

Universidade Estadual Paulista - UNESP
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara

Avaliação da apoptose e resposta Th17 em modelo murino de esporotricose

Lucas Souza Ferreira

Araraquara/SP

2014

Universidade Estadual Paulista - UNESP
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara

Avaliação da apoptose e resposta Th17 em modelo murino de esporotricose

Lucas Souza Ferreira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia
da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP,
Campus de Araraquara, para a defesa de tese de
Doutorado, como pré-requisito para a obtenção do
título de Doutor.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Iracilda Zeppone Carlos

Araraquara/SP

2014

Ficha Catalográfica

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

Ferreira, Lucas Souza
F383a Avaliação da apoptose e resposta Th17 em modelo murino de esporotricose
/ Lucas Souza Ferreira. – Araraquara, 2014
59 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita
Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em
Biotecnologia e Biotecnologia aplicadas à Farmácia
Orientador: Iracilda Zeppone Carlos

1. Sporothrix schenckii. 2. Esporotricose. 3. , Células Th17. 4. Resposta
Th17. 5. Depleção de IL-23 . I. Carlos, Iracilda Zeppone Carlos, orient. II.
Título.

CAPES: 40300005

Sumário

Capítulo 1	4
Lista de Figuras	5
Resumo	7
1. Introdução	11
1.1. <i>Sporothrix schenckii</i> e esporotricose	11
1.2. Composição da parede celular e fatores de virulência	14
1.3. Resposta immune contra <i>S. schenckii</i>	16
1.4. Infecção vs apoptose	21
1.5. Justificativa	23
2. Objetivos	25
3.1. Microorganismo e condições de cultivo	26
3.2. Preparação da levedura termo-inativada de <i>S. schenckii</i>	26
3.3. Animais	27
3.4. Infecção experimental e tratamento dos animais	27
3.5. Determinação das unidades formadoras de colônia	28
3.6. Depleção de IL-23 mediada por anticorpo	28
3.7. Obtenção das células totais do baço	28
3.8. Determinação da liberação ex vivo de citocinas	29
3.9. Citometria de fluxo	29
3.10. Análise estatística	30
4. Resultados	31
4.1. Cinética da infecção	31
4.3. Cinética da ocorrência de apoptose nas células do baço	35
4.5. Mudança na frequência de células Th1, Th17 e NK no baço seguinte à depleção de IL-23.	39
5. Discussão	42
Conclusões	47
Capítulo 2	59

Capítulo 1

Lista de Figuras

Figura 1. Cinética da infecção sistêmica.

Figura 1. Cinética da infecção sistêmica.

Figura 3. Cinética da liberação *ex vivo* de citocinas efetoras Th1 e Th17.

Figura 4. Cinética da ocorrência de apoptose nas células do baço.

Figura 5. Carga fúngica sistêmica e liberação *ex vivo* de citocinas seguinte à depleção de IL-23.

Figura 6. Mudança na frequência de células Th1, Th17 e NK no baço seguinte à depleção de IL-23.

Lista de abreviações

i.p.: intraperitoneal

IFN: interferon

CLRs: receptores da família das lectinas do tipo C

DCs: células dendríticas

FMO: “fluorescence minus one”

Foxp3: “forkhead box P3”

GATA-3: “GATA-binding protein 3”

Hlx: “homeobox transcription factor”

IL: interleucina

IL-23R: receptor de IL-23

mAb: anticorpo monoclonal

PAMPs: “pathogen-associated molecular patterns”

PRRs: “pattern recognition receptors”

ROR γ t: “retinoic acid receptor-related orphan receptor γ t”

Runx3: “runt-related transcription factor 3”

T-bet: “T-box expressed in T cells”

Tfh: “T follicular helper”

TLRs: “Toll-like receptors”

TGF: “transforming growth factor”

FasL: Fas ligante

TNF- α : fator de necrose tumoral- α

gp70: glicoproteína de 70 kDa

RNIs: intermediários reativos do nitrogênio

KLRG-1: “killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1”

NK: “natural killer”

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintase

MOMP: permeabilização da membrana externa mitocondrial

MMR: receptor de manose de macrófagos

TLRs: receptores do tipo “toll-like”

TRAIL: “TNF-related apoptosis-inducing ligand”

HIV: vírus da imunodeficiência humana

Resumo

A descoberta recente das células T “helper” 17 (Th17) e de inúmeros outros subtipos de células Th expandiu o paradigma Th1/Th2, que persistia desde sua introdução por Mosmann e colaboradores em 1986, mas que não fornecia explicação suficiente para uma série de condições homeostáticas e patológicas. Definidas caracteristicamente pela expressão do fator de transcrição “retinoic acid receptor-related orphan receptor” γ t (ROR γ t) e pela produção de interleucina (IL)-17, as células Th17 são potentes indutoras de inflamação tecidual, com reconhecido papel no combate a bactérias e fungos extracelulares e na manutenção da homeostasia em mucosas. Apesar disso, o interesse pelo seu estudo veio do papel central que desempenham no desenvolvimento de condições inflamatórias crônicas importantes como esclerose múltipla, artrite reumatóide e doença de Crohn, razão pela qual têm sido alvo de novas e promissoras terapias especificamente voltadas para o seu bloqueio. Nesse sentido, tem importância profilática a identificação de patógenos oportunistas cuja eliminação dependa da resposta Th17 e que possam representar risco a pacientes submetidos a terapias anti-Th17. Conforme mostramos aqui pela primeira vez, este é o caso do fungo *Sporothrix schenckii*, causador da esporotricose, e que até agora apresentava importância clínica quase que exclusivamente limitada a pacientes imunodeprimidos, quer seja como consequência do tratamento farmacológico da rejeição a transplantes ou contra o câncer, ou por imunodeficiências primárias ou adquiridas diversas. Diante disso, o objetivo desse estudo foi avaliar a participação da resposta Th17 na infecção por *S. schenckii* e qual o grau de importância desta para a capacidade do animal eliminar a infecção. Para isso, nós desenvolvemos um modelo de infecção sistêmica por *S. schenckii* em camundongos e avaliamos o desenvolvimento das células e a produção de citocinas efetoras Th17. Adicionalmente, a importância da resposta Th17 para o controle da infecção foi avaliada pelo tratamento dos animais com um anticorpo monoclonal neutralizante anti-IL-23p19, visando modular negativamente a resposta Th17. Nossos resultados mostram que a resposta Th17 desenvolve-se durante a infecção sistêmica por *S. schenckii* em camundongos, manifestando-se

pelo desenvolvimento de células Th17 e Th1/Th17 mistas, assim como pela produção aumentada tanto de IL-17 como de IL-22. Ainda, usando camundongos depletados de IL-23 pelo tratamento com anticorpo monoclonal (mAb) específico, mostramos que a resposta Th17 intacta é necessária para a ótima eliminação do fungo, mas não para a sobrevivência dos animais.

Palavras-chave: *Sporothrix schenckii*, esporotricose, células Th17, resposta Th17, depleção de IL-23.

Abstract

The discovery of T helper 17 (Th17) cells, along with many other Th cell subsets in the recent years, has expanded the Th1/Th2 paradigm that had persisted since its proposition by Mosmann and colleagues in 1986. Defined by the characteristic expression of the transcription factor retinoic acid receptor-related orphan receptor γ t (ROR γ t) and production of interleukin (IL)-17, Th17 cells are powerful inducers of tissue inflammation with a recognized role against extracellular bacteria and fungi and in the maintenance of mucosal homeostasis. Despite all this, the interest in their study came from the pivotal role they play in the development of major chronic inflammatory conditions such as multiple sclerosis, rheumatoid arthritis and Crohn's disease, reason why they have been the target of promising new therapies specifically aimed at their blockade. Accordingly, the identification of opportunistic pathogens whose clearance relies on the Th17 response is of huge prophylactic importance, for they could become a risk for patients subjected to anti-Th17 therapies. As shown here for the first time, this applies to *Sporothrix schenckii*, the agent of sporotrichosis, whose clinical importance was, until now, almost exclusively limited to immunodepressed individuals, either as a consequence of pharmacological treatment against transplant rejection or cancer, or due to various primary or acquired immunodeficiency disorders. In light of the above, the aim of this study was to assess the role of the Th17 response in the *S. schenckii* infection and its importance for the animal's ability to eliminate the infection. In order to do that, we developed a murine model of *S. schenckii* systemic infection and assessed the development and effector cytokines production from Th17 cells. Additionally, the Th17 response's importance for infection control was assessed by treating mice with an anti-IL-23p19 neutralizing monoclonal antibody, which was aimed at negatively modulating the Th17 response. Our results show that both Th17 and Th1/Th17 mixed cells are developed during the *S. schenckii* systemic mice infection, which also leads to augmented production of IL-17 and IL-22. Also, by using antibody-mediated IL-23-

depleted mice, we further demonstrate that optimal fungal clearance, but not survival, depends on an intact Th17 response.

Keywords: *Sporothrix schenckii*, sporotrichosis, Th17 cells, Th17 response, IL-23 depletion.

1. Introdução

1.1. *Sporothrix schenckii* e esporotricose

Sporothrix schenckii foi isolado pela primeira vez por Benjamin Schenck em 1896 nos Estados Unidos, a partir de um paciente de 36 anos apresentando lesões na mão e braço direitos, tendo recebido sua denominação atual em 1900 por Hektoen e Perkins, ao descreverem o segundo caso confirmado de esporotricose, também nos Estados Unidos. O primeiro caso de infecção animal natural foi descrito em ratos no Brasil por Lutz e Splendore, em 1907. Durante muitos anos, este fungo foi erroneamente classificado na divisão *Eumycota*, subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Hyphomycetes*, ordem *Moniliales*, e família *Moniliaceae*; atualmente é classificado na ordem *Ascomycota*, classe *Pyrenomycetes*, ordem *Ophiostomatales*, e família *Ophiostomataceae* (revisado por Barros *et al.*, 2011). *S. schenckii* é um fungo dimórfico amplamente distribuído na natureza, podendo ser encontrado no solo associado a plantas, madeira, água e matéria orgânica em decomposição. Apresenta-se, a 25°C ou em sua forma saprofítica na natureza, sob a forma de micélio constituído de hifas com 1 a 2 µm de diâmetro, septadas, hialinas, com conídios unicelulares lateralmente na hifa ou em grupos no final dos conidióforos. Quando se desenvolve a 37°C, *in vitro* ou nos tecidos do hospedeiro, cresce na forma de levedura, em muitos casos redondas, ovais ou em forma de “charuto” com 2 a 6 µm de diâmetro, e se reproduz por brotamento (Lopes-Bezerra *et al.*, 2006).

S. schenckii foi por muito tempo considerado o único agente etiológico da esporotricose, uma micose caracterizada pela evolução subaguda e crônica de lesões nodulares cutâneas ou subcutâneas, de distribuição universal, porém mais comum em regiões de zonas tropicais e subtropicais (Ramos-e-Silva *et al.*, 2007). Hoje, sabe-se que este fungo faz parte de um complexo de espécies relacionadas, incluindo *Sporothrix pallida* (antes denominado *Sporothrix albicans*), *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix luriei*, *Sporothrix mexicana* e *S. schenckii sensu strictu*. Com exceção de *S. pallida*, todas essas espécies já foram identificadas

como causadoras de esporotricose no homem e em outros animais. Ainda, estudos em um modelo murino imunocompetente mostraram diferentes níveis de virulência entre essas espécies, com *S. brasiliensis* se mostrando a mais virulenta, seguida de *S. schenckii sensu strictu*, *S. globosa* e *S. mexicana* (López-Romero *et al.*, 2011; Romeo & Criseo, 2013). A descoberta de que a esporotricose é causada não por uma, mas por um complexo de espécies, as quais apresentam diferentes níveis de virulência e, potencialmente, diferente composição antigênica, traz uma nova perspectiva sob a qual estudos anteriores devem ser analisados. Diante da impossibilidade de identificar, nestes estudos anteriores, quais as reais espécies envolvidas, quaisquer menções feitas no decorrer deste texto levam em consideração a descrição original utilizada.

A esporotricose afeta pessoas de qualquer idade, sexo ou raça e não precisa de fatores predisponentes para se desenvolver, porém é mais comum em homens adultos, devido a sua exposição ocupacional e recreacional. A infecção é adquirida através da implantação cutânea, em geral através de pequenos traumas com materiais contaminados com solo. Assim, fazendeiros, jardineiros, floristas, horticultores, mineradores e outros profissionais cuja atividade exija contato com o solo e plantas são os principais grupos de risco. Mais raramente, o fungo pode ser inalado, aspirado ou ingerido, produzindo infecção sistêmica em indivíduos suscetíveis. A transmissão zoonótica também é possível e envolve, mais frequentemente, gatos, roedores e tatus, embora diversos outros animais tenham também sido implicados na transmissão ao homem, como aves, cachorros, esquilos, cavalos e até mesmo peixes (Kauffman, 1999; Morris-Jones, 2002; Ramos-e-Silva *et al.*, 2007). Mais frequentemente a esporotricose se apresenta na forma linfocutânea, começando como uma lesão nodular ou ulcerada no local de inoculação do fungo e então evoluindo para uma série de lesões nodulares seguindo a trajetória dos vasos linfáticos regionais. A doença pode se apresentar ainda nas formas cutânea fixa, limitada ao local de inoculação do fungo, e disseminada, desenvolvida principalmente por pacientes imunocomprometidos. Formas extracutâneas também podem se desenvolver, mais comumente

com comprometimento pulmonar e osteoarticular, embora hajam relatos de disseminação hematogênica severa com o comprometimento de múltiplos órgãos (Lopes-Bezerra *et al.*, 2006).

A correta estimativa do número de casos de esporotricose é difícil, haja visto não se tratar de uma doença de notificação compulsória, cujos casos de que se tem conhecimento são aqueles notificados espontaneamente na literatura. No entanto, em julho de 2013 a Secretaria Estadual de Saúde do Rio de Janeiro incluiu a esporotricose na lista de doenças de notificação compulsória dentro do estado (publicado no Diário oficial da União em 16 de julho de 2013). A discrepância entre o número real de casos e aqueles de que se tem conhecimento fica evidente ao se considerar o trabalho de Sivagnanam *et al.* (2012). Os autores relatam que nenhum caso de esporotricose na região de “New South Wales” na Austrália foi publicado nas últimas décadas, mas foram capazes de identificar 31 casos (29 destes confirmados por exames laboratoriais) através de pesquisa na bases de dados de laboratórios e relatos de médicos e microbiologistas da região. Em vários países, a esporotricose é considerada uma infecção oportunista emergente (Freitas *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2013). Especificamente no Brasil, as últimas duas décadas foram marcadas por um grande aumento no número de casos felinos e caninos, principalmente nas regiões sul e sudeste do país (Madrid *et al.*, 2012; Nobre *et al.*, 2001; Schubach *et al.*, 2004; 2006; Pereira *et al.*, 2014). Dados compilados de 1998 a 2004 mostram que, neste período, 759 pessoas foram diagnosticadas com esporotricose no Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas apenas. Destes, 83,4% reportaram contato com gatos portando esporotricose, e 55,8% dos mesmos também reportaram mordidas e arranhões de gatos (Schuback *et al.*, 2008). Embora menos comum nos Estado Unidos, a transmissão felina também já foi reportada nesse país (Rees & Swartzberg, 2011).

Conforme citado, as formas mais graves da esporotricose têm sido associadas a pacientes imunocomprometidos, como aqueles infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Gori *et al.*, 1997; Al-Tawfiq & Wool, 1998; de Araújo *et al.*, 2001). Foram reportados dois

casos de pacientes com HIV que desenvolveram meningite por *S. schenckii* associada a síndrome inflamatória da reconstituição imune (Galhardo *et al.*, 2010). Mahajan *et al.* (2010) reportaram três casos mais raros de esporotricose envolvendo (1) o desenvolvimento da doença sobre um carcinoma de células basais nódulo-ulcerativo; (2) esporotricose cutâneo-sistêmica disseminada, osteoarticular e possivelmente pleural; e (3) múltiplas lesões nodulares e pruríticas ao redor do tornozelo de uma paciente. Recentemente, Aung *et al.* (2013) reportaram dois casos de esporotricose pulmonar em pacientes idosos de 60 e 64 anos, ambos fumantes, com enfisema associado e apresentando, em momentos distintos, co-infecção bacteriana. Um destes pacientes veio a óbito por complicações de falha respiratória. Estes mesmos autores fizeram uma revisão da literatura, abordando 64 casos de esporotricose pulmonar primária e 22 casos de doença multifocal afetando os pulmões, a maioria (76 casos do total) dos Estados Unidos. Das 19 mortes reportadas, 14 foram devidas diretamente a complicações da infecção por *S. schenckii*, uma alta taxa de mortalidade que pode ser atribuída ao estado imunossuprimido de vários destes pacientes, à demora no diagnóstico e à ineficácia do tratamento medicamentoso.

