATSUYAMA, T.; ITO, M.; MITSUYAMA, M. *Sporothrix schenckii* thermo-intolerant mutants losing fatal visceral infectivity but retaining high cutaneous infectivity. **Med. Mycol.**, v.39, n.3, p.295-298, 2001.

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, n.1, p.21-27, 1998.

TAKA, T.; KISHIMOTO, T. Interleukin-6, p.143-167 *In*: AGGARWAL, B.B.; GUTTERMAN, J.U. (Eds). **Human cytokines**. Boston: Blackwell Scientific Publications, 1992, 441p.

TANUMA, H.; ASAI, T.; ABE, M.; NISHIYAMA, S.; KATSUOKA, K. Case report. Lymphatic vessel-type sporotrichosis: immunohistochemical evaluation and cytokine expression pattern. **Mycoses**, v.44, n.7-8, p.316-320, 2001.

TAYLOR-ROBINSON, A. W.; LIEW, F. Y.; SEVERN, A.; XU, D.; McSORLEY, S. J.; GARSIDE, P.; PADRON, J.; PHILLIPS, R. S. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 24, 980-984,1994.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol.**, v.3, n.2, p.133-146, 2003 .

TRINCHIERI, G. Regulatory role of T cells producing both interferon gamma and interleukin 10 in persistent infection. **J Exp Med.**, v. 10, p. 53-57, 2001.

VOLDOUKIS, I.; MAZIER, D.; DEBRÉ, P.; MOSSALAYI, M.D. Nitric oxide and human infectious disease. **Res. Immunol.**, v.146, n.9, p.689-692, 1995.

WANG, Z.; WANG, Y.; ZHU, K.; GUO, L.; YANG, Y. Mechanism of three inhibitors of TACE in blocking the converting of pro-TNF alpha into sTNF alpha. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.**, v.23, n.2, p.116-120, 2003.

WILLMENT, J. A.; LIN, H. H.; REID, D. M.; TAYLOR, P. R.; WILLIAMS, D. L.; WONG, S. Y.; GORDON, S.; BROWN, G. D. Dectin-1 expression and function are enhanced on alternatively activated and GM-CSF-treated macrophages and are negatively regulated by IL-10, dexamethasone and lipopolysaccharide. **J. Immunol.**, v. 171, p. 4569-4573, 2003.

XIE, Q.; KAWAKAMI, K.; KUDEKEN, N.; ZHANG, T.; QURESHI, M.H.; SAITO, A. Different susceptibility of three clinically isolated strains of *Cryptococcus neoformans* to the fungicidal effects of reactive nitrogen and oxygen intermediates: possible relationships with virulence. **Microbiol. Immunol.**, v.41, n.9, p.725-731, 1997.

ZHANG, T.; KAWAKAMI, K.; QURESHI, M.H.; OKAMURA, H.; KURIMOTO, M.; SAITO, A. Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 synergistically induce the fungicidal

activity of murine peritoneal exsudate cells against *Cryptococcus neoformans* through production of gamma interferon by natural killer cells. **Infect. Immun.**, v.65, n.9, p. 3594-3599, 1997.

ZHOU, P.; SIEVE, M.C.; BENNETT, J.; KWON-CHUNG, K.J.; TEWARI, R.P.; GAZZINELLI, R.T.; SHER, A.; SEDER, R.A. IL-12 prevents mortality in mice infected with *Histoplasma capsulatum* through induction of IFN-gamma. **J Immunol.**, v.155, n.2, p.785-795, 1995.

ZWILLING, B. S.; EISENSTEIN, T. K. **Macrophage-pathogen interactions.** New York: Marcel Dekker, 634p., 1994.