1.2. Composição da parede celular e fatores de virulência

A forma leveduriforme de *S. schenckii* possui uma fina camada de compostos peptídico-polissacarídicos na superfície celular. Esta camada pode ser parcialmente liberada no meio de cultura por atrito, compreendendo uma série de produtos conjuntamente chamados de exoantígenos, presentes tanto na fase miceliar quanto na leveduriforme, os quais podem levar à formação de resposta imune celular e induzir a produção de anticorpos (Carlos *et al.*, 2009; Castillo *et al.*, 1990). A fração glicoprotéica isolada da parede celular de *S. schenckii* é denominada peptídeo-ramnomanana. Esta, quando isolada da forma leveduriforme do fungo, contém 33,5% de ramnose, 57% de manose e 14,2% de proteína (Shimonaka *et al.*, 1975). Um dos mais bem definidos determinantes antigênicos de *S. schenckii* é uma glicoproteína de 70 kDa (gp70), encontrada na parede celular tanto da fase miceliar como da leveduriforme do fungo,

contra a qual foi produzido um anticorpo monoclonal capaz de gerar proteção *in vivo*, demonstrada através da imunização passiva com o mesmo em camundongos. Existem ainda fortes evidências suportando o papel desta glicoproteína como uma adesina, responsável pela interação de *S. schenckii* com a matriz extracelular através da ligação à fibronectina (Alba-Fierro *et al.*, 2014; Lopes-Bezerra, 2011).

Os mecanismos de virulência do fungo são pouco conhecidos, mas sugere-se que a termotolerância, as enzimas extracelulares e polissacarídeos estejam envolvidos. Algumas enzimas extracelulares, como as fosfatases ácidas, parecem desempenhar papel importante na interação das células leveduriformes de *S. schenckii* com os macrófagos (Hogan *et al.*, 1996; Nascimento & Almeida, 2005). Sugere-se também que a virulência dos conídios do fungo está relacionada à composição de carboidratos da parede celular: conídios cultivados por menos tempo possuem maior proporção de ramnomanana em relação a manose em sua superfície e se mostraram mais virulentos (Fernandes *et al.*, 2000). Outro componente isolado da membrana das formas leveduriformes de *S. schenckii* e possivelmente envolvido com sua virulência é o ergosterol, o qual pode funcionar com um mecanismo de evasão das espécies reativas de oxigênio durante a fagocitose através da formação ergosterol peróxido (Sgarbi *et al.*, 1997). Ainda, tanto a galactomanana quanto a ramnomanana purificadas da superfície celular de *S. schenckii* são capazes de inibir a fagocitose das células leveduriformes por macrófagos peritoneais *in vitro* (Lopes-Bezerra *et al.*, 2006), demonstrando a participação destes componentes no reconhecimento do fungo por estas células. Muito pouco é conhecido sobre as interações moleculares de *S. schenckii* com a superfície das células do hospedeiro, mas sabe-se que o fungo é capaz de se prender a várias proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina, a laminina e o colágeno do tipo II (Figueiredo *et al.*, 2004).

Moléculas de ácido siálico também foram encontradas na superfície de *S. schenckii* e podem desempenhar um papel na patogenicidade deste fungo, uma vez que a remoção

enzimática dos resíduos de ácido siálico das formas infectantes de *S. schenckii* as tornam mais suscetíveis à fagocitose. Além disso, as formas saprofíticas não infectantes contêm menos resíduos de ácido siálico em sua superfície que as formas infectantes (Alviano *et al.*, 1999). A produção de melanina ou de produtos relacionados à melanina pelo fungo parece também estar relacionada à sua virulência, conforme demonstrado para vários outros fungos dimórficos patogênicos, como *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitides* e *Coccidioides posadasii* (Taborda *et al.*, 2008). Em linha com isso, as cepas de *S. schenckii* produtoras de melanina mostraram-se menos suscetíveis à ação de intermediários de nitrogênio e oxigênio e à fagocitose do que as cepas não produtoras (Romero-Martinez *et al.*, 2000; Morris-Jones *et al.*, 2003). Mais recentemente, Madrid *et al.* (2010) demonstraram que isolados pigmentados de *S. schenckii* possuem maior capacidade de invasão tecidual, promovendo a formação de granulomas multifocais, enquanto os isolados albinos induziram resposta inflamatória mais efetiva, ficando restringidos ao centro do granuloma. Por fim, foi demonstrado que isolados obtidos de casos clínicos são mais patogênicos do que os obtidos do meio ambiente, indicando a passagem sucessiva em animais pode aumentar a virulência de *S. schenckii*, originando linhagens mais agressivas que podem contribuir para a supressão da resposta imune (Barros *et al.*, 2003; Nobre *et al.*, 2005).

1.3. Resposta immune contra *S. schenckii*

A infecção experimental pode ser facilmente induzida em camundongos pela injeção intraperitoneal ou intratesticular de células leveduriformes de *S. schenckii*. 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 (Restrepo-Gutierrez *et al.*, 1993). Ainda, a infectividade de *S. schenckii* pode também estar relacionada à via de entrada e à profundidade de inoculação (Tachibana *et al.*, 1998). Um modelo de esporotricose disseminada em murinos foi desenvolvido em nosso laboratório (Carlos

et al., 1992), no qual a reação de hipersensibilidade tardia (*in vivo*) e o teste de transformação linfocitária (*in vitro*) mostraram depressão da resposta imune celular e aumento da carga fúngica no fígado e baço dos animais entre a 4^a e a 6^a semanas pós-infecção. Essa depressão na imunidade frequentemente indica um agravamento da infecção (Carlos *et al.*, 1992, Carlos *et al.*, 1999) e pode ser devida, em parte, à geração anormal de interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) pelos macrófagos (Carlos *et al.*, 1994).

Um dos intermediários reativos do nitrogênio (RNIs) mais estudados é o óxido nítrico (NO), produzido por células do sistema imune inato como as células dendríticas, células “natural killer” (NK), mastócitos e macrófagos (Bogdan, 2001). Essa pequena e versátil molécula é formada através da oxidação do átomo de nitrogênio da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) e, logo em seguida, se transforma em nitrito (NO₂⁻) (Myers *et al.*, 2003). No sistema imune o NO interfere em vários processos, como na diferenciação, proliferação e apoptose de células imunológicas, na produção de citocinas e outros mediadores solúveis e na síntese de componentes da matriz extracelular (Marshall & Stamler, 2000; Bogdan, 2001). Além disso, seus efeitos citotóxicos são importantes para a defesa inata do hospedeiro contra inúmeros patógenos, incluindo fungos, bactérias, parasitas e protozoários (Green *et al.*, 2000). Nesse sentido, estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que o NO, juntamente com o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), contribui para a atividade citotóxica dos macrófagos durante a infecção por *S. schenckii* e que o componente lipídico da parede celular do fungo é capaz de inibir a fagocitose do mesmo e induzir elevada liberação de NO e TNF- α em cultura de macrófagos peritoneais (Carlos *et al.*, 2003). A sensibilidade ao NO é inversamente proporcional à virulência de *S. schenckii*, com cepas mais virulentas sendo menos suscetíveis ao NO que as menos virulentas (Fernandes *et al.*, 2000).

A resposta efetiva contra organismos fúngicos requer a contribuição coordenada da imunidade inata e adaptativa. A imunidade inata consiste de um uma série de mecanismos

capazes de responder imediatamente a um agente invasor, não dependendo da expansão clonal de linfócitos antígeno-específicos, e que induz a ativação da resposta imune adaptativa por meio da apresentação de antígenos, co-estimulação e produção de mediadores solúveis como as citocinas (Green *et al.*, 2000; Charalampos & Roilides, 2005). O sistema imune adaptativo, sob estimulação do sistema inato, desempenha um papel crucial na resposta imune, com participação imprescindível das células B e T. Estas últimas compreendem os tipos citotóxico e “helper”, as quais, por sua vez, podem assumir diversos fenótipos efetores ou de memória (Noben-Trauth, 2000). As células T “helper” (Th) podem ser subdivididas em um número cada vez maior de subtipos, dois dos quais, a saber as células Th1 e Th2, são conhecidos há bastante tempo desde sua proposição por Mosmann *et al.* (1986). As células Th1 expressam o fator de transcrição “T-box expressed in T cells” (T-bet) e produzem seletivamente interferon- γ (IFN- γ), enquanto as células Th2 expressam “GATA-binding protein 3” (GATA-3) e produzem IL-4, mas também IL-5, IL-9, IL-13 e IL-25 (também conhecida como IL-17E). Sabe-se que citocinas de padrão Th1 e Th2 são induzidas de modo antígeno-específico contra os antígenos da parede celular de *S. schenckii* (Maia *et al.*, 2006). Outros estudos revelaram que a resposta do hospedeiro contra a esporotricose parece ser regida pelo perfil local de citocinas, no qual se observou a predominância de resposta tipo Th1 (Muguruma *et al.*, 1995).

Mais recentemente, dois outros subtipos de células Th foram descritos: células Treg, as quais expressam o fator de transcrição “forkhead box P3” (Foxp3) e exercem várias funções imunossupressoras, e células Th17, assim denominadas pela produção característica de IL-17A (IL-17). Subtipos ainda mais novos incluem Th9, Th22 e células T “helper” foliculares (Tfh) (Nakayamada *et al.*, 2012; Zhu & Paul, 2010a). As células Th17 são caracterizadas pela expressão do fator de transcrição “retinoic-related orphan receptor” γ t (ROR γ t), uma das formas resultantes do “splice” alternativo do gene *rorc*, e são capazes de produzir, além de IL-17, também IL-17F, IL-22 e IL-21, dentre outras (Huang *et al.*, 2012). A combinação de TGF- β 1 mais IL-6 ou IL-21 inicia a diferenciação das células Th17, enquanto a IL-23 age mais tarde no

programa de diferenciação para estabilizar o fenótipo. Foi sugerido que o TGF- β 1 age indiretamente, em baixos níveis, através da supressão da expressão de T-bet e GATA-3 e, portanto, inibindo a adoção dos fenótipos alternativos Th1 e Th2, respectivamente; em altos níveis, TGF- β 1 suprime a diferenciação das células Th17 pela indução de IL-10 e Foxp3 e pela regulação negativa da expressão do receptor de IL-23 (IL-23R) (Hemdan *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2012; Zúñiga *et al.*, 2013). As células Th17 tem um papel chave na defesa do hospedeiro contra fungos e bactérias extracelulares, devido principalmente, mas não exclusivamente, às ações pró-inflamatórias da IL-17, as quais incluem o recrutamento de neutrófilos e células Th1 e a indução da produção de citocinas pró-inflamatórias por células epiteliais; nem sempre, porém, o papel das células Th17 contra infecções fúngicas é protetor (Cua & Tato, 2010; Hernández-Santos & Gaffen, 2012; van de Veerdonk *et al.*, 2009a).

As células dendríticas (DCs) são especialmente adaptadas para promover o desenvolvimento das células Th17, especialmente em resposta a patógenos fúngicos através dos receptores da família das lectinas do tipo C (CLRs), cuja ativação favorece a produção de citocinas polarizantes Th17 como a IL-23 (Huang *et al.*, 2012; McGeachy & McSorley, 2012; Vautier *et al.*, 2010). Em concordância com isso, nosso grupo já demonstrou que o reconhecimento de antígenos de *S. schenckii* por DCs leva ao desenvolvimento de resposta Th1/Th17 *in vitro* (Verdan *et al.*, 2012). As DCs reconhecem fungos através de “pattern recognition receptors” (PRRs), capazes de se ligarem a “pathogen-associated molecular pattern” (PAMPs) presentes nos microorganismos. Os PRRs mais bem descritos são os receptores de manose, os CLRs e os receptores do tipo “toll-like” (TLRs). Entre os TLRs, principalmente TLR2, TLR4 e TLR9 tem sido associados com a detecção de antígenos fúngicos. Interessantemente, TLR2, TLR4 e TLR9 funcionais podem ser detectados na superfície de células NK, no entanto o envolvimento direto desses receptores na ativação dessas células por fungos ainda não foi demonstrado (Schmidt *et al.*, 2013).

As células NK são um dos primeiros tipos celulares a chegarem nos sítios de inflamação e são capazes de eliminar rapidamente células alogênicas ou tumorais sem a necessidade de sensibilização prévia e na ausência de reconhecimento por receptores de antígeno recombinados, como o receptor de células T (TCR) e os anticorpos. Elas se originam na medula óssea e migram através da corrente sanguínea para o baço, fígado, pulmão e muitos outros órgãos, mantendo uma distribuição dinâmica devido à capacidade de recircular entre os diferentes órgãos (Cella *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2011). As células NK podem ser ativadas por três mecanismos: pela ligação à porção Fc de anticorpos IgG; pelo reconhecimento de moléculas alteradas na superfície celular; ou por um ambiente inflamatório rico em citocinas, como IL-12 ou IFNs do tipo I (Shi *et al.*, 2011). A eliminação das células-alvo infectadas ou estressadas ocorre por várias vias efetoras, como grânulos citotóxicos contendo perforina ou granzima, Fas ligante (FasL), “TNF-related apoptosis-inducing ligand” (TRAIL), IFN- γ e TNF (Spits & Di Santo, 2011). Em camundongos, as células NK expressam os marcadores de superfície CD49b (DX5) e, em algumas linhagens (por exemplo em C57BL/6), CD161 (NK1.1); os diferentes subtipos dessas células podem ser distinguidos, em camundongos, com base na expressão de CD27, CD11b, CD127 e “killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1” (KLRG-1) (Shi *et al.*, 2011; Spits & Di Santo, 2011). Ainda em camundongos, os diferentes subtipos compreendem as células circulantes, esplênicas e da medula óssea maduras (CD11b^{high}CD27^{low}) e imaturas (CD27^{high}CD11b^{low}), células NK derivadas do timo CD127⁺ (a cadeia α do receptor de IL-7) e dependentes de IL-7, e vários subtipos de células NK residentes em diferentes tecidos (Cella *et al.*, 2014).

As células NK podem exercer atividade antifúngica diretamente, através da liberação de granzima e perforina, ou indiretamente, pela liberação de IFN- γ , o qual é constitutivamente produzido por essas células e estimula a migração, aderência, fagocitose e dano oxidativo por neutrófilos e macrófagos e potencializa a maturação de DCs. As células NK também tem a capacidade de induzir respostas de células T CD4⁺ diretamente através da apresentação de antígeno de modo restrito ao HLA de classe II. A maioria dos estudos mostra que células NK,

tanto humanas como murinas, exibem atividade *in vitro* contra vários fungos, como *Aspergillus fumigatus*, *C. albicans*, *C. neoformans*, *P. brasiliensis* e *Rhizopus oryzae* e estudos em camundongos depletados de células NK revelaram um papel fundamental destas células para a resposta do hospedeiro contra *A. fumigatus*, *C. albicans*, e *Histoplasma capsulatum* (Schmidt *et al.*, 2013). Interessantemente, os distintos estágios de fungos que desenvolvem hifas podem apresentar diferente susceptibilidade à atividade citotóxica das células NK, conforme demonstrado *in vitro* pela resistência de conídios de *A. fumigatus* à atividade citotóxica de células NK humanas, enquanto hifas e formas germinativas são susceptíveis ao dano por perforina (Schmidt *et al.*, 2010). Dano por perforina já foi também demonstrado por células de camundongos contra *C. neoformans*, mas os autores usaram células mononucleares não aderentes do baço, purificadas por passagem em coluna de lã de nylon (em sua maioria, células T e NK), não sendo possível atribuir a liberação de perforina diretamente às células NK (Petkovic & Arsenijevic, 2010). Ainda, foi demonstrado que o IFN- γ produzido por células NK pode ser diretamente responsável pela atividade anti-fúngica destas células contra *A. fumigatus in vitro* (Bouzani *et al.*, 2011). Os estudos sobre o papel das células NK em infecções fúngicas não são muitos e, até o momento, não existem dados sobre o papel dessas células na esporotricose ou contra *S. schenckii*.

1.4. Infecção vs apoptose

A apoptose é um processo de morte celular pelo qual a célula é eliminada, normalmente, sem desencadear uma resposta inflamatória, sendo caracterizada pelo arredondamento e redução do volume celular, condensação da cromatina e fragmentação nuclear, mas com manutenção da integridade da célula até os estágios finais do processo (Kroemer *et al.*, 2009). A apoptose pode ser classificada, de acordo com a origem dos sinais que a desencadeiam, nas vias extrínseca e intrínseca. A primeira é um processo dependente de caspases iniciado por sinais de estresse extracelulares, enquanto a segunda está associada ao processo de permeabilização da membrana

externa mitocondrial (MOMP), o qual pode ser desencadeado por inúmeras condições de estresse intracelular (Galluzzi *et al.*, 2012). Nos macrófagos a apoptose provavelmente evoluiu como um mecanismo de proteção do hospedeiro, expondo o patógeno ao sistema imune quando este estiver intracelularmente infectando a célula, além de evitar que este patógeno use o macrófago como um veículo para evadir a resposta e se espalhar para outros órgãos e tecidos (Navarre & Zycklinsky, 2000). A apoptose pode agir ainda como um mecanismo de modulação da produção de citocinas e estas, por sua vez, podem também participar da modulação da apoptose (Martins *et al.*, 2001; Verícimo *et al.*, 2006).

Acumulam-se evidências sobre o papel imunossupressor e pró-apoptótico do NO sobre diversos tipos celulares (Blaylock *et al.*, 1998; Laubach *et al.*, 1995; Zumsteg *et al.*, 2000). Esta molécula possui a capacidade de induzir a queda da responsividade das células T frente à estimulação por mitógenos (van der Veen, 2001), um efeito que tem sido relacionado à apoptose destas células, inclusive durante a infecção por *S. schenckii* (Fernandes *et al.*, 2007; Wu-Hsieh *et al.*, 1998). Usando outro modelo murino de esporotricose, Fernandes *et al.* (2007) demonstraram que a imunossupressão observada está intimamente relacionada tanto com a indução de apoptose nos macrófagos peritoneais quanto com a perda da responsividade dos linfócitos à estimulação por concanavalina A (Con A), uma ocorrência comum em diferentes tipos de infecção (Navarre & Zycklinsky, 2000). Tais achados corroboram estudos prévios do nosso grupo mostrando uma depressão característica da resposta imune durante a fase aguda da infecção em modelo murino de esporotricose sistêmica (Carlos *et al.*, 1992; 1994; 1999). Sabe-se também que *S. schenckii* é capaz de produzir e secretar uma série de proteases (Tsuboi *et al.*, 1987; 1988), um tipo enzimático já implicado na indução de apoptose em macrófagos peritoneais murinos por *C. albicans* CR1 (Gasparoto *et al.*, 2004; Panagio *et al.*, 2002). Além disso, uma variedade de produtos fúngicos já foram reconhecidos como indutores de apoptose em células tumorais (Buommino *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004), células T e células mononucleares do sangue periférico humanas (Pericolini *et al.*, 2006), além de células mononucleares do baço de ratos

(Chiapello *et al.*, 2004) e macrófagos J774 (Ibata-Ombetta *et al.*, 2003). Ainda, existem evidências de que a apoptose desencadeada durante o processo infeccioso, resultando no reconhecimento simultâneo de PAMPs e produtos de células apoptóticas, pode induzir a geração de células Th17 (Bereton & Blander, 2010), cujo papel na esporotricose é desconhecido.

1.5. Justificativa

Foi demonstrado que a manana de *C. albicans*, através da ativação do receptor de manose de macrófagos (MMR) e dependente de células apresentadoras de antígeno, foi capaz de induzir a produção de IL-17 na ausência de estímulos mitogênicos (van de Veerdonk *et al.*, 2009b). Em linha com isso, sabe-se que a parede celular de *S. schenckii* é largamente composta de mananas, como as ramnomanas e galactomananas, suscitando a possibilidade do envolvimento da resposta Th17 na esporotricose (Shimonaka *et al.*, 1975). Além disso, grande parte da nossa compreensão atual da relação dos fungos com a resposta Th17 vem dos estudos de uma pequena amostra de patógenos, especialmente de *C. albicans*. Especificamente em relação aos mecanismos e à importância relativa da resposta Th17, esta amostra é ainda menor, forçando generalizações perigosas. Ademais, as células Th17 e as citocinas relacionadas a elas têm sido implicadas em numerosas doenças auto-imunes e inflamatórias (Singh *et al.*, 2014; Zambrano-Zaragoza *et al.*, 2014), fazendo surgir interesse em novas estratégias terapêuticas especificamente direcionadas contra a resposta Th17, indo desde o bloqueio da diferenciação e expansão das células Th17 até a neutralização específica de suas citocinas efetoras (Gaffen *et al.*, 2014; Maddur *et al.*, 2012; Miossec & Kolls, 2012; Toussiot, 2012). No entanto, apesar dos resultados promissores para algumas doenças, um problema comum a essas terapias diz respeito à susceptibilidade aumentada a infecções oportunistas, comumente por patógenos fúngicos. Deste modo, compreender mais a fundo como a resposta Th17 molda a evolução de infecções fúngicas oportunistas, como a esporotricose, tem importantes aplicações clínicas. Usando um modelo murino de infecção sistêmica, este é, até onde sabemos, o primeiro estudo a avaliar o

desenvolvimento e a importância relativa da resposta Th17 contra *S. schenckii*, fornecendo dados valiosos sobre os mecanismos imunes desencadeados pela esporotricose e abrindo caminho para futuras terapias preventivas e curativas.

2. Objetivos

Objetivo geral:

Avaliar a participação da resposta Th17 na infecção por *S. schenckii* e qual o grau de importância desta para a capacidade do animal eliminar a infecção.

Objetivos específicos:

- Avaliar a cinética de eliminação do fungo durante a infecção sistêmica por *S. schenckii*, a fim de definir pontos de acompanhamento adequados para a realização dos demais experimentos.
- Avaliar o desenvolvimento de células Th1 e Th17 e a produção das citocinas-padrão dessas duas linhagens ao longo da infecção.
- Desenvolver um modelo de bloqueio da resposta Th17 através da depleção de IL-23 pelo tratamento dos animais com anticorpo específico.
- Avaliar a importância da resposta Th17 para a capacidade do hospedeiro eliminar o fungo e sobreviver à infecção.
- Avaliar as alterações resultantes do referido tratamento como meio de entender os mecanismos responsáveis pela eficiente eliminação do fungo em animais com resposta Th17 não comprometida.

3. Materiais e métodos

3.1. Microorganismo e condições de cultivo

Foi utilizada a cepa de *Sporothrix schenckii* ATCC 16345, gentilmente cedida pela Fundação Oswaldo Cruz e originalmente obtida de um caso humano de infecção pulmonar difusa (Baltimore, MD). O fungo foi mantido em sua forma miceliar a 25°C em meio de cultura sólido Mycoseltm (BD Biosciences). A infecção dos animais foi realizada com a forma leveduriforme de *S. schenckii*, obtida pela transferência de uma parte da massa de crescimento fúngico em forma miceliar para meio caldo BHI (Difco), da qual, após 7 dias de cultivo a 37°C sob agitação constante de 150 rpm, uma alíquota contendo 2×10^7 leveduras foi transferida para um novo caldo BHI e cultivada por mais 5 dias nas mesmas condições. Este procedimento garante que a cultura usada para as infecções esteja em fase logarítmica de crescimento e com uma taxa de conversão hifa-levedura de virtualmente 100%.

3.2. Preparação da levedura termo-inativada de *S. schenckii*

Como estímulo antígeno-específico para a reestimulação *ex vivo* das células do baço foram usadas leveduras termo-inativadas de *S. schenckii*, preparadas a partir de uma alíquota obtida da mesma cultura usada para a infecção dos animais em cada experimento respectivo, após 5 dias de cultivo do fungo em caldo BHI, conforme descrito no item 3.1. As leveduras foram separadas do sobrenadante por centrifugação a 200 xg em temperatura ambiente e em seguida lavadas duas vezes com 8mL de PBS, pH 7,4 estéril (daqui em diante referido apenas como PBS), após o que foram ressuspensas, contadas em câmara de Neubauer e ajustadas à concentração de $2,5 \times 10^8$ leveduras/mL em PBS. Em seguida, 3 a 4 alíquotas de 1,5mL dessa suspensão foram transferidas para tubos cônicos estéreis de 15mL, incubadas em banho-maria a 60°C por 60min, com uma agitação intermediária após 30min, e então estocadas a 2-8°C até o momento do uso. Como controle de esterilidade, uma alíquota de 100µL de cada tubo foi

plaqueada em meio sólido Mycoseltm e checada para verificação de crescimento fúngico antes do uso da suspensão. A concentração de uso foi obtida pela diluição 1/10 do estoque em meio RPMI-1640 completo (assim definido o meio RPMI-1640 básico contendo 20µM de 2β-mercaptoetanol, 100 U/ml de penicilina e estreptomicina, 2 mM de L-glutamina e 5% de soro fetal bovino).

3.3. Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c SPF (“specific pathogen free”), machos, de 5 a 7 semanas quando da primeira inoculação, obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB), UNICAMP. Estes animais foram mantidos em mini-isoladores, em condições ambientais estáveis (23°C e 56% de umidade relativa do ar) e ciclos claro/escuro de 12 horas. Água e ração (Purina) foram oferecidas ad libitum. Em cada experimento independente, foram usados animais pareados por idade em todos os grupos.

3.4. Infecção experimental e tratamento dos animais

Para os experimentos de cinética os animais foram inoculados com 200 µL de uma suspensão contendo 10⁶ leveduras de *S. schenckii* em PBS ou com igual volume de PBS apenas, por via intraperitoneal (i.p.). Alternativamente, para os experimentos de depleção de IL-23 (detalhados adiante), os animais foram inoculados com 200 µL de PBS (“controle”) ou com uma suspensão contendo 10⁶ leveduras de *S. schenckii* em PBS e adicionada de 10µg de anticorpo anti-IL-23p19 (“anti-IL-23”), de seu isotipo controle (“iso”) ou sem nenhuma adição (“PBS”). Ainda nos experimentos de depleção, os animais de cada grupo foram tratados em dias alternados até dois dias antes do eutanázia dos mesmos no dia 10 ou, em um experimento paralelo de sobrevivência, no dia 28 pós-inoculação com 200µL de uma solução do anticorpo anti-IL-23 (grupo “anti-IL-23”), de seu isotipo controle (grupo “iso”) ou com PBS apenas

(grupos “controle” e “PBS”), também por via i.p. O protocolo experimental foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP (CEUA/FCF/CAr nº 16/2014) e foi realizado de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.5. Determinação das unidades formadoras de colônia

A avaliação da carga fúngica sistêmica para acompanhamento das infecções foi feita através da determinação das unidades formadoras de colônia (UFC) no baço dos animais após a remoção do mesmo conforme descrito no item 3.7. Uma alíquota do macerado do baço em PBS, retirada antes do tratamento de lise das hemácias, foi inoculada em placas de meio sólido Mycosel^{lm} em diluição pré-determinada para permitir a contagem adequada das colônias. As UFC foram contadas após 3 e confirmadas após 6 dias de incubação à temperatura ambiente.

3.6. Depleção de IL-23 mediada por anticorpo

A fim de avaliar o papel da resposta Th17 na resposta do hospedeiro contra o fungo *S. schenckii*, um grupo de animais infectados com o mesmo foi tratado, conforme cronograma detalhado no item 3.4, por via i.p. com 200 µL de uma solução contendo 10µg do anticorpo monoclonal neutralizante anti-IL-23p19 IgG1κ (clone G23-8, eBiosciences). A eficácia do tratamento foi verificada através da dosagem da liberação *ex vivo* de IL-17 e IL-22 nos sobrenadantes de cultura de 24 horas de células totais do baço desafiadas com a levedura terminativa de *S. schenckii*.

3.7. Obtenção das células totais do baço

O baço foi assepticamente removido em câmara de fluxo laminar e passado através de uma malha de nylon com poros de 100µm em 2mL de PBS usando o êmbolo de uma seringa. A suspensão resultante foi adicionada de 6mL de solução de cloreto de amônio 0,17M e incubada

por 5min no gelo para lise das hemácias. As células do baço foram então separadas do sobrenadante por centrifugação a 300 xg por 5min a 4°C, lavadas uma única vez com 3mL de RPMI completo e ressuspensas em 1mL do mesmo meio. A concentração das células foi determinada por contagem em câmara de Neubauer pela técnica de exclusão com azul de Trypan e ajustada para 5×10^6 células/mL em RPMI completo.

3.8. Determinação da liberação *ex vivo* de citocinas

As células totais do baço, obtidas conforme descrito acima, foram cultivadas em placas de cultura de tecidos de 48 poços de fundo chato, na presença da levedura termo-inativada de *S. schenckii*, na proporção de 5 leveduras para cada célula, numa concentração final de, respectivamente, $1,25 \times 10^7$ e $2,5 \times 10^6$ por mL. Concanavalina A (0,25µg/mL de concentração final em RPMI) ou somente RPMI foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente. Após 24 horas de cultivo em estufa com 5% de CO₂ a 37°C, a concentração das citocinas IL-17, IL-22, IL21 e IFN-γ acumuladas no sobrenadante foi determinada por ELISA (eBioscience) de acordo com as instruções do fabricante. As condições da cultura foram replicadas em placas de 96 poços, em duplicata, para controle da viabilidade das células do baço através do ensaio de MTT. De forma breve, após 24 horas de cultivo, cada poço foi acrescido de 20µL de uma solução de MTT a 10mg/mL em meio RPMI básico. As placas foram então incubadas por mais 3 horas nas mesmas condições anteriores e, após remoção do sobrenadante, acrescidas de isopropanol absoluto e lidas em espectrofotômetro UV/visível para microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems) em 540/620 nm.

3.9. Citometria de fluxo

Os seguintes anticorpos monoclonais anti-camundongo foram usados: anti-CD16/CD32 purificado (clone 93), anti-CD3 FITC (clone 17A2), anti-CD4 APC (clone RM4-5), anti-RORγt PE (clone B2D), anti-T-bet PerCP-cy5.5 (clone eBio4B10) e anti-CD49b APC (clone DX5);

todos obtidos da eBioscience. Em todas as marcações foram usadas células totais do baço não estimuladas assim que obtidas do animal, avaliadas quanto à presença de células Th1 (células Th T-bet simples-positivas), Th17 (células Th ROR γ t simples-positivas), Th1/Th17 (células Th T-bet+ROR γ T+) e natural killer (NK; células CD3-CD49b+). As células foram marcadas extracelularmente, depois fixadas e permeabilizadas com o “intracellular fixation & permeabilization buffer set” (eBioscience) e então marcadas intracelularmente para os fatores de transcrição T-bet e ROR γ t. Alternativamente, as células foram marcadas extracelularmente com anti-CD3 FITC mais anti-CD49b APC apenas. O controle da marcação inespecífica foi feito por amostras marcadas com anti-CD3 FITC mais anti-CD4 APC e incubadas com os isotipos controle PE e PerCP-cy5.5 apropriados (Th1/Th17) ou pela incubação prévia de todas as amostras com anti CD16/CD32 purificado seguida do uso de amostras incubadas apenas com os isotipos controle FITC e APC apropriados (NK). As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD Accuri C6 (BD Biosciences) e analisadas usando o software proprietário do equipamento. O limiar de aquisição das amostras foi ajustado para 800.000 no parâmetro FSC-H (“forward scatter – height”) para exclusão do *debris* celular e pelo menos 60.000 eventos foram efetivamente incluídos em cada análise. A determinação do percentual de células positivas para cada marcação foi feita pela subtração das leituras dos isotipos controle daquela dos anticorpos de interesse. O correto posicionamento dos “gates” foi verificado pelo uso de amostras FMO (“fluorescence minus one”).

3.10. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo programa GraphPad Prism versão 6.01, aplicando-se análise de variância (ANOVA) de 1 ou 2 vias, com teste para comparações múltiplas de Tukey ou Sidak, respectivamente, conforme indicado. O intervalo de confiança foi definido em 95%. Foram usados grupos de 3, 4 ou 10 animais, conforme indicado em cada caso.

4. Resultados

4.1. Cinética da infecção

Nosso primeiro passo foi determinar a progressão da infecção sistêmica a fim de estabelecer os pontos mais adequados para conduzir os demais experimentos. A carga fúngica, medida pela contagem de UFC do fungo em placas de meio sólido Mycoseltm, atingiu um pico no dia 6 pós-infecção, após o qual começou a diminuir até que todos os animais tivessem eliminado a infecção no dia 28 pós-infecção (Figura 1), embora um experimento de sobrevivência posterior tenha mostrado que alguns animais podem levar mais de 28 dias para eliminar a infecção (ver item 4.3, Figura 5E). Para os experimentos subsequentes, decidimos eutanaziar os animais nos dias 5, 10 e 15 pós-infecção (linhas pontilhadas na Figura 1) para os parâmetros selecionados da resposta imune, respectivamente, no pico de suscetibilidade dos animais, durante a eliminação ativa do fungo e na fase de resolução da infecção. Tendo em vista que as contagens de UFC observadas no dia 6 poderiam representar uma carga fúngica já em redução e, portanto, uma resposta imune efetiva já iniciada em alguns animais, nós optamos por usar o dia 5 pós-infecção como indicativo do pico do período de suscetibilidade. Por motivos similares, o dia 15 foi escolhido, ao invés dos dias 18 ou 21 pós-infecção, para evitar discrepâncias resultantes do pareamento de animais ainda combatendo a infecção com outros que poderiam já tê-la eliminado por completo. Em relação a isso, dados compilados de nossos experimentos mostraram que no dia 5 é mais provável que os camundongos tenham uma maior carga fúngica no baço do que no dia 6 pós-infecção, embora a diferença não seja significativa (dados não mostrados).