VIII. ANEXO I - Tabelas

Tabela 1 - Viabilidade celular para os grupos testados

Semanas de Infecção	ANIMAIS INFECTADOS			ANIMAIS NORMAIS (NÃO INFECTADOS)		
	Exoantígeno	LPS	RPMI-1640C	Exoantígeno	LPS	RPMI-1640C
1 ^a	96,32± 3,75	99,18±1,12	99,75 ± 0,50	98,38 ± 3,62	99,60±0,89	99,25± 0,95
2 ^a	76,80 ± 2,62	90,37± 1,50	98,50 ± 1,91	99,42 ± 0,78	99,01±1,85	97,25± 1,70
3 ^a	80,22 ± 1,87	83,87 ± 3,24	99,00 ± 1,41	98,66 ± 2,26	99,51±0,91	98,00 ± 1,82
4 ^a	86,81 ± 1,08	89,64 ± 1,85	98,75 ± 1,50	94,12 ± 7,16	94,57±7,43	97,25 ± 3,59
5 ^a	86,49± 1,25	89,80± 2,11	97,00 ± 4,08	96,59 ± 3,58	96,74±3,03	97,75 ± 2,21
6 ^a	90,25± 1,47	97,11± 2,23	98,00± 2,82	96,86± 4,53	97,58±3,63	97,50± 2,64
7 ^a	93,71 ± 1,92	97,24 ± 3,40	95,25 ± 3,30	96,59 ± 3,58	97,37±2,97	99,25 ± 0,95
8 ^a	83,40 ± 2,08	97,82± 2,13	96,25 ± 2,98	96,30 ± 3,29	99,28±0,97	99,00± 0,81
9 ^a	80,82 ± 2,25	92,89 ± 3,30	99,50 ± 0,57	96,86 ± 4,53	97,40±3,72	99,50 ± 0,57
10 ^a	94,40 ± 4,84	98,19 ± 2,02	99,25 ± 0,95	99,42 ± 0,78	97,03±4,18	99,00± 1,41

Tabela 2 - Valores de liberação de iNOS (pmol/mL) para os grupos testados

Semanas de Infecção	ANIMAIS INFECTADOS			ANIMAIS NORMAIS (NÃO INFECTADOS)		
	Exoantígeno	LPS	RPMI-1640C	Exoantígeno	LPS	RPMI-1640C
1 ^a	65,46 ± 8,82	97,06± 5,32	0,69 ± 0,28	9,96 ± 0,60	31,43 ± 0,65	0,27± 0,10
2 ^a	84,40 ± 9,98	101,40± 4,05	1,05 ± 0,29	10,21 ± 0,66	31,83 ± 0,44	0,27± 0,12
3 ^a	132,10 ± 11,54	168,70± 7,90	1,22 ± 0,41	11,63 ± 0,38	31,66 ± 0,49	0,33± 0,20
4 ^a	165,10 ± 8,77	190,10 ± 8,01	1,35 ± 0,54	11,80 ± 0,24	32,60 ± 0,53	0,43± 0,19
5 ^a	203,40 ± 15,55	209,80± 9,75	2,40 ± 0,46	11,33 ± 0,37	32,79 ± 0,56	0,49± 0,28
6 ^a	217,80 ± 21,23	243,80± 8,58	2,10 ± 0,48	11,77 ± 0,19	32,23 ± 0,81	0,40± 0,17
7 ^a	148,90± 6,87	184,90± 7,33	1,56 ± 0,27	12,01 ± 0,51	32,263 ± 0,61	0,42± 0,23
8 ^a	122,40 ± 7,56	179,20± 10,75	1,12 ± 0,27	11,18 ± 0,33	32,13 ± 0,70	0,45± 0,15
9 ^a	119,20 ± 7,94	145,00± 11,97	0,87 ± 0,24	10,30 ± 0,40	31,87± 0,59	0,27± 0,12
10 ^a	115,21 ± 6,64	128,40± 9,15	0,92 ± 0,24	9,76 ± 0,45	30,74± 0,42	0,56± 0,26

Tabela 3 - Valores de liberação de NO ($\mu\text{mols}/5 \times 10^6$ células) para os grupos testados