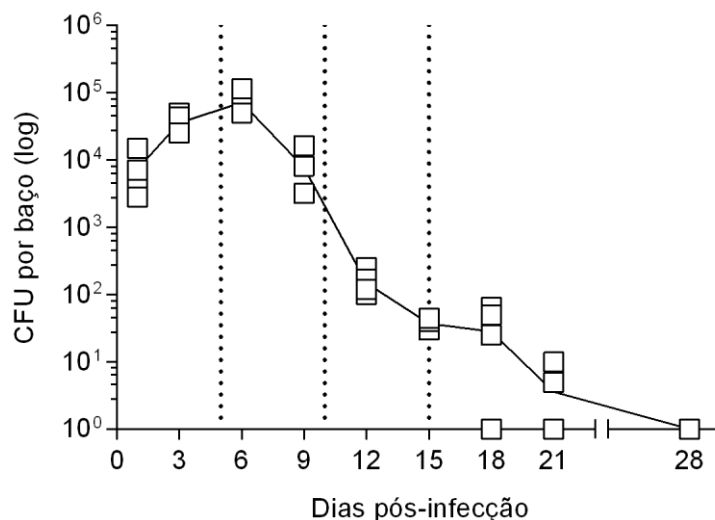


Figura 1. Cinética da infecção sistêmica. Os camundongos foram inoculados pela via i.p. com 10^6 leveduras de *S. schenckii*. Nos dias indicados, os camundongos foram eutanaziados e os baços removidos para avaliação da carga fúngica sistêmica. Contagens iguais a zero estão apresentadas como 1 (um) para que possam ser mostradas em escala logarítmica e, como resultado, aparecem na base do eixo “y”, sobre a linha do eixo “x”. As linhas pontilhadas representam os pontos escolhidos para a condução dos demais experimentos. Os resultados são apresentados como as medidas individuais de 4 experimentos independentes.

4.2. Fenotipagem das células Th1/Th17 e dosagem da liberação *ex vivo* de citocinas

Como meio de entender o papel desempenhado pelas respostas Th1 e Th17 e como elas são equilibradas durante a infecção sistêmica por *S. schenckii*, nós determinamos a frequência desses dois subtipos no baço dos camundongos por citometria de fluxo, com base na expressão de seus fatores de transcrição determinantes de linhagem, “T-box expressed in T cells” (T-bet) e “retinoic acid receptor-related transcription factor” γt (ROR γt), respectivamente. Foi encontrado um claro viés de desenvolvimento de células Th17 ao invés de Th1 em camundongos infectados, predominantemente na forma de células Th ROR γt simples-positivas, mas também de células Th T-bet+ROR γt + (Figuras 2E e 2F). Por outro lado, células T-bet simples-positivas foram encontradas em frequência muito baixa entre as células Th tanto em camundongos controle como em infectados (Figura 2D). A fim de determinar qual impacto as alterações na frequência destes dois subtipos teriam sobre a produção de citocinas, nós dosamos a liberação *ex vivo* das

principais citocinas efetoras de ambas as linhagens, IFN- γ para as células Th1, e IL-17, IL-21 e IL-22 para as células Th17, a partir de sobrenadante de cultura de 24 horas de células totais do baço desafiadas com a levedura termo-inativada de *S. schenckii*. Observou-se que IL-17 e IL-22, mas não IL-21, estavam significativamente aumentadas no dia 10 pós-infecção (Figura 3). Na verdade, não foram encontradas quantidades detectáveis de IL-21 nem em camundongos controle nem em infectados durante todo o período avaliado, o que pode ter sido resultado de uma combinação da falta de sensibilidade do ensaio com as condições ou o tempo de cultivo inadequados. No entanto, contrário ao esperado dada a escassez de células T-bet simples-positivas e apenas um número moderado de células T-bet+ROR γ t+, a quantidade de IFN- γ liberada estava surpreendentemente alta no dia 10 pós-infecção. Conforme discutido adiante, isto é mais provavelmente explicado pela presença de outras células produtoras de IFN- γ em nosso sistema, especialmente células NK CD3-CD49b+. Coletivamente, nossos resultados mostram que, como resultado da infecção por *S. schenckii*, desenvolve-se claramente uma resposta Th17, embora ainda não esteja claro se as células Th17 são de fato a principal fonte de IL-17 e IL-22 em nosso sistema. Ainda, nossos achados levantam a questão acerca da necessidade da resposta Th17 para a capacidade do hospedeiro eliminar efetivamente o fungo e resolver em definitivo a infecção por *S. schenckii*. Nós buscamos esclarecer isso com a próxima série de experimentos.

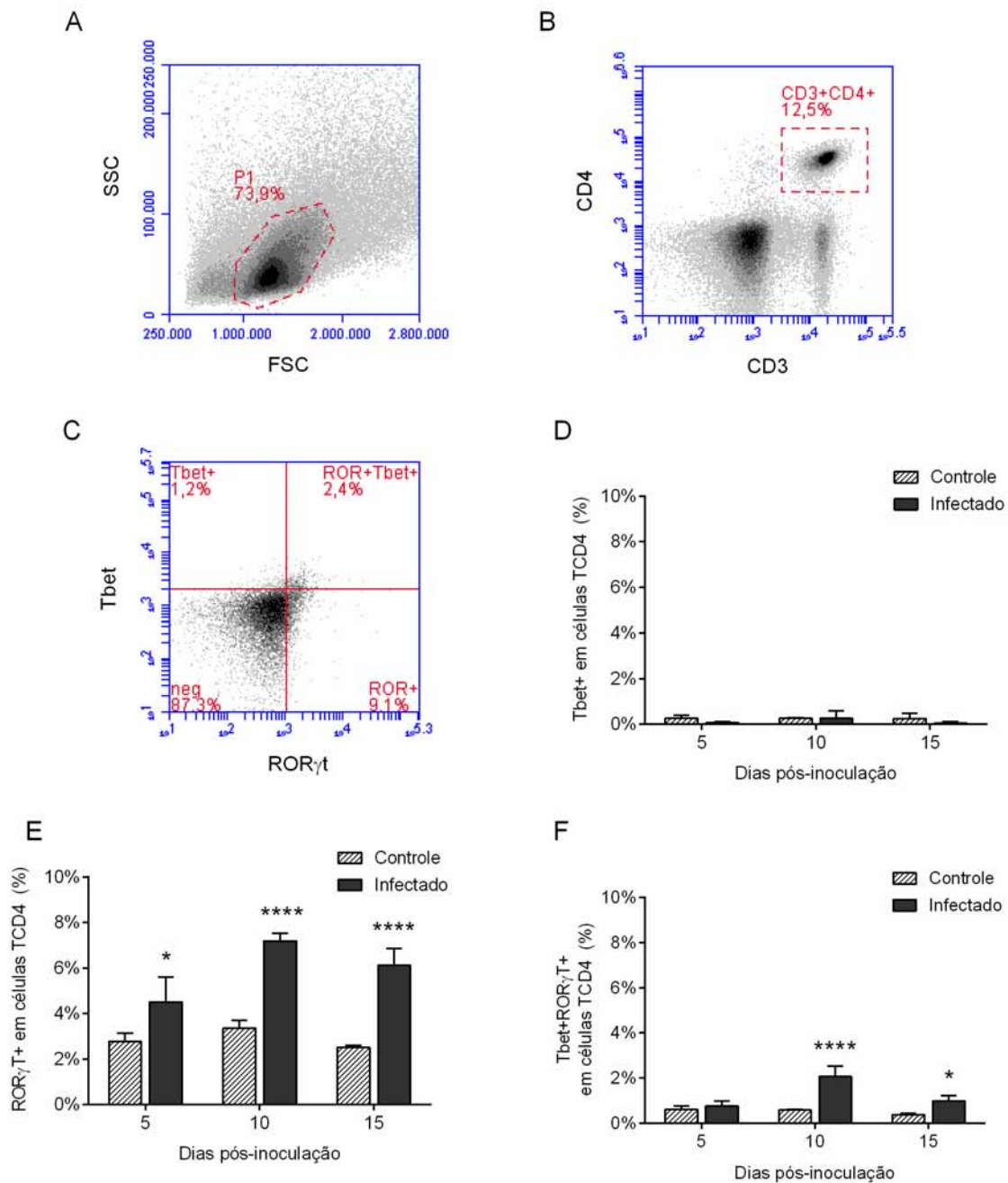


Figura 2. Cinética do surgimento de células Th expressando T-bet e ROR γ t no baço. Os camundongos foram inoculados pela via i.p. com 10^6 leveduras de *S. schenckii* em PBS (infestado) ou somente com PBS estéril (controle). Nos dias indicados, os camundongos foram eutanaziados para a remoção do baço e as células do baço foram marcadas conforme mostrado. A-C: “density plots” e estratégia de “gating” representativos da determinação de células Th T-bet+, ROR γ t+ ou T-bet+ROR γ t+. D-F: percentual das subpopulações indicadas dentro da população principal do baço. A significância estatística foi determinada por ANOVA de 2 vias usando o teste de comparações múltiplas de Sidak e intervalo de confiança em 95%. * ($p < 0,05$) e **** ($p < 0,0001$), quando comparado com o grupo controle em cada ponto respectivo. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão de 3 animais.

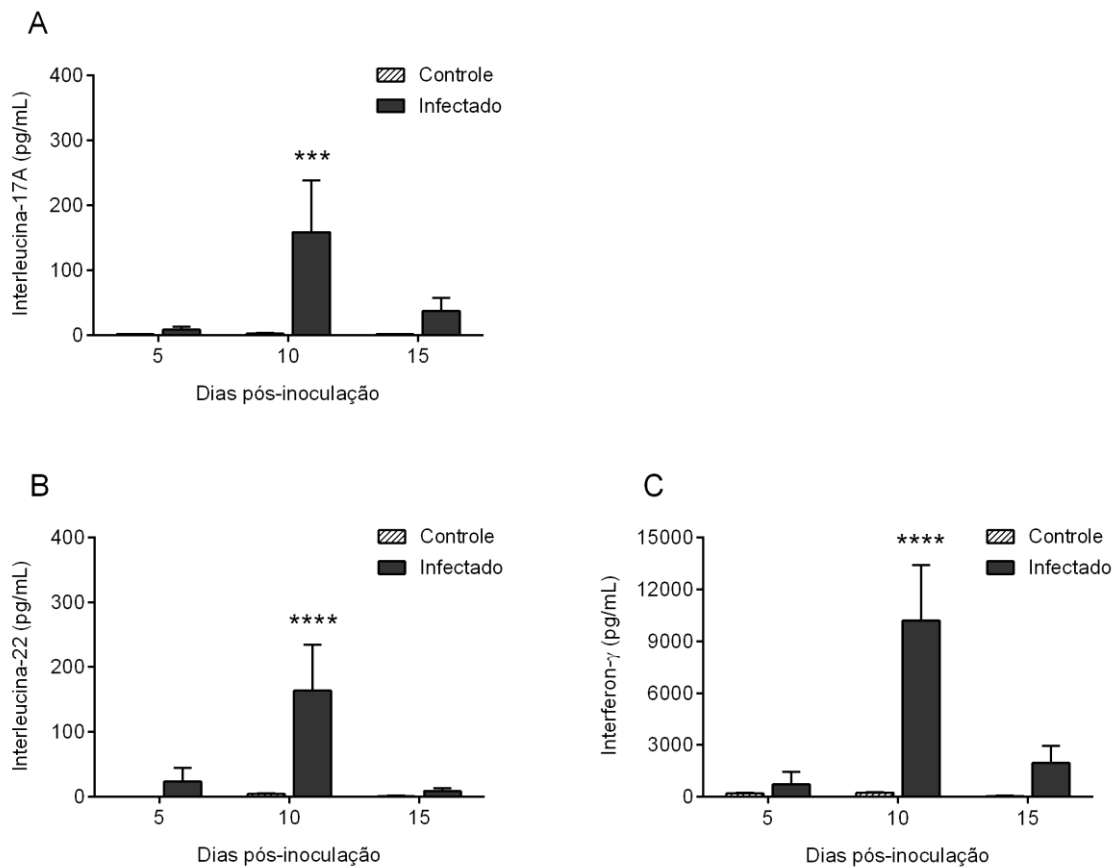


Figura 3. Cinética da liberação *ex vivo* de citocinas efetoras Th1 e Th17. Os camundongos foram inoculados pela via i.p. com 10^6 leveduras de *S. schenckii* em PBS (infectado) ou somente com PBS estéril (controle). Nos dias indicados, os camundongos foram eutanaziados para a remoção do baço e as células do baço resultantes foram cultivadas por 24 horas na presença da levedura termo-inativada de *S. schenckii*. A-C: liberação *ex-vivo* das citocinas indicadas. A significância estatística foi determinada por ANOVA de 2 vias usando o teste de comparações múltiplas de Sidak e intervalo de confiança em 95%. *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$), quando comparado com o grupo controle em cada ponto respectivo. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão de 3 animais.

4.3. Cinética da ocorrência de apoptose nas células do baço

Diante da conhecida relação entre a apoptose induzida por microorganismos e sua implicação na imunossupressão durante a fase aguda da infecção em modelos murinos de esporotricose (Fernandes *et al.*, 2007), associada à evidência de que a apoptose possa, num cenário de infecção, induzir o desenvolvimento de células Th17 (Brereton & Blander, 2011), decidimos determinar sua ocorrência em nosso modelo. A apoptose das células totais do baço, medida pelo ensaio de ligação à Anexina V, estava significativamente aumentada nos dias 10 e 15 pós-infecção, em linha com a frequência aumentada de células Th17, mas sem correlação

aparente com um estado de depressão da resposta imune observado em estudos anteriores. Diferenças na cepa do micro-organismo e linhagem dos animais, além do desenho experimental, podem ser responsáveis por essas diferenças. Seja como for, é preciso caracterizar melhor a apoptose nesse modelo e definir por qual via ela ocorre. A partir disso, mais testes serão necessários para estabelecer a relação de causa e efeito entre a apoptose e o desenvolvimento da resposta Th17 em nosso modelo.

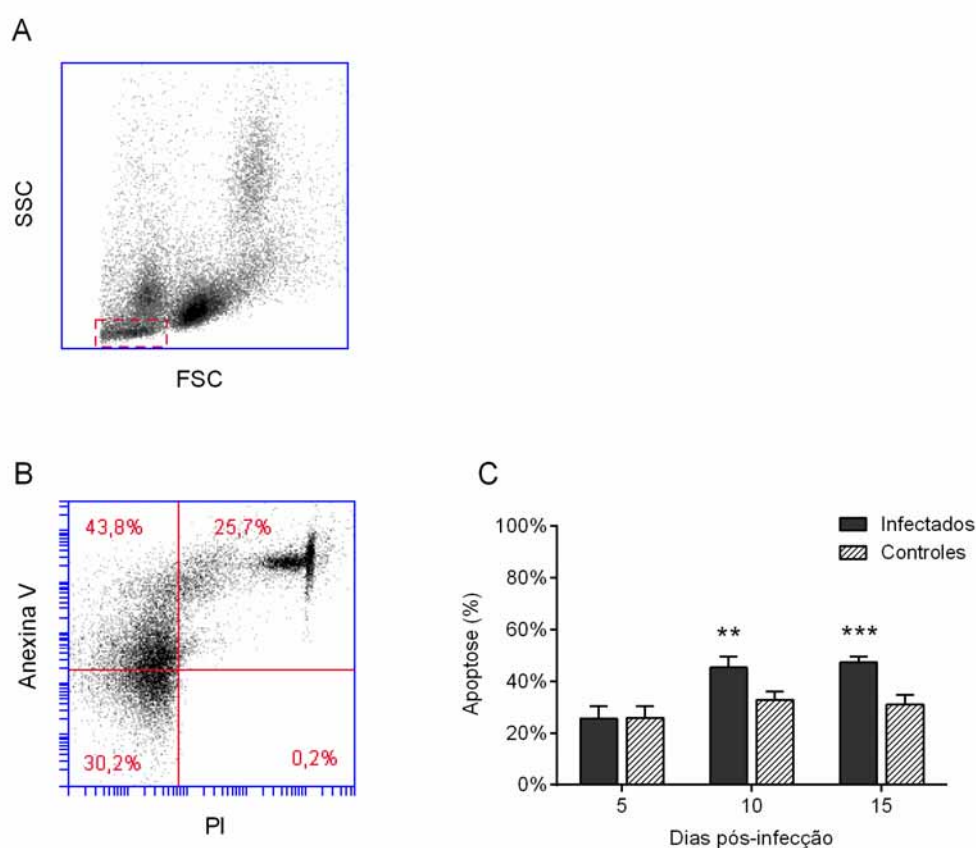


Figura 4. Cinética da ocorrência de apoptose nas células do baço. Os camundongos foram inoculados pela via i.p. com 10^6 leveduras de *S. schenckii* em PBS (infetado) ou somente com PBS estéril (controle). Nos dias indicados, os camundongos foram eutanaziados para a remoção do baço e as células do baço resultantes foram marcadas com Anexina V e iodeto de propídio (PI). As células apoptóticas foram definidas como aquelas Anexina V+PI-. A e B: “density plot” e estratégia de “gating” representativa da marcação. A significância estatística foi determinada por ANOVA de 2 vias usando o teste de comparações múltiplas de Sidak e intervalo de confiança em 95%. ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$), quando comparado com o grupo controle em cada ponto respectivo. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão de 3 animais.