Semanas de Infecção	ANIMAIS INFECTADOS			ANIMAIS NORMAIS (NÃO INFECTADOS)		
	Exoantígeno	LPS	RPMI-1640C	Exoantígeno	LPS	RPMI-1640C
1 ^a	79,76 \pm 2,04	91,96 \pm 1,28	2,99 \pm 0,77	13,80 \pm 2,24	39,04 \pm 4,40	0,38 \pm 0,46
2 ^a	103,70 \pm 1,81	90,72 \pm 1,25	4,38 \pm 0,41	17,98 \pm 1,51	39,78 \pm 2,23	2,00 \pm 0,55
3 ^a	132,83 \pm 1,37	94,13 \pm 1,45	3,73 \pm 0,78	14,83 \pm 2,80	39,78 \pm 2,98	0,78 \pm 0,72
4 ^a	165,75 \pm 1,17	80,13 \pm 1,08	4,67 \pm 0,22	17,57 \pm 1,64	41,42 \pm 2,64	0,35 \pm 0,48
5 ^a	213,72 \pm 1,95	79,06 \pm 1,24	6,25 \pm 0,34	23,29 \pm 7,43	46,46 \pm 4,45	0,28 \pm 0,40
6 ^a	237,6 \pm 4,94	76,74 \pm 2,89	6,38 \pm 0,84	21,03 \pm 2,45	45,88 \pm 4,21	0,70 \pm 0,40
7 ^a	184,9 \pm 4,32	77,66 \pm 1,60	5,86 \pm 1,32	19,33 \pm 2,83	41,52 \pm 5,40	1,11 \pm 0,24
8 ^a	179,2 \pm 1,16	71,61 \pm 1,15	4,79 \pm 0,85	24,02 \pm 2,81	39,74 \pm 2,45	0,70 \pm 0,40
9 ^a	145,0 \pm 1,33	84,39 \pm 1,03	3,64 \pm 0,72	15,47 \pm 1,02	38,24 \pm 3,63	1,11 \pm 0,24
10 ^a	128,10 \pm 2,30	88,19 \pm 0,63	2,58 \pm 0,63	16,99 \pm 2,35	29,23 \pm 2,80	1,11 \pm 0,24

Tabela 4 - Valores de liberação de IL-1 β (pg/mL) para os grupos testados

Semanas de Infecção	ANIMAIS INFECTADOS			ANIMAIS NORMAIS (NÃO INFECTADOS)		
	Exoantígeno	LPS	RPMI-1640C	Exoantígeno	LPS	RPMI-1640C
1 ^a	286,80 \pm 21,72	466,00 \pm 8,00	12,30 \pm 0,92	57,79 \pm 11,25	170,30 \pm 11,27	1,48 \pm 0,29
2 ^a	269,14 \pm 31,16	464,80 \pm 10,13	6,90 \pm 0,49	83,09 \pm 11,70	193,42 \pm 8,00	1,40 \pm 0,26
3 ^a	229,65 \pm 13,45	375,00 \pm 12,41	6,64 \pm 0,17	114,30 \pm 15,73	195,85 \pm 8,43	1,33 \pm 0,57
4 ^a	195,04 \pm 12,64	351,20 \pm 9,50	10,48 \pm 0,59	107,45 \pm 10,94	192,25 \pm 20,32	1,23 \pm 0,27
5 ^a	94,00 \pm 21,07	335,60 \pm 10,01	13,98 \pm 0,36	109,35 \pm 5,98	203,55 \pm 12,17	1,07 \pm 0,47
6 ^a	93,03 \pm 8,92	340,00 \pm 12,45	10,48 \pm 1,32	109,05 \pm 7,29	205,55 \pm 14,10	1,24 \pm 0,42
7 ^a	120,60 \pm 11,90	364,80 \pm 10,50	4,28 \pm 0,87	98,25 \pm 8,95	200,55 \pm 12,07	0,91 \pm 0,33
8 ^a	137,00 \pm 13,60	372,00 \pm 9,56	6,16 \pm 1,47	91,05 \pm 3,70	200,25 \pm 11,81	0,91 \pm 0,33
9 ^a	142,20 \pm 17,24	387,60 \pm 6,73	4,56 \pm 1,31	90,33 \pm 2,90	200,64 \pm 6,09	1,24 \pm 0,42
10 ^a	168,21 \pm 17,92	471,00 \pm 6,28	4,59 \pm 0,63	85,95 \pm 3,94	201,05 \pm 9,82	1,11 \pm 0,25