4.4. Depleção de IL-23 mediada por anticorpo e avaliação de sobrevivência

Tendo a IL-23 papéis bem definidos como indutora da produção de citocinas Th17 tanto em células linfóides inatas como em adaptativas, incluindo as próprias células Th17, assim como seu papel crítico no desenvolvimento e expansão de células Th17 (Guo *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2009), esperava-se que sua depleção viesse a diminuir significativamente a produção das citocinas efetoras Th17 mais importantes. Para isso, os camundongos foram tratados por via i.p. com 10µg de um anticorpo monoclonal neutralizante anti-IL-23p19, seu isotipo controle ou somente com PBS em dias alternados, a partir do dia da infecção até 2 dias antes do eutanázia dos animais no dia 10 e, num experimento de sobrevivência paralelo, no dia 28 pós-infecção. A efetividade do tratamento foi avaliada no dia 10 pós-infecção através da dosagem da liberação *ex vivo* de IL-17 e IL-22 em sobrenadante de cultura de 24 horas de células totais do baço desafiadas com a levedura termo-inativada de *S. schenckii* (Figuras 5A e 5B). O tratamento com o anticorpo anti-IL-23 provocou uma marcada, embora incompleta, redução na produção de ambas as citocinas e isto mostrou-se diretamente correlacionado com a piora da capacidade de controle da infecção, uma vez que a carga fúngica no baço dos animais tratados com anti-IL-23 foi cerca de 5x maior do que aquela encontrada em animais tratados com o isotipo controle no dia 10 pós-infecção (Figura 5D). No entanto, tanto os animais tratados com anti-IL-23 como aqueles tratados com o isotipo controle foram igualmente capazes de sobreviver à infecção. Ainda, quando os animais foram eutanaziados no dia 28 pós-infecção, não foram encontradas diferenças na carga fúngica remanescente entre esses 2 grupos, sendo que exatamente 6 dos 10 animais em ambos os grupos ainda tinham UFC detectável (Figura 5E). Nossos resultados indicam, portanto, que a resposta Th17 é necessária para a ótima eliminação do fungo durante os estágios iniciais da infecção, mas não para a sobrevivência nem para a capacidade dos animais resolverem definitivamente a mesma. Além disso, é notável que níveis aumentados de IL-17 e IL-22 foram encontrados apenas no dia 10, mas não no dia 15 pós-infecção, apesar da frequência ainda aumentada de células Th17 (Figuras 2E, 3A e 3B), sugerindo que a resposta Th17 é

naturalmente suprimida neste estágio e, portanto, não essencial para a resolução final da infecção.

Adicionalmente, se células Th17 “patogênicas” altamente inflamatórias fossem uma fonte importante de IFN- γ em nossos experimentos prévios, seria esperado que a liberação desta citocina a partir de células do baço de animais depletados de IL-23 estivesse significativamente diminuída, uma vez que esta é indispensável para a geração de células Th17 T-bet+ produtoras de IFN- γ (Gaffen *et al.*, 2014; Hemdan *et al.*, 2012; Zúñiga *et al.*, 2013). Os resultados obtidos foram, em certa medida, confusos, uma vez que a liberação de IFN- γ por células do baço de camundongos depletados de IL-23 estava, de fato, reduzida se comparada àquela dos animais tratados com o isotipo controle, mas apenas levemente menor (sem significância estatística) que aquela dos animais infectados tratados com PBS (Figura 5C). Considerando a liberação aumentada de IFN- γ por células do baço de animais tratados com o isotipo controle, a diferença observada entre animais tratados com o isotipo ou com o anticorpo anti-IL-23 parece ser devida mais aos efeitos inesperados do primeiro do que aos efeitos do último. Por fim, como antes, também não encontramos níveis detectáveis de IL-21 neste sistema.

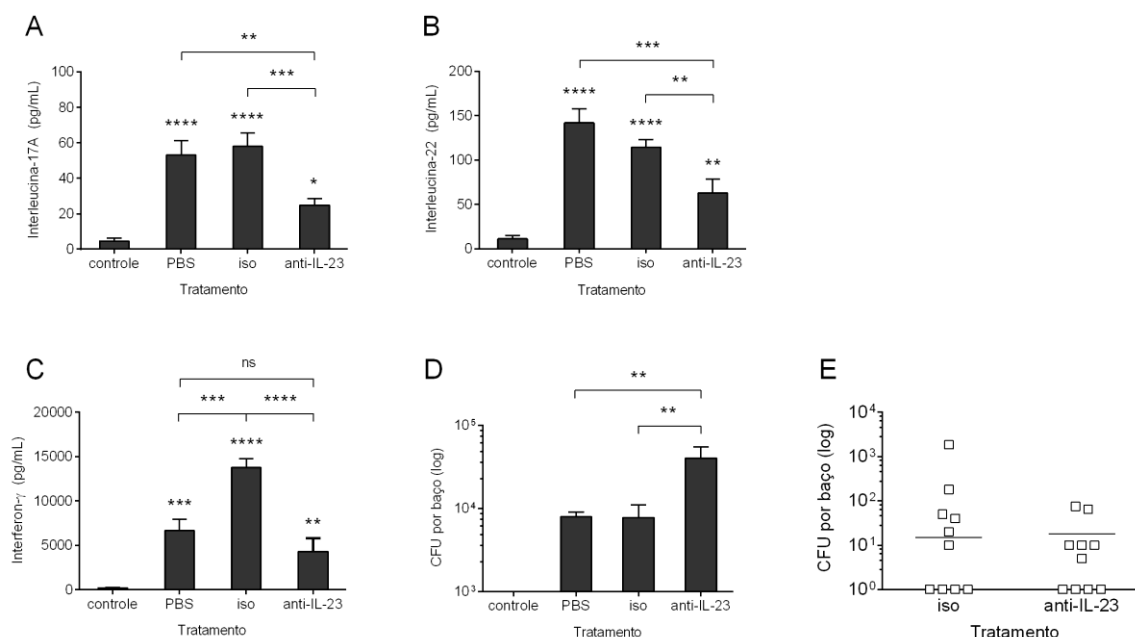


Figura 5. Carga fúngica sistêmica e liberação *ex vivo* de citocinas seguinte à depleção de IL-23. os camundongos foram inoculados pela via i.p. com PBS estéril (controle) ou com 10^6 leveduras de *S. schenckii* em PBS adicionado de $10\mu\text{g}$ de um anticorpo monoclonal neutralizante anti-IL-23p19 (anti-IL-23), seu isotipo controle (iso) ou sem adição nenhuma (PBS), e então tratados conforme indicado. No dia 10 pós-inoculação, os camundongos foram eutanaziados e os baços removidos para determinação da carga fúngica sistêmica. Adicionalmente, as células foram cultivadas por 24 horas na presença da levedura termo-inativada de *S. schenckii* e as citocinas acumuladas no sobrenadante foram dosadas por ELISA. A-C: liberação *ex-vivo* das citocinas indicadas. D: carga fúngica no baço dos camundongos no dia 10 pós-infecção; contagens de UFC iguais a zero não aparecem no gráfico devido ao uso de escala logarítmica. E: carga fúngica no baço dos camundongos sobreviventes no dia 28 pós-infecção; contagens de UFC iguais a zero estão representadas como 1 (um). A significância estatística foi determinada por ANOVA de 1 via usando o teste de comparações múltiplas de Tukey, exceto para a Figura E, onde a significância estatística foi determinada pelo teste T com correção para comparações múltiplas pelo método de Holm-Sidak. Em ambos os casos o intervalo de confiança foi definido em 95%. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$) e “ns” (não-significativo), quando comparado com o grupo controle em cada ponto respectivo ou conforme indicado. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão de 3 animais (A-D) ou como as medidas individuais de 10 camundongos, com linha na mediana (E).

4.5. Mudança na frequência de células Th1, Th17 e NK no baço seguinte à depleção de IL-23.

A fim de esclarecer os mecanismos responsáveis pela resposta prejudicada contra *S. schenckii* observada em camundongos tratados com anti-IL-23, avaliou-se a frequência de alguns subtipos de células imunes no baço desses animais. Dada a resposta Th17 prejudicada e mudanças no perfil de citocinas, nós pensamos inicialmente na possibilidade de que o desenvolvimento de células Th1 pudesse ser favorecido nos animais tratados com anti-IL-23. No

entanto, não encontramos nenhuma diferença na frequência de células Th T-bet simples-positivas entre os diferentes grupos de tratamento. Ao invés disso, a frequência de células Th T-bet+ROR γ t+ e, em certa medida, de ROR γ t simples-positivas estava aumentada como consequência da depleção de IL-23 (Figuras 6E-G). Isto foi especialmente inesperado dado que o fenótipo misto T-bet+ROR γ t+ é comumente associado com células Th17 “patogênicas”, cujo desenvolvimento é absolutamente dependente de IL-23 (Gaffen *et al.*, 2014; Hemdan *et al.*, 2012; Zúñiga *et al.*, 2013). Uma possível explicação poderia ser que, apesar de terem a frequência aumentada, as células Th T-bet+ROR γ t+ e ROR γ t simples-positivas tivessem, individualmente, uma menor expressão de seus respectivos fatores de transcrição como resultado da comprometida estimulação por IL-23, mas, no entanto, não encontramos diferença nos níveis de expressão de T-bet ou ROR γ t em nenhuma dessas populações (medida pela mediana da intensidade de fluorescência – “MFI” – da marcação de T-bet e/ou ROR γ t em células Th T-bet+ROR γ t+ ou ROR γ t simples-positivas; dados não mostrados) entre os diferentes tratamentos em animais infectados.

Ainda, considerando resultados anteriores mostrando um marcado aumento na frequência de células NK CD3-CD49b+ no baço dos camundongos durante a infecção por *S. schenckii*, junto ao reconhecido papel dessas células na defesa contra infecções fúngicas (Ivanova *et al.*, 2014; Schmidt *et al.*, 2013), nós avaliamos essa população em animais depletados de IL-23 a fim de explorar mais a fundo as causas da piora da capacidade de controle fúngico encontrada antes. A frequência dessas células estava igualmente aumentada nos três grupos de animais infectados (Figura 6H), o que está em linha com um estudo recente por Bär e colaboradores (Bär *et al.*, 2014) mostrando que a frequência de células NK CD3-CD49b+NKp46+ no baço de camundongos *Il17ra*^{-/-} não é diferente daquela dos animais selvagens. Este mesmo estudo mostra que o bloqueio temporário da via de sinalização da IL-17 não prejudica a produção de IFN- γ por células NK nem a atividade fungicida das mesmas, implicando ainda mais as células

NK, ao invés de células Th1/Th17 patogênicas, como uma das principais fontes de IFN- γ nesse modelo.

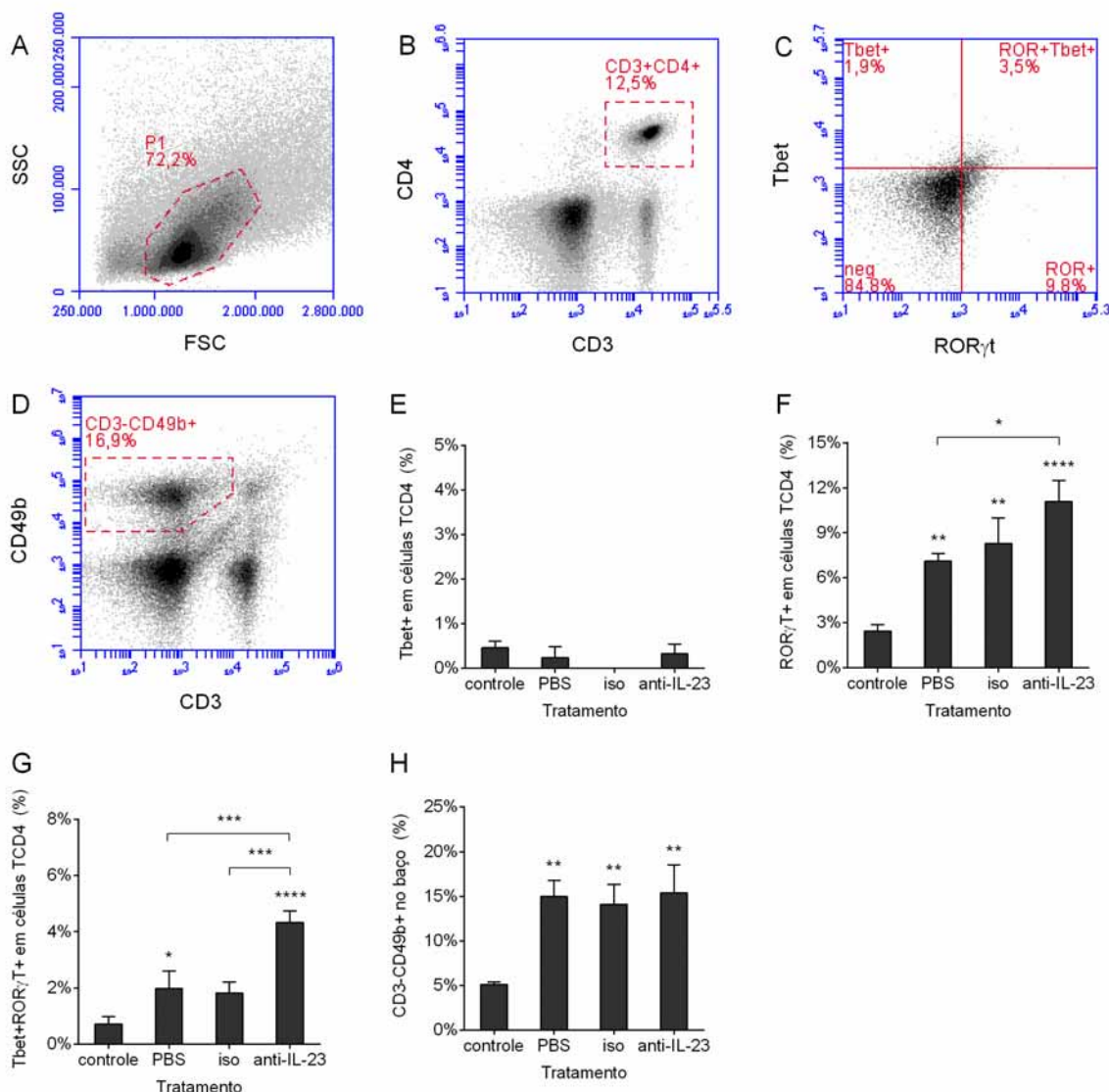


Figura 6. Mudança na freqüência de células Th1, Th17 e NK no baço seguinte à depleção de IL-23. Os camundongos foram inoculados pela via i.p. com PBS estéril (controle) ou com 10^6 leveduras de *S. schenckii* em PBS adicionado de $10\mu\text{g}$ de um anticorpo monoclonal neutralizante anti-IL-23p19 (anti-IL-23), seu isotipo controle (iso) ou sem adição nenhuma (PBS), e então tratados conforme indicado. No dia 10 pós-inoculação, os camundongos foram eutanaziados para a remoção do baço e as células do baço resultantes foram marcadas conforme mostrado. A-C: “density plots” e estratégia de “gating” representativos da determinação de células Th Tbet+, ROR γ t+ ou Tbet+ROR γ t+. D: “density plots” e estratégia de “gating” representativos da determinação de células NK CD3-CD49b+. E-G: percentual das subpopulações indicadas dentro da população principal do baço. H: percentual de células NK CD3-CD49b+ dentro da população total do baço. A significância estatística foi determinada por ANOVA de 1 via usando o teste de comparações múltiplas de Tukey e intervalo de confiança em 95%. * (p < 0,05), ** (p < 0,01), *** (p < 0,001) e **** (p < 0,0001), quando comparado com o grupo controle em cada ponto respectivo ou conforme indicado. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão de 3 animais.