Tabela 5 - Valores de liberação de TNF- α (pg/mL) para os grupos testados

Semanas de Infecção	ANIMAIS INFECTADOS			ANIMAIS NORMAIS (NÃO INFECTADOS)		
	Exoantígeno	LPS	RPMI-1640C	Exoantígeno	LPS	RPMI-1640C
1 ^a	90,61 \pm 18,43	286,17 \pm 15,76	12,30 \pm 0,92	58,57 \pm 13,95	152,60 \pm 15,73	1,48 \pm 1,28
2 ^a	50,06 \pm 15,53	205,03 \pm 11,66	6,90 \pm 0,49	54,82 \pm 16,62	161,47 \pm 15,48	1,39 \pm 1,25
3 ^a	55,40 \pm 14,68	128,10 \pm 12,56	6,64 \pm 0,17	48,92 \pm 14,39	154,62 \pm 14,69	1,33 \pm 1,57
4 ^a	48,62 \pm 14,11	91,58 \pm 15,26	10,48 \pm 0,59	58,46 \pm 13,13	149,06 \pm 18,53	1,23 \pm 1,26
5 ^a	72,44 \pm 15,04	86,04 \pm 13,22	13,98 \pm 0,36	59,65 \pm 12,59	152,44 \pm 16,75	1,06 \pm 1,46
6 ^a	106,90 \pm 15,29	74,66 \pm 14,16	10,48 \pm 1,32	66,17 \pm 19,07	161,19 \pm 15,59	1,54 \pm 1,42
7 ^a	183,56 \pm 18,21	186,87 \pm 14,42	4,28 \pm 0,87	54,50 \pm 16,09	177,26 \pm 18,76	0,91 \pm 1,33
8 ^a	203,35 \pm 14,65	220,94 \pm 15,81	6,16 \pm 1,47	71,71 \pm 13,88	174,90 \pm 15,95	1,68 \pm 1,34
9 ^a	22,82 \pm 16,76	249,71 \pm 12,61	4,56 \pm 1,31	74,16 \pm 11,78	216,22 \pm 15,33	1,72 \pm 1,43
10 ^a	202,47 \pm 18,12	289,95 \pm 13,62	4,59 \pm 0,63	72,86 \pm 13,06	206,16 \pm 12,51	1,24 \pm 1,38

Tabela 6 - Valores de liberação de IL-12 (pg/mL) para os grupos testados

Semanas de Infecção	ANIMAIS INFECTADOS			ANIMAIS NORMAIS (NÃO INFECTADOS)		
	Exoantígeno	LPS	RPMI-1640C	Exoantígeno	LPS	RPMI-1640C
1 ^a	451,87 ± 14,66	659,82± 30,69	2,99 ± 0,77	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,04	0,38± 0,46
2 ^a	557,20 ± 29,78	557,20± 29,78	4,38 ± 0,41	0,13 ± 0,02	0,14 ± 0,06	1,48± 0,19
3 ^a	733,22 ± 34,17	733,22± 34,17	3,63 ± 0,49	0,12 ± 0,04	0,15 ± 0,05	0,78± 0,72
4 ^a	846,60 ± 29,08	846,60 ± 29,08	4,67 ± 0,22	0,14 ± 0,06	0,15 ± 0,04	0,35± 0,48
5 ^a	928,35 ± 20,34	928,35± 20,34	4,65 ± 0,30	0,14 ± 0,03	0,14 ± 0,08	0,28± 0,40
6 ^a	963,82 ± 22,17	963,82± 22,17	5,76 ± 0,37	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,70± 0,40
7 ^a	684,80± 19,09	684,80± 19,08	4,26 ± 0,21	0,15 ± 0,08	0,15 ± 0,07	1,11± 0,24
8 ^a	561,55 ± 19,16	561,55± 19,16	4,19 ± 0,22	0,13 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,70± 0,40
9 ^a	450,20 ± 14,16	450,20± 14,16	3,64 ± 0,19	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,01	1,11± 0,24
10 ^a	320,02 ± 22,04	320,02± 22,64	2,98 ± 0,10	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,03	1,11± 0,24

Tabela 7 - Valores de liberação de IFN- γ (pg/mL) para os grupos testados

Semanas de Infecção	ANIMAIS INFECTADOS			ANIMAIS NORMAIS (NÃO INFECTADOS)		
	Exoantígeno	ConA	RPMI-1640C	Exoantígeno	ConA	RPMI-1640C
1 ^a	74,95 \pm 9,15	83,94 \pm 5,72	1,52 \pm 0,68	6,02 \pm 0,93	11,03 \pm 0,94	0,53 \pm 0,34
2 ^a	64,32 \pm 8,48	106,17 \pm 4,91	2,33 \pm 0,48	5,70 \pm 1,30	9,64 \pm 1,21	0,63 \pm 0,28
3 ^a	79,65 \pm 4,45	115,23 \pm 11,54	2,09 \pm 0,64	4,72 \pm 1,17	11,23 \pm 1,50	0,63 \pm 0,25
4 ^a	121,24 \pm 11,42	147,50 \pm 8,77	3,03 \pm 0,52	7,35 \pm 0,86	10,52 \pm 1,24	0,70 \pm 0,29
5 ^a	143,02 \pm 11,00	182,78 \pm 15,54	3,62 \pm 0,52	6,77 \pm 0,61	11,73 \pm 1,41	0,78 \pm 0,23
6 ^a	133,56 \pm 15,15	203,40 \pm 21,22	2,09 \pm 0,64	5,81 \pm 2,22	11,90 \pm 1,39	0,63 \pm 0,25
7 ^a	109,08 \pm 5,60	167,23 \pm 7,33	1,77 \pm 0,20	7,05 \pm 1,05	11,28 \pm 1,02	0,49 \pm 0,25
8 ^a	45,44 \pm 10,78	163,92 \pm 10,76	1,50 \pm 0,40	6,39 \pm 0,76	10,64 \pm 1,06	0,40 \pm 0,20
9 ^a	46,32 \pm 4,84	126,07 \pm 11,97	1,33 \pm 0,29	6,30 \pm 1,66	11,58 \pm 1,32	0,43 \pm 0,20
10 ^a	32,64 \pm 5,42	112,45 \pm 9,17	1,21 \pm 0,28	6,90 \pm 1,01	11,26 \pm 1,05	0,40 \pm 0,21

Tabela 8 - Valores de liberação de IL-2 (pg/mL) para os grupos testados

Semanas de Infecção	ANIMAIS INFECTADOS			ANIMAIS NORMAIS (NÃO INFECTADOS)		
	Exoantígeno	ConA	RPMI-1640C	Exoantígeno	ConA	RPMI-1640C
1 ^a	15,24±4,09	1,98± 2,74	31,01±1,53	2,27±0,2	0,91± 0,35	1,32± 0,28
2 ^a	15,09±3,76	1,83± 2,15	29,64±1,26	2,29±0,86	0,86± 0,69	1,63± 0,28
3 ^a	16,89±2,99	1,36± 11,54	27,44±1,31	2,98±0,47	0,83± 0,42	1,27± 0,25
4 ^a	11,83± 2,11	1,78± 2,35	26,11±1,29	3,75±0,98	1,25± 0,6	0,55± 0,29
5 ^a	4,63 ± 3,2	1,13± 2,34	16,66±1,31	3,31±0,86	1,29± 0,42	0,43± 0,23
6 ^a	5,41± 2,23	1,06± 2,26	14,51±1,25	2,75±0,8	0,68± 0,87	0,71± 0,25
7 ^a	2,84± 2,8	1,48± 2,7	13,32±1,4	2,81±1,1	0,32± 0,72	0,13± 0,25
8 ^a	2,57± 1,18	1,21± 2,51	12,98±1,3	2,12±0,4	1,42± 0,97	0,22± 0,20
9 ^a	1,9± 2,37	1,61± 2,34	12,47±1,32	2,64±0,69	0,38± 0,69	0,56± 0,20
10 ^a	1,68± 2,49	1,73± 2,33	11,53±1,65	2,26±0,54	0,37± 0,65	0,72± 0,21