5. Discussão

Considerando a importância do perfil de células Th para a efetividade das respostas geradas às infecções de forma geral, e às infecções fúngicas em específico, é importante caracterizar e definir claramente os papéis destas células na infecção por *S. schenckii*. Dito isto, a correta caracterização dos subtipos de células Th é complicada. Por um lado, a identificação de um único fator de transcrição determinante de linhagem não garante que este fator esteja ativo e, mesmo que esteja, ainda não há garantia de que as funções efetoras da célula sejam primariamente determinadas pelo fator identificado, já que a co-expressão de diferentes “fatores mestre”, alguns dos quais têm dominância sobre outros na determinação do programa transcricional da célula, pode resultar numa variedade de fenótipos mistos. Por outro lado, devido à existência de células Treg e T “helper” foliculares (Tfh) exibindo fenótipos semelhantes a Th1, Th2 ou Th17, além de células duplo-produtoras de IFN- γ e IL-17 ou IFN- γ e IL-4, mesmo a identificação da produção de citocinas-padrão por determinadas células oferece problemas (Evans & Jenner 2013; Nakayamada *et al.*, 2012; Zhu & Paul 2010a; Zhu & Paul 2010b). Qualquer que seja o caso, considerando o papel dominante do ROR γ t na especificação do comprometimento com a linhagem Th17 e na indução da expressão de IL-17 através da ligação direta ao promotor do gene *il17* (Hemdan *et al.*, 2012; Hirahara *et al.*, 2010), as frequências aumentadas tanto de células ROR γ t simples-positivas como de T-bet+ROR γ t+, mas não de células T-bet simples-positivas, dentro da população de células Th nos baços de animais infectados sugere que, em relação unicamente ao equilíbrio Th1/Th17, *S. schenckii* direciona as células Th principalmente para ao fenótipo Th17, mesmo que misto.

Interessantemente, tem sido sugerido que, como o faz para células Th1 e Th2, a força da estimulação via TCR também influencia criticamente a diferenciação de células Th17, por um mecanismo que exige forte estimulação antigênica e leva à regulação positiva da expressão de CD40 ligante (CD40L) com o subsequente aumento da produção de IL-6 por células dendríticas

(“DCs”) (Huang *et al.*, 2012). Dado que em nossos experimentos os camundongos foram infectados com *S. schenckii* pela via i.p., e Zhong e colaboradores (2007) reportaram que células B1 peritoneais induzem preferencialmente a diferenciação de células Th17 e Th1 *in vitro* em razão de sua maior capacidade de apresentação antigênica, somos levados a acreditar que a rota de infecção pode ter contribuído para o enviesado desenvolvimento de células Th17 em nosso modelo. Ainda, existem trabalhos ligando a apoptose induzida pela infecção ao desenvolvimento de células Th17, devido à produção de TGF- β e IL-6 por DCs induzida pelo reconhecimento simultâneo de ligantes microbianos e de células apoptóticas (Brereton & Blander, 2011). Alinhado a isso, nós evidenciamos que a apoptose das células do baço, medida pelo ensaio de ligação à Anexina V, está aumentada nos dias 10 e 15 pós-infecção, sugerindo um mecanismo adicional pelo qual o desenvolvimento de células Th17 pode ter sido preferencialmente induzido.

Surpreendentemente, apesar dos números escassos de células Th T-bet simples-positivas, os níveis de IFN- γ estavam bastante aumentados no dia 10 pós-infecção. Embora isso possa ser resultado do desenvolvimento de um fenótipo misto T-bet+ROR γ t+ altamente inflamatório, que co-expressa IFN- γ e IL-17 e é induzido por IL-23 (Gaffen *et al.*, 2014; Hemdan *et al.*, 2012; Zúñiga *et al.*, 2013), a população de células Th T-bet+ROR γ t+ ainda assim representa apenas cerca de 2% do total de células Th no dia 10 pós-infecção e nossos experimentos de depleção de IL-23 não apoiam essa hipótese. Por outro lado, mesmo que a expressão de T-bet por si só não seja um bom indicador da potencial produção de IFN- γ , uma vez que cofatores e outros fatores determinantes de linhagem co-expressos desempenham um papel substancial na modulação da atividade do fator mestre e nas funções efetoras da célula, estas poucas células poderiam ter, individualmente, uma expressão aumentada de T-bet, “signal transducer and activator of transcription” 4 (STAT4) ou outros cofatores e fatores de transcrição sinérgicos como o “runt-related transcription factor” 3 (Runx3) e o “homeobox transcription factor” (Hlx) (Bowen 2008; Djuretic *et al.*, 2007; Oh & Hwang 2014; Zhu *et al.*, 2012). No entanto, visto que T-bet aumenta ou tem sua expressão aumentada por alguns desses fatores, somado ao fato de não termos

encontrado nenhuma diferença nos níveis de expressão de T-bet entre camundongos controle e infectados (medida pela MFI da marcação de T-bet em células Th T-bet+ROR γ t+; dados não mostrados), isto é pouco provável. Deste modo, nossos resultados sugerem que outras fontes de IFN- γ , tais como células T γ δ , NK, NKT ou T CD8+, assim como outros membros de um subgrupo de células linfóides inatas (“ILCs”) denominado ILC1s (Cella *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2012; Schoenborn & Wilson, 2007), poderiam ser também responsáveis pela liberação dessa citocina em nosso sistema. Um conjunto maior de evidências apóiam a participação de células NK CD3-CD49b+, dado que as mesmas representam cerca de 15% das células totais do baço no dia 10 pós-infecção, um aumento de 3x em relação a sua frequência em camundongos controle. Ainda, tem-se mostrado que o IFN- γ produzido por células NK é diretamente responsável pela atividade anti-fúngica destas células contra *Aspergillus fumigatus in vitro* (Bouzani *et al.*, 2011) e pelo aumento da atividade fungicida de fagócitos tanto *in vitro* como *in vivo* (Schmidt *et al.*, 2013).

Não obstante, embora a frequência de células Th ROR γ t simples-positivas esteja aumentada no baço dos camundongos infectados e possa ser prontamente relacionada à liberação aumentada de IL-17 nesses animais, outras fontes não podem ser descartadas. Na realidade, além das células Th17, muitas outras, incluindo as células Th1, T CD8+ (nesse caso denominadas Tc17), T γ δ e NKT invariantes (iNKT), as células semelhantes às indutoras de tecido linfóide (LTi), células ILC17, além de neutrófilos e mastócitos, são todas capazes de produzir IL-17 (Cua & Tato 2010; Kim & Jordan 2013; Rutz *et al.*, 2013). Com a excessão de netrófilos e mastócitos, todas estas (embora as células Th1 e ILC17 em menor grau), mais as células ILC22, são também capazes de produzir IL-22 (Cella *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2012; Rutz *et al.*, 2013). As células Th22 não estão incluídas porque, ao contrário de em humanos, células Th produtoras de IL-22 não foram definidas como um subtipo distinto em camundongos, sendo que, nesta espécie, as células Th17 são as principais fontes de IL-22 entre as células Th (Rutz *et al.*, 2013). Dentre essas outras fontes, as células semelhantes às LTi e um subtipo de células T γ δ são conhecidas

por residirem no baço durante o estado de equilíbrio (Cua & Tato 2010; Gaffen *et al.*, 2014) e poderiam, portanto, ser responsáveis por pelo menos parte da liberação de IL-17 e IL-22 em nossas culturas. É evidente a necessidade de estudos mais aprofundados para definir a importância relativa de cada uma dessas fontes em nosso modelo.

Um dos pontos-chave a se considerar ao avaliar o controle deficiente da infecção por *S. schenckii* em camundongos depletados de IL-23 consiste no bloqueio incompleto da resposta Th17 nesses animais. Existem dois motivos imediatamente reconhecíveis para isso, um deles sendo que a depleção mediada por anticorpo é um processo inerentemente incompleto, já que é impossível neutralizar todas as moléculas-alvo no organismo do hospedeiro. O outro motivo diz respeito à produção de citocinas efetoras Th17 independente de estimulação por IL-23, pela via clássica dependente de TCR em células $T\alpha\beta$ ou por outros mecanismos (Guo *et al.*, 2012; Hasegawa *et al.*, 2013; Yoshiga *et al.*, 2008). No entanto, se por um lado nosso modelo de depleção de IL-23 pode estar permitindo que os animais, em última instância, sobrevivam e eliminem a infecção por *S. schenckii*, por outro ele também é responsável por defeitos na resposta imune não relacionados à resposta Th17. Primeiro, o receptor da IL-23 (IL-23R) é expresso em muitas outras células além das células Th17, como nas células $T\gamma\delta$, iNKT, NKp46, DCs, nas ILC3s incluindo as células semelhantes às LTI, e também em macrófagos e neutrófilos (Tan *et al.*, 2009; Zúñiga *et al.*, 2013), embora a subpopulação de células iNKT presente no baço de camundongos não pareça expressar IL-23R ou produzir IL-17 (Guo *et al.*, 2012). Segundo, a ligação ao IL-23R nessas células induz a expressão de ROR γ t por uma via dependente de STAT3 e a produção de citocinas efetoras Th17, sendo digno de nota que, diferente das células Th17, a expressão do IL-23R por quase todas as células inatas produtoras de IL-17 é constitutiva (Cua & Tato, 2010; Zúñiga *et al.*, 2013). Terceiro, foi sugerido que a manutenção da expressão de IL-23R em células Th17 depende da constante estimulação por IL-23, cuja ausência pode causar a conversão das células Th17 para um fenótipo produtor de IL-10 (Zúñiga *et al.*, 2013). Desse modo, enquanto poderia ser esclarecedor explorar a habilidade do hospedeiro em conter a

infecção por *S. schenckii* na completa ausência de IL-23, é igualmente importante elucidar o papel específico da resposta Th17 e de cada citocina efetora individualmente dentro dela.

Nosso trabalho acrescenta *S. schenckii* à lista de patógenos oportunistas que carecem de atenção num momento em que novas terapias especificamente direcionadas contra a resposta Th17, voltadas para o tratamento da rejeição a transplantes, de certos tipos de câncer e, mais proeminentemente, de condições inflamatórias crônicas como psoríase, esclerose múltipla, artrite reumatóide, doença de Crohn e espondilite anquilosante, dentre outras (Gaffen *et al.*, 2014; Miossec & Kolls, 2012; Toussiro, 2012). É importante questionar quais efeitos a anulação completa da deste tipo de resposta ou de todos os membros da família da IL-17, ou especificamente da ação da IL-17 ou da IL-17F, teriam sobre a suscetibilidade do hospedeiro ao *S. schenckii*, uma vez que recentes estudos clínicos em humanos tendo como alvo IL-23, IL-17(A), IL-17RA (subunidade A do receptor de IL-17, compartilhada entre quase todos os membros dessa família de receptores) ou a subunidade p40 da IL-23 (também presente na IL-12) mostraram grandes diferenças tanto na suscetibilidade a infecções como na eficácia do tratamento.

Conclusões

- A infecção sistêmica por *S. schenckii* induz tanto o desenvolvimento de células Th17 como a liberação das principais citocinas efetoras produzidas por elas: IL-17 e IL-22.
- A apoptose, medida pela marcação com Anexina V e PI, aumenta durante a infecção, apresentando uma cinética próxima a do desenvolvimento das células Th17.
- A infecção é efetivamente controlada apesar da quase ausência de células Th1, sendo possível que grande parte dos níveis encontrados de IFN- γ venham de células NK.
- O bloqueio da resposta Th17 pela depleção de IL-23 prejudicou significativamente a capacidade dos animais controlarem a infecção, mas não a capacidade de sobrevivência a esta.

Referências

1. Alegranci, P.; de Abreu Ribeiro, L.C.; Ferreira, L.S.; Negrini, T. de C.; Maia, D.C.; Tansini, A.; Gonçalves, A.C.; Placeres, M.C.; Carlos, I.Z. 2013. The predominance of alternatively activated macrophages following challenge with cell wall peptide-polysaccharide after prior infection with *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*. 176(1-2): 57-65.
2. Alba-Fierro, C.A.; Pérez-Torres, A.; López-Romero, E.; Cuéllar-Cruz, M.; Ruiz-Baca, E. 2014. Cell wall proteins of *Sporothrix schenckii* as immunoprotective agents. *Rev. Iberoam. Micol.* 31(1): 86-89.
3. Al-Tawfiq, J.A.; Wools, K.K. 1998. Disseminated sporotrichosis and *Sporothrix schenckii* fungaemia as the initial presentation of human immunodeficiency virus infection. *Clin. Infec. Dis.* 26(6): 1406-1409.
4. Alviano, C.S.; Travassos, L.R.; Schauer, R. 1999. Sialic acids in fungi: a minireview. *Glycoconj. J.* 16(9): 545-554.
5. Aung, A.K.; The, B.M.; McGrath, C.; Thompson, P.J. 2013. Pulmonary sporotrichosis: case series and systematic analysis of literature on clinico-radiological patterns and management outcomes. *Med Mycol.* 51: 534-544.
6. Bär, E., Whitney, P.G., Moor, K., Reis e Sousa, C., LeibundGut-Landmann, S. 2014. IL-17 regulates systemic fungal immunity by controlling the functional competence of NK cells. *Immunity.* 40(1): 117-127.
7. Barros, M.B.L.; Schubach, A.O.; Galhardo, M.C.G.; Schubach, T.M.P.; Valle, A.C.F. 2003. Sporotrichosis with widespread cutaneous lesions: report of 24 cases related to transmission by domestic cats in Rio de Janeiro, Brazil. *Int. J. Dermatol.* 42: 677-81.
8. Barros, M.B.; de Almeida Paes, R.; Schubach, A.O. 2011. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 24(4): 633-654.
9. Beadling, C.; Slifka, M.K. 2006. Regulation of innate and adaptive immune responses by the related cytokines IL-12, IL-23, and IL-27. *Arch. Immunol.* 54: 15-24.
10. Benard, G.; Romano, C.C.; Cacere, C.R.; Juvenale, M.; Mendes-Giannini, M.J.S.; Duarte, A.J.S. 2001. Imbalance of IL-2, IFN- γ and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* 13(4): 248-252.
11. Blaylock, M.G.; Cuthbertson, B.H.; Galley, H.; Ferguson, N.R.; Webster, N.R. 1998. The effect of nitric oxide and peroxynitrite on apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes. *Free Radical Biology & Medicine.* 25(6): 748-752.
12. Bogdan, C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* 2(10): 907-916.

13. Bowen, H.; Kelly, A.; Lee, T.; Lavender: 2008. Control of cytokine gene transcription in Th1 and Th2 cells. *Clin. Exp. Allergy*. 38(9): 1422-1431.
14. Bouzani, M.; Ok, M.; McCormick, A.; Ebel, F.; Kurzai, O.; Morton, C.O.; Einsele, H.; Loeffler, J. 2011. Human NK cells display important antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*, which is directly mediated by IFN- γ release. *J. Immunol*. 187(3): 1369-76.
15. Brereton, C.F.; Blander, J.M. 2010. Responding to infection and apoptosis - a task for Th17 cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1209: 56-67.
16. Buommino, E.; Nicoletti, R.; Gaeta, G.M.; Orlando, M.; Ciavatta, M.L.; Baroni, A.; Tufano, M.A. 2004. 3-*O*-Methylfunicone, a secondary metabolite produced by *Penicillium pinophilum*, induces growth arrest and apoptosis in HeLa cells. *Cell Prolif*. 37: 413-426.
17. Carlos, I.Z.; Sgarbi, D.B.G.; Angluster, J.; Alviano, C.S.; Silva, C.L. 1992. Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the systemic form of the disease. *Mycopathologia*. 117: 139-144.
18. Carlos, I.Z.; Zini, M.M.C.; Sgarbi, D.B.G.; Angluster, J.; Alviano, C.S.; Silva, C.L. 1994. Disturbances in the production of Interleukin-1 and Tumor necrosis factor in disseminated murine sporotrichosis. *Mycopathologia*. 127: 189-194.
19. Carlos, I.Z.; Sgarbi, D.B.G.; Placeres, M.C.P. 1999. Host organism defense by a peptide-polysaccharide extracted from the fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*. 144: 9-14.
20. Carlos, I.Z.; Sgarbi, D.B.G.; Santos, G.C. 2003. *Sporothrix schenckii* lipid inhibits macrophage phagocytosis, Involvement of nitric oxide and tumor necrosis factor- α . *Scandinavian J. Immunology*. 57: 214-220.
21. Carlos, I.Z.; Sassá, M.F.; da Graça Sgarbi, D.B.; Placeres, M.C.; Maia, D.C. 2009. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. *Mycopathologia*. 168(1): 1-10.
22. Castillo, M.C.; Tapia, F.J.; Arciniegas, E. 1990. Ultrastructural localization of specific surface antigens in the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*. *J. Med. Vet. Mycol*. 28(1): 91-94.
23. Cella, M.; Miller, H.; Song, C. 2014. Beyond NK cells: the expanding universe of innate lymphoid cells. *Front. Immunol*. 16(5): 282.
24. Cervi, L.; Cejas, H.; Masih, D.T. 2001. Cytokines involved in immunosuppressor period in experimental fasciolosis in rats. *international Journal for Parasitology*. 31: 1467-1473.
25. Charalanpos, A.; Roilides, E. 2005. Cytokines and fungal infections. *J. Hematol*. 129: 583-596.
26. Chiapello, L.S.; Baronetti, J.L.; Aoki, M.P.; Gea, S.; Rubinstein, H.; Masih, D.T. 2004. Immunosuppression, interleukin-10 synthesis and apoptosis are induced in rats inoculated with *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan. *Immunology*. 113: 392-400.

27. Cua, D.J.; Tato, C.M. 2010. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 10(7): 479-489.
28. de Araújo, T.; Marques, A.C.; Ferdel, F. 2001. Sporotrichosis. *Int. J. Dermatol.* 40(12): 737-742.
29. Djuretic, I.M.; Levanon, D.; Negreanu, P.; Groner, Y.; Rao, A.; Ansel, K.M. 2007. Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate *Ifng* and silence *Il4* in T helper type 1 cells. *Nat. Immunol.* 8(2): 145-153.
30. Evans, C.M.; Jenner, R.G. 2013. Transcription factor interplay in T helper cell differentiation. *Brief Funct. Genomics.* 12(6): 499-511.
31. Fernandes, K.S.S.; Coelho, A.L.J.; Bezerra, L.M.L.; Barja-Fidalgo, C. 2000. Virulence of *Sporothrix schenckii* conidia and yeast cells, and their susceptibility to nitric oxide. *Immunology.* 101: 563-69.
32. Fernandes, K.S.S.; Neto, E.H.; Brito, M.M.S.; Silva, J.S.; Cunha, F.Q.; Barja-Fidalgo, C. 2007. Detrimental role of endogenous nitric oxide in host defence against *Sporothrix schenckii*. *Immunology.* 123: 469-479.
33. Figueiredo, C.C.; Lima, O.C.; Carvalho, L.; Lopes-Bezerra, L.M.; Morandi, V. 2004. The *in vitro* interaction of *Sporothrix schenckii* with human endothelial cells is modulated by cytokines and involves endothelial surface molecules. *Microbial Pathog.* 36: 177-188.
34. Freitas, D.F.; Valle, A.C.; da Silva, M.B.; Campos, D.P.; Lyra, M.R.; de Souza, R.V.; Veloso, V.G.; Zancopé-Oliveira, R.M.; Bastos, F.I.; Galhardo, M.C. 2014. Sporotrichosis: an emerging neglected opportunistic infection in HIV-infected patients in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8(8): e3110.
35. Gaffen, S.L.; Jain, R.; Garg, A. , Cua, D.J. 2014. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat. Re Immunol.* 14(9): 585-600.
36. Galhardo, M.C.G.; Silva, M.T.T.; Lima, M.A.; Nunes, E.P.; Schettini, L.E.C.; de Freitas, R.F.; Paes, R.A.; Neves, E.S.; do Valle, A.C.F. 2010. *Sporothrix schenckii* meningitis in AIDS during immune reconstitution syndrome. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 81: 696-699.
37. Galluzzi, L.; Vitale, I.; Abrams, J.M.; Alnemri, E.S.; Baehrecke, E.H.; Blagosklonny, M.V.; Dawson, T.M.; Dawson, V.L.; El-Deiry, W.S.; Fulda, S.; Gottlieb, E.; Green, D.R.; Hengartner, M.O.; Kepp, O.; Knight, R.A.; Kumar, S.; Lipton, S.A.; Lu, X.; Madeo, F.; Malorni, W.; Mehlen, P.; Nuñez, G.; Peter, M.E.; Piacentini, M.; Rubinsztein, D.C.; Shi, Y.; Simon, H.U.; Vandenabeele, P.; White, E.; Yuan, J.; Zhivotovsky, B.; Melino, G.; Kroemer, G. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 19(1): 107-120.
38. Gasparoto, T.H.; Gaziri, L.C.J.; Burger, E.; Almeida, R.S.C.; Felipe, I. 2004. Apoptosis of phagocytic cells induced by *Candida albicans* and production of IL-10. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* 42: 219-224.

39. Goldsby, R.A.; Kindt, T.J.; Osborne, B.A.W.H. Kuby immunology. New York: W.H. Freeman and company, 4ed.: 670, 2000.
40. Gori, S.; Lupetti, A.; Moscato, G.; Parenti, M.; Lofaro, A. 1997. Disseminated sporotrichosis in patients with AIDS: case report and review of the literature. *Acta Cytol.* 41(2): 519-521.
41. Guo, L.; Junttila, I.S.; Paul, W.E. 2012. Cytokine-induced cytokine production by conventional and innate lymphoid cells. *Trends Immunol.* 33(12): 598-606.
42. Green, J.T.; Richardson, C.; Marshall, R.W.; Rhodes, J.; Mckirdy, H.C.; Thomas, G.A.; Williams, G.T. 2000. Nitric oxide mediates a therapeutic effect of nicotine in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 14: 1429-1434.
43. Hasegawa, E.; Sonoda, K.; Shichita, T.; Morita, R.; Sekiya, T.; Kimura, A.; Oshima, Y.; Takeda, A.; Yoshimura, T.; Yoshida, S.; Ishibashi, T.; Yoshimura, A. 2013. IL-23-independent induction of IL-17 from $\gamma\delta$ T cells and innate lymphoid cells promotes experimental intraocular neovascularization. *J. Immunol.* 190(4): 1778-1787.
44. Hemdan, N.Y.; Birkenmeier, G.; Wichmann, G. 2012. Key molecules in the differentiation and commitment program of T helper 17 (Th17) cells up-to-date. *Immunol. Lett.* 148(2): 97-109.
45. Hernández-Santos, N.; Gaffen, S.L. 2012. Th17 cells in immunity to *Candida albicans*. *Cell Host Microbe.* 11(5): 425-435.
46. Hirahara, K.; Ghoreschi, K.; Laurence, A.; Yang, X.P.; Kanno, Y.; O'Shea, J.J. 2010. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in Th17 cell differentiation. *Cytokine Growth Factor Re* 21(6): 425-34.
47. Hogan, L.H.; Klein, B.S.; Levitz, S.M. 1996. Virulence factors of medically important fungi. *Clin. Microbiol. Re* 9(4): 469-488.
48. Huang, G.; Wang, Y.; Chi, H. 2012. Regulation of TH17 cell differentiation by innate immune signals. *Cell. Mol. Immunol.* 9(4): 287-95.
49. Huffnagle, G.B.; Deep, G.S. 2003. Innate and adaptive determinants of host susceptibility to medically important fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 344-350.
50. Iyata-Ombetta, S.; Idziorek, T.; Trinel, P-A.; Paulain, D.; Jouault, T. 2003. *C. albicans* phospholipomannan promotes survival of phagocytosed yeasts through modulation of Bad phosphorylation and macrophage apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry.* 278(15): 13086-13092.
51. Ivanova, D.; Krempels, R.; Ryfe, J.; Weitzman, K.; Stephenson, D.; Gigley, J.P. 2014. NK cells in mucosal defense against infection. *Biomed. Res. Int.* 2014: 413982.
52. Kauffman, C.A. 1999. Sporotrichosis. *Clin. Infect. Dis.* 29(2): 231-236.

53. Kim, H-J.; Jang, S.I.; Kim, Y-J.; Pae, H-O.; Won, H-Y.; Hong, K-H.; Oh, H.; Kwon, T-O.; Chung, H-T. 2004. 4-acetyl-12,13-epoxul-9-trichothecene-,15-diol from *Isaria japonica* mediates apoptosis of rat bladder carcinoma NBT-II cells by decreasing anti-apoptotic Bcl-2 expression and increasing pro-apoptotic Bax expression. *The American Journal of Chinese Medicine*. 32(3): 377-387.
54. Kim, J.S.; Jordan, M.S. 2013. Diversity of IL-17-producing T lymphocytes. *Cell. Mol. Life Sci*. 70(13): 2271-2290.
55. Korn, T.; Oukka, M.; Kuchroo, V.; Bettelli, E. 2007. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol.* 19(6): 362-371.
56. Korn,T.; Bettelli, E.; Oukka, M. 2009. IL-17 and Th17 cells. *Annu. Re Immunol*. 27: 485–517.
57. Kroemer, G.; Galluzzi, L.; Vandenabeele, P.; Abrams, J.; Alnemri, E.S.; Baehrecke, E.H.; Blagosklonny, M.V.; El-Deiry, W.S.; Golstein, P.; Green, D.R.; Hengartner, M.; Knight, R.A.; Kumar, S.; Lipton, S.A.; Malorni, W.; Nuñez, G.; Peter, M.E.; Tschopp, J.; Yuan, J.; Piacentini, M.; Zhivotovsky, B.; Melino, G.; Nomenclature Committee on Cell Death 2009. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*. 16(1): 3-11.
58. Langfelder, K.; Streibel, M.; Jahn, B.; Haase, G.; Brakhagea, A.A. 2003. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 38: 143–158.
59. Laubach, V.E.; Shesely, E.G.; Smithies, O.; Sherman, P.A. 1995. Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92: 10688-10692.
60. Lopes-Bezerra, L.M. 2011. *Sporothrix schenckii* Cell Wall Peptidorhamnomannans. *Front. Microbiol*. 2: 243.
61. Lopes-Bezerra, L.M.; Schubach, A.; Costa, R.O. 2006. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *An. Acad. Bras. Cienc*. 78: 293-308.
62. López-Romero, E.; Reyes-Montes, Mdel.R.; Pérez-Torres, A.; Ruiz-Baca, E.; Villagómez-Castro, J.C.; Mora-Montes, H.M.; Flores-Carreón, A.; Toriello, C. 2011. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. *Future Microbiol*. 6(1): 85-102.
63. MacFarlane, A.S.; Huang, D.; Schwacha, M.G.; Meissler Jr^a, J.J.; Gaughan, J.P.; Eisenstein, T.K. 1998. Nitric oxide mediates immunosuppression induced by *Listeria monocytogenes* infection: quantitative studies. *Microbial Pathogenesis*. 25: 267-277.
64. McGeachy, M.J.; McSorley, S.J. 2012. Microbial-induced Th17: superhero or supervillain? *J. Immunol*. 189(7): 3285-3291.

65. Maddur, M.S.; Miossec, P.; Kaveri, S.V.; Bayry, J. 2012. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am. J. Pathol.* 181(1): 8-18.
66. Madrid, I.M.; Xavier, M.O.; Mattei, A.S.; Fernandes, C.G.; Guim, T.N.; Santin, R.; Schuch, L.F.D.; Nobre, M.O.; Meireles, M.C.A. 2010. Role of melanin in the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis. *Microbes and Infection.* 12: 162-165.
67. Madrid, I.M.; Mattei, A.S.; Fernandes, C.G.; Nobre, M.O.; Meireles, M.C. 2012. Epidemiological findings and laboratory evaluation of sporotrichosis: a description of 103 cases in cats and dogs in southern Brazil. *Mycopathologia.* 173(4): 265-73.
68. Mahajan, V.K.; Sharma, N.L.; Shanker, V.; Gupta, P.; Mardi, K. 2010. Cutaneous sporotrichosis: Unusual clinical presentations. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 76: 276-280.
69. Maia, D.C.G.; Sassá, M.F.; Placeres, M.C.P.; Carlos, I.Z. 2006. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia.* 161: 11-19.
70. Marshall, H.E.; Stamler, J.S. 2000. NO waiting to exhale in asthma. *Am J Respir. Crit. Care Med.* 161: 685-687.
71. Martins, G.A.; Petkova, S.B.; Machado, F.S.; Kitsis, R.N.; Weiss, L.M.; Wittner, M.; Tanowitz, H.B.; Silva, J.S. 2001. Fas-FasL interaction modulates nitric oxide production in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *Immunology.* 103: 122-129.
72. McCormack, F.X.; Gobbons, R.; Ward, S.R.; Kuzmenko, A.; Wu, H.; Deep, G.S. 2003. Macrophage-independent fungicidal action of the pulmonary colletins. *J. Infect. Dis.* 278: 36250-36256.
73. Mcgeachy, M.J.; Cua, D.J. 2008. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity.* 28: 445-453.
74. Miossec, P.; Kolls, J.K. 2012. Targeting IL-17 and Th17 cells in chronic inflammation. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11(10): 763-776.
75. Morris-Jones, R. 2002. Sporotrichosis. *Clin. Exp. Dermatol.* 27(6): 427-431.
76. Morris-Jones, R.; Youngchim, S.; Gomez, B.L.; Aisen, P.; Hay, R.J.; Nosanchuk, J.D.; Casadewall, A.; Hamilton, A.J. 2003. Synthesis of melanin-like pigment by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. *Infect. Immun.* 71(7): 4026-4033.
77. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods,* 65: 55-63. 1983.
78. Mosmann, T.R.; Cherwinski, H.; Bond, M.W.; Giedlin, M.A.; Coffman, R.L. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136(7): 2348-2357.

79. Muguruma, K.; Fujimura, T.; Masuzawa, M.; Hashimoto, A.; Ohta, Y.; Katsuoka, K. 1995. Analysis of cytokine profiles in sporotrichosis. *J. Dermatol. Sci.* 10: 92.
80. Myers, J.T.; Tsang, A.W.; Swanson, J.A. 2003. Localized reactive oxygen and nitrogen intermediates inhibit escape of *Listeria monocytogenes* from vacuoles in activated macrophages. *J. Immunol.* 171: 5447-5453.
81. Nakayamada, S.; Takahashi, H.; Kanno, Y.; O'Shea, J.J. 2012. Helper T cell diversity and plasticity. *Curr. Opin. Immunol.* 24(3): 297-302.
82. Navarre, W.W.; Zychlinsky, A. 2000. Pathogen-induced apoptosis of macrophages: a common end for different pathogenic strategies. *Cellular microbiology.* 2(4): 265-273.
83. Nascimento, R.C.; Almeida, S.R. 2005. Humoral immune response against soluble and fractionated antigens in experimental sporotrichosis. *FEMS Immunol. and Med. Microbiol.* 43: 241-247.
84. Negrini, T. de C.; Ferreira, L.S.; Alegranci, P.; Arthur, R.A.; Sundfeld, P.P.; Maia, D.C.; Spolidorio, L.C.; Carlos, I.Z. 2013. Role of TLR-2 and fungal surface antigens on innate immune response against *Sporothrix schenckii*. *Immunol Invest.* 42(1): 36-48.
85. Noben-Trauth, N. 2000. Conventional naive CD4+ T cells provide an initial source of IL-4 during Th2 differentiation. *J. Immunol.* 165: 3620-3625.
86. Nobre, M.O.; Antunes, T.A.; Faria, R.O.; Cleff, M.B.; Fernandes, C.G.; Muschner, A.C.; Meireles, M.C.A.; Ferreira, L. 2005. Differences in virulence between isolates of feline Sporotrichosis. *Mycopathologia.* 160(1): 43-49.
87. O'Connor, R.A.; Jensen, J.S.; Devaney, E. 2000. NO contributes to proliferative suppression in a murine model of filariasis. *Infection and Immunity.* 68(11): 6101-6107.
88. Oda, L.M.; Kubelka, C.F.; Alviano, C.S.; Travassos, L.R. 1983. Ingestion of yeast forms of *Sporothrix schenckii* by mouse peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* 39(2): 497-504.
89. Oh, S.; Hwang, E.S. 2014. The role of protein modifications of T-bet in cytokine production and differentiation of T helper cells. *J. Immunol. Res.* 2014: 589672.
90. Panagio, L.A.; Felipe, I.; Vidotto, M.C.; Gaziri, L.C.J. 2002. Early membrane exposure of phosphatidylserine followed by late necrosis in murine macrophages induced by *Candida albicans* from an HIV-infected individual. *J. Med. Microbiol.* 51: 929-936.
91. Pereira, S.A.; Gremião, I.D.; Kitada, A.A.; Boechat, J.S.; Viana, P.G.; Schubach, T.M. 2014. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 47(3): 392-393.
92. Pericolini, E.; Cenci, E.; Monari, C.; de Jesus, M.; Bistoni, F.; Casadevall, A.; Vecchiarelli, A. 2006. *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide component galactoxylomannan induces apoptosis of human T-cells through activation of caspase-8. *Cellular Microbiology.* 8(2): 267-275.