Tabela 9 - Valores de incorporação de timidina (transformação linfocitária) para os grupos testados

Semanas de Infecção	ANIMAIS INFECTADOS			ANIMAIS NORMAIS (NÃO INFECTADOS)		
	Exoantígeno	ConA	RPMI-1640C	Exoantígeno	ConA	RPMI-1640C
1 ^a	1567±12,4	64,54± 6,88	14±1,03	99±8,45	20±1,45	7771± 17,44
2 ^a	1413±15,61	2552±9,65	15±0,6	88±9,56	25±1,12	7574±20,04
3 ^a	1109±17,12	2384±5,46	18±0,25	36±6,22	27±1,09	7660± 12,90
4 ^a	501±21,13	1290±3,65	12±0,85	30±7,89	23±0,98	7675±21,34
5 ^a	513±15,42	1272± 5,08	17±0,58	27±6,43	22±0,75	7471± 18,53
6 ^a	652±16,32	1765± 4,70	11±0,26	33±5,32	21±0,94	7471±18,53
7 ^a	1123±18,24	3476±8,96	17±0,53	38±8,33	23±1,02	7425±19,11
8 ^a	1265±15,46	6127± 6,43	13±0,64	44±6,23	28±1,08	6852±6,25
9 ^a	1316±17,18	6431± 3,74	16±0,68	59±8,25	24±0,72	6336±5,98
10 ^a	1422±20,21	6525± 3,33	19±0,39	58±9,17	25±1,12	6107±22,01

Tabela 10 - Valores de liberação de IL-6 (pg/mL) para os grupos testados

Semanas de Infecção	ANIMAIS INFECTADOS			ANIMAIS NORMAIS (NÃO INFECTADOS)		
	Exoantígeno	LPS	RPMI-1640C	Exoantígeno	LPS	RPMI-1640C
1 ^a	714,75 ± 57,30	623,00± 28,92	2,85 ± 0,32	940,20 ± 93,33	771,19 ± 63,94	0,28± 0,23
2 ^a	723,65 ± 27,13	683,50± 36,50	3,24 ± 0,31	846,00 ± 20,35	743,62 ± 25,06	0,47± 0,33
3 ^a	810,62 ± 59,58	645,12± 30,36	3,68 ± 0,37	855,93 ± 86,95	771,47 ± 77,37	0,57± 0,22
4 ^a	941,00 ± 69,14	1052,50 ± 38,32	3,94 ± 0,29	1000,08 ± 98,61	897,19 ± 76,50	0,73± 0,32
5 ^a	883,25 ± 21,11	1025,00± 31,73	3,47 ± 0,63	1054,12 ± 85,49	839,91 ± 124,01	0,71± 0,20
6 ^a	848,00 ± 28,19	1027,03± 34,74	3,16 ± 0,34	950,48 ± 58,96	926,69 ± 130,06	0,61± 0,61
7 ^a	658,50± 29,40	900,50± 27,73	2,48 ± 0,37	1108,72 ± 15,71	935,94 ± 50,83	0,37± 0,24
8 ^a	381,50 ± 27,97	617,53± 38,72	2,41 ± 0,18	1168,88 ± 29,85	899,51 ± 121,32	0,32± 0,17
9 ^a	448,00 ± 43,99	620,92± 41,32	2,09 ± 0,35	1206,84 ± 40,87	994,59 ± 62,74	0,55± 0,23
10 ^a	370,10 ± 41,30	592,70± 40,57	1,85 ± 0,16	1190,47± 65,27	890,53 ± 80,02	0,77± 0,15

Tabela 11 - Valores de liberação de IL-10 (pg/mL) para os grupos testados

Semanas de Infecção	ANIMAIS INFECTADOS			ANIMAIS NORMAIS (NÃO INFECTADOS)		
	Exoantígeno	ConA	RPMI-1640C	Exoantígeno	ConA	RPMI-1640C
1 ^a	60,2 ±2,55	38,09±1,26	0,4±0,91	8,99±2,37	10,69±2,68	0,56±0,24
2 ^a	49,84 ±2,19	35,92±1,38	1,2±0,81	8,77±2,19	10,12±3,08	0,58± 0,32
3 ^a	43,19±3,16	23,84±5,46	1,33±0,61	6,99±3,53	9,93±3,41	0,22±0,21
4 ^a	27,67±3,92	34,63±2,43	0,43±0,52	6,46±3,58	8,16±4,39	0,35± 0,18
5 ^a	22,35±4,95	33,45±2,28	0,40±0,87	5,51±4,36	6,39±2,71	0,40±0,19
6 ^a	22,26±4,45	31,39±2,21	1,52±1,11	5,15±3,83	3,84±2,68	0,21±0,25
7 ^a	12,31±3,49	27,26±2,12	0,28±0,26	4,83±3,28	3,38±2,19	0,62±0,11
8 ^a	12,28±3,28	26,74±2,09	0,20±0,59	3,68±4,81	5,04±2,14	0,24±0,13
9 ^a	10,32±4,8	23,65±1,78	0,24±0,31	3,77±5,35	5,21±3,53	0,40±0,17
10 ^a	9,44±5,35	22,70±1,13	0,70±0,74	3,15±4,09	4,35±2,78	0,60±0,21

Tabela 12 - Valores de liberação de IL-4 (pg/mL) para os grupos testados

Semanas de Infecção	ANIMAIS INFECTADOS			ANIMAIS NORMAIS (NÃO INFECTADOS)		
	Exoantígeno	ConA	RPMI-1640C	Exoantígeno	ConA	RPMI-1640C
1 ^a	13,37± 0,89	33,45± 0,75	1,74 ± 0,38	5,30± 0,25	9,10± 1,60	1,48± 0,28
2 ^a	17,94± 0,67	28,77± 1,03	1,29 ± 0,39	4,92± 0,13	6,90± 1,10	1,39± 0,25
3 ^a	20,92± 0,51	25,30± 0,74	1,72 ± 0,23	5,11± 0,12	6,64± 0,39	1,33± 0,57
4 ^a	32,01± 0,92	25,15± 1,11	1,52 ± 0,57	5,25± 0,36	8,88± 1,56	1,23± 0,26
5 ^a	39,67± 0,94	19,58± 0,82	1,68 ± 0,41	4,46± 0,36	7,38± 1,85	1,07± 0,46
6 ^a	40,77± 1,15	14,20± 0,43	3,48 ± 0,55	5,38± 0,57	10,68± 0,99	1,24± 0,42
7 ^a	48,24± 0,87	13,75± 0,33	2,64 ± 0,48	4,99± 0,29	10,68± 1,78	0,91± 0,33
8 ^a	50,44± 1,03	12,30± 0,83	2,06 ± 0,60	4,87± 0,17	8,36± 0,68	0,91± 0,34
9 ^a	53,61±1,82	10,54± 0,86	2,31± 0,79	5,02± 0,13	11,96± 0,61	1,24 ± 1,60
10 ^a	55,22± 1,09	9,74± 0,79	1,98 ± 0,91	5,01± 0,12	1,24± 0,42	1,24± 0,42

Tabela 13 - Valores de detecção de IgG para os grupos testados

Semanas de Infecção	ANIMAIS INFECTADOS - Exoantígeno			
	1/20	1/320	1/1560	CN
2 ^a	0,1410±0,003	0,1236±0,003	0,1564±0,002	0,032±0,006
4 ^a	0,1020±0,0018	0,087±0,007	0,0528±0,013	0,056±0,003
6 ^a	0,0748±0,002	0,07±0,007	0,0798±0,003	0,065±0,004
8 ^a	0,157±0,004	0,107±0,002	0,0744±0,002	0,07±0,005
10 ^a	0,1986±0,0012	0,1243±0,0015	0,0844±0,004	0,066±0,003