93. Petković, L.; Arsenijević, V.A.; Skvarc, M.; Kopitar, A.; Kotnik, V.; Simicic, S.; Wraber, B.; Matos, T.; Ihan, A. 2010. Anticryptococcal cytotoxicity of murine nonadherent cells is perforin and nonperforin mediated. *Mycologia*. 102(3): 552-559.
94. Ramos-e-Silva, M.; Vasconcelos, C.; Carneiro, S.; Cestari, T. 2007. Sporotrichosis. *Clin. Dermatol.* 25: 181-187.
95. Rees, R.K.; Swartzberg, J.E. 2011. Feline-transmitted sporotrichosis: A case study from California. *Dermatol. Online J.* 17(6): 2.
96. Rengarajan, J.; Szabo, S.J.; Glimcher, L.H. 2000. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today*. 21(9): 479-483.
97. Restrepo-Gutierrez, S.; Arango-Arteaga, M.; Uribe-Jamilo, F.; Zuluaga-Cadena, A.I.; Restrepo-Moreno, A. 2013. Course of experimental murine infection induced by *Sporothrix schenckii* conidia according to depth of inoculation *J. Med. Vet. Mycol.* 31: 411-420.
98. Rodrigues, A.M.; de Hoog, S.; de Camargo, Z.P. 2013. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Med. Mycol.* 51(4): 405-412.
99. Romagnani, S.; Maggi, E.; Liotta, F.; Cosmi, L.; Annunziato, F. 2009. Properties and origin of human Th17 cells. *Molecular Immunology*. 47: 3-7.
100. Romani, L. 2000. Immunity to fungal infections. *Nature Re Immunol.* 4: 01-23.
101. Romeo, O.; Criseo, G. 2013. What lies beyond genetic diversity in *Sporothrix schenckii* species complex?: New insights into virulence profiles, immunogenicity and protein secretion in *S. schenckii sensu stricto* isolates. *Virulence*. 4(3): 203-206.
102. Romero-Martinez, R.; Wheeler, M.; Guerrero-Plata, A.; Rico, G.; Torres-Guerrero, H. 2000. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect. Immun.* 68: 3696-3703.
103. Rutz, S.; Eidenschenk, C.; Ouyang, W. 2013. IL-22, not simply a Th17 cytokine. *Immunol. Rev.* 252(1): 116-132.
104. Sassá, M.F.; Sauri, A.E.; Souza, L.F.; Ribeiro, L.C.; Sgarbi, D.B.; Carlos, I.Z. 2009. Response of macrophage Toll-like receptor 4 to a *Sporothrix schenckii* lipid extract during experimental sporotrichosis. *Immunology*. 128(2): 301-9.
105. Sassá M.F.; Ferreira, L.S.; Ribeiro, L.C.; Carlos, I.Z. 2012. Immune response against *Sporothrix schenckii* in TLR-4-deficient mice. *Mycopathologia*. 174(1): 21-30.
106. Schmidt, S.; Tramsen, L.; Hanisch, M.; Latgé, J.P.; Huenecke, S.; Koehl, U.; Lehrnbecher, T. Human natural killer cells exhibit direct activity against *Aspergillus fumigatus* hyphae, but not against resting conidia. *J. Infect. Dis.* 203(3): 430-435.
107. Schmidt, S.; Zimmermann, S.Y.; Tramsen, L.; Koehl, U.; Lehrnbecher, T. 2013. Natural killer cells and antifungal host response. *Clin. Vaccine Immunol.* 20(4): 452-458.

108. Schoenborn, J.R.; Wilson, C.B. 2007. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Ad. Immunol.* 96: 41-101.
109. Schubach, T.M.; Schubach, A.; Okamoto, T.; Barros, M.B.; Figueiredo, F.B.; Cuzzi, T.; Fialho-Monteiro, P.C.; Reis, R.S.; Perez, M.A.; Wanke, B. 2004. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 224(10): 1623-1629.
110. Schubach, T.M.; Schubach, A.; Okamoto, T.; Barros, M.B.; Figueiredo, F.B.; Cuzzi, T.; Pereira, S.A.; dos Santos, I.B.; Almeida Paes, R.D.; Paes Leme, L.R.; Wanke, B. 2006. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). *Med. Mycol.* 44(1): 87-92.
111. Schubach, A.; Barros, M.B.; Wanke, B. 2008. Epidemic sporotrichosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21: 129-133.
112. Sgarbi, D.B.G.; Silva, A.J.R.; Carlos, I.Z.; Silva, C.L.; Angluster, J.; Alviano, C.S. 1997. Isolation of ergosterol peroxide and its reversion to ergosterol in the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia.* 139: 9-12.
113. Shi, F.D.; Ljunggren, H.G.; La Cava, A.; Van Kaer, L. 2011. Organ-specific features of natural killer cells. *Nat. Rev. Immunol.* 11(10): 658-671.
114. Shimonaka, H.; Noguchi, T.; Kawai, K.; Kasegawa, I.; Nozawa, Y.; Ito, Y. 1975. 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.* 11(6): 1187-1194.
115. Singh, R.P.; Hasan, S.; Sharma, S.; Nagra, S.; Yamaguchi, D.T.; Wong, D.; Bh, H.; Hossain, A. 2014. Th17 cells in inflammation and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* S1568-9972(14)00163-3. doi: 10.1016/j.autrev.2014.08.019.
116. Sivagnanam, S.; Bannan, A.M.; Chen, S.C.; Ralph, A.P. 2012. Sporotrichosis (*Sporothrix schenckii* infection) in the New South Wales mid-north coast, 2000-2010. *Med. J. Aust.* 196(9): 588-590.
117. Spits, H.; Di Santo, J.P. 2011. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat. Immunol.* 12(1): 21-27.
118. Taborda, C.P.; da Silva, M.B.; Nosanchuk, J.D.; Travassos, L.R. 2008. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. *Mycopathologia.* 165(4-5): 331-339.
119. Tachibana, T.; Matsuyama, T.; Mitsuyama, M. 1998. Characteristic infectivity of *Sporothrix schenckii* to mice depending on routes of infection and inherent fungal pathogenicity. *Med. Mycol.* 36(1): 21-27.

120. Tan, Z.Y.; Bealgey, K.W.; Fang, Y.; Gong, Y.M.; Bao, S. 2009. Interleukin-23: immunological roles and clinical implications. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 41(4): 733-735.
121. Teixeira, A.; de Castro, R.A.; Nascimento, R.C.; Tronchin, G.; Torres, A.P.; Lazéra, M.; de Almeida, S.R.; Bouchara, J.P.; Loureiro y Penha, C.; Lopes-Bezerra, L.M. 2009. Cell surface expression of adhesins for fibronectin correlates with virulence in *Sporothrix schenckii*. *Microbiology.* 155(11): 3730-3738.
122. Toussiro, E. 2012. The IL23/Th17 pathway as a therapeutic target in chronic inflammatory diseases. *Inflamm. Allergy Drug Targets.* 11(2): 159-168.
123. Tsuboi, R.; Sanada, T.; Takamori, K.; Ogawa, H. 1987. Isolation and Properties of Extracellular Proteinases from *Sporothrix schenckii*. *J. of Bacteriology.* 169: 4104-4109.
124. Tsuboi, R.; Sanada, T.; Ogawa, H. 1988. Influence of Culture Medium pH and Proteinase Inhibitors on Extracellular Proteinase Activity and Cell Growth of *Sporothrix schenckii*. *J. Clin. Microbiology.* 26:1431-1433.
125. van der Veen, R.C. 2001. Nitric oxide and T helper cell immunity. *International Immunopharmacology.* 1: 1491-1500.
126. van de Veerdonk, F.L.; Gresnigt, M.S.; Kullberg, B.J.; van der Meer, J.W.M.; Joosten, L.A.B.; Netea, M.G. 2009. Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. *BMB Reports.* 42(12): 776-787.
127. van de Veerdonk, F.L. Marijnissen, R.J.; Kullberg, B.J.; Koenen, H.J.P.M. Cheng, S-C.; Joosten, I.; van den Berg, W.B.; Williams, D.L.; van der Meer, J.W.M.; Joosten, L.A.B.; Netea, M.G. 2009. The macrophage mannose receptor induces IL-17 in response to *Candida albicans*. *Cell Host & Microbe.* 5: 329–340.
128. Vautier, S.; Sousa, Mda. G.; Brown, G.D. 2010. C-type lectins, fungi and Th17 responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21(6): 405-412.
129. Verdan, F.F.; Faleiros, J.C.; Ferreira, L.S.; Monnazzi, L.G.; Maia, D.C.; Tansine, A.; Placeres, M.C.; Carlos, I.Z.; Santos-Junior, R.R. 2012. Dendritic cell are able to differentially recognize *Sporothrix schenckii* antigens and promote Th1/Th17 response in vitro. *Immunobiology.* 8: 788-794.
130. Verícimo, A.B.; França, K.M.; Arnholdt, A.C.V.; Kipnis, T.L. 2006. Increased apoptosis during the early phase of experimental paracoccidioidomycosis as a phenotypic marker of resistance. *Microbes and infection.* 8: 2811-2820.
131. Wang, Z.; Wang, Y.; Zhu, K.; Guo, L.; Yang, Y. 2003. Mechanism of three inhibitors of TACE in blocking the converting of pro-TNF alpha into sTNF alpha. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 23(2): 116-120.

132. Weaver, C.T.; Hatton, R.D.; Mangan, R.; Harrington, L.E. 2007. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol.*;25: 821-852.
133. Wu-Hsieh, B.A.; Chen, W.; Lee, H-J. 1998. Nitric oxide synthase expression in macrophages of *Histoplasma capsulatum*-infected mice is associated with splenocyte apoptosis and unresponsiveness. *Infection and immunity.* 68(11): 5520-5526.
134. Yoshiga, Y.; Goto, D.; Segawa, S.; Ohnishi, Y.; Matsumoto, I.; Ito, S.; Tsutsumi, A.; Taniguchi, M.; Sumida T. 2008. Invariant NKT cells produce IL-17 through IL-23-dependent and -independent pathways with potential modulation of Th17 response in collagen-induced arthritis. *Int. J. Mol. Med.* 22(3):369-374.
135. Zambrano-Zaragoza, J.F.; Romo-Martínez, E.J.; Durán-Avelar, Mde.J.; García-Magallanes, N.; Vibanco-Pérez, N. 2014. Th17 cells in autoimmune and infectious diseases. *Int. J. Inflamm.* 2014: 651503.
136. Zhu, J.; Paul, W.E. 2010. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res.* 20(1): 4-12.
137. Zhu, J.; Paul, W.E. 2010. Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol. Rev* 238(1): 247-62.
138. Zhong, X.; Gao, W.; Degauque, N.; Bai, C.; Lu, Y.; Kenny, J.; Oukka, M.; Strom, T.B.; Rothstein, T.L. 2007. Reciprocal generation of Th1/Th17 and T(reg) cells by B1 and B2 B cells. *Eur J Immunol.* 37(9): 2400-2404.
139. Zhu, J.; Jankovic, D.; Oler, A.J.; Wei, G.; Sharma, S.; Hu, G.; Guo, L.; Yagi, R.; Yamane, H.; Punkosdy, G.; Feigenbaum, L.; Zhao, K.; Paul, W.E. 2012. The transcription factor T-bet is induced by multiple pathways and prevents an endogenous Th2 cell program during Th1 cell responses. *Immunity.* 37(4): 660-673.
140. Zumsteg, U.; Frigerio, S.; Holländer, G.A. 2000. Nitric oxide production and Fas surface expression mediate two independent pathways of cytokine-induced murine β -cell damage. *Diabetes.* 49: 39-47.
141. Zúñiga, L.A.; Jain, R.; Haines, C.; Cua, D.J. 2013. Th17 cell development: from the cradle to the grave. *Immunol. Rev.* 252(1): 78-88.

Capítulo 2

Elsevier Editorial System(tm) for Immunobiology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Optimal clearance of *Sporothrix schenckii* requires an intact Th17 response in a mouse model of systemic infection

Article Type: Research Paper

Keywords: *Sporothrix schenckii*; sporotrichosis; Th17 cell; Th17 response; IL-23 depletion.

Corresponding Author: Ms Iracilda Zeppone Carlos, PhD.

Corresponding Author's Institution:

First Author: Lucas S Ferreira, MSc

Order of Authors: Lucas S Ferreira, MSc; Amanda C Gonçalves, MSc; Deivys L Portuondo, MSc; Danielle Cardoso G Maia, PhD; Marisa Campos P Placeres; Alexander Batista-Duharte, PhD; Iracilda Zeppone Carlos, PhD.

Abstract: The discovery of Th17 cells, along with many other Th cell subsets in the recent years, has expanded the Th1/Th2 paradigm that had persisted since its proposition by Mosmann in 1986. Defined by the characteristic expression of the transcription factor retinoic-related orphan receptor γ t (ROR γ t) and production of IL-17A (IL-17), Th17 cells are powerful inducers of tissue inflammation with a recognized role against extracellular bacteria and fungi. Despite this, the interest in their study came from the pivotal role they play in the development and maintenance of major chronic inflammatory conditions such as multiple sclerosis, rheumatoid arthritis and Crohn's disease, reason why they have been the target of promising new anti-Th17 therapies. Accordingly, the identification of opportunistic pathogens whose clearance relies on the Th17 response is of huge prophylactic importance. As shown here for the first time, this applies to *Sporothrix schenckii*, a thermo-dimorphic fungus and the causative agent of sporotrichosis. Our results show that both Th17 and Th1/Th17 mixed cells are developed during the *S. schenckii* systemic mice infection, which also leads to augmented production of IL-17 and IL-22. Also, by using antibody-mediated IL-23 depletion, we further demonstrate that the optimal fungal clearance, but not survival, depends on an intact Th17 response

Suggested Reviewers: Sandro A Pereira PhD

Researcher, Dermatозoonosis in Domestic Animals Clinical Research Laboratory, Evandro Chagas Clinical Research Institute, Oswaldo Cruz Foundation
sandro.pereira@ini.fiocruz.br

This researcher has extensive experience and is currently active in the field of the work being submitted.

Estela Ruiz-Baca PhD

Professor, Department of Mycology and Microbiology, Faculty of Chemical Sciences, Durango State Juárez University
erb750@hotmail.com

This researcher has extensive experience and is currently active in the field of the work being submitted.

Ana Marisa Fusco-Almeida PhD

Assistant Professor, Department of Clinical Analysis, of Pharmaceutical Sciences of Araraquara, Universidade Estadual Paulista (UNESP)

ana.marisa@uol.com.br

This researcher has extensive experience and is currently active in the field of the work being submitted.

Ângela Maria Victoriano de Campos Soares PhD

Titular Professor, Department of Tropical Diseases, Botucatu School of Medicine, Universidade Estadual Paulista (UNESP)

acsoares@ibb.unesp.br

This researcher has extensive experience and is currently active in the field of the work being submitted.

Dear Editor,

Th17 responses are widely known for their role in fungal infections, although a great part of our current understanding of this relationship comes from studies of a narrow sample of pathogens, especially from *Candida albicans*. Specifically in regard to the mechanisms and relative importance of Th17 responses, this sample is even narrower, forcing dangerous generalizations when making therapeutic choices. On that account alone, expanding the universe of fungal pathogens for which the Th17-fungi relationship is known have great importance. Add to it the impressive lack of data for the emerging health problem represented by sporotrichosis and we have an urgent matter. This is a worldwide distributed disease, caused by a complex of fungal pathogens whose prototypical member is *Sporothrix schenckii*, affecting immunocompromised individuals in an opportunistic fashion. If concerns about the increasing number of broad immunosuppressive therapies and HIV infections are not enough to prompt further efforts to better understand the immune mechanisms implicated in this disease, then the recent emergence of anti-Th17 therapies surely are. Here, we show that the *S. schenckii* systemic mice infection is able to upregulate both Th17 cells and the main effector cytokines produced by it: IL-17 and IL-22. Besides, the infection is effectively controlled despite the near absence of Th1 cells, and we suggest that most of the IFN- γ levels are probably coming from NK cells. Moreover, we were able to demonstrate that blockade of the Th17 response by an anti-IL-23p19 mAb significantly impaired fungal control.

Best regards,

Iracilda Zeppone Carlos

1 Title: Optimal clearance of *Sporothrix schenckii* requires an intact Th17 response in a mouse
2 model of systemic infection.

3 Authors: Lucas Souza Ferreira¹ (gigabreath@hotmail.com), Amanda Costa Gonçalves¹
4 (amandacg13@ig.com.br), Deivys Leandro Portuondo¹ (deivysleandro@gmail.com), Danielle
5 Cardoso Geraldo Maia¹ (maiadcg@uol.com.br), Marisa Campos Polesi Placeres¹
6 (marisapolesi@yahoo.com.br), Alexander Batista-Duharte¹ (batistaduharte@gmail.com),
7 Iracilda Zeppone Carlos^{1†} (carlosiz@fcar.unesp.br).

8 ¹Department of Clinical Analysis, Araraquara's School of Pharmaceutical Sciences. Rua
9 Expedicionários do Brasil, 1621, Postal Code: 14801-902. Universidade Estadual Paulista-
10 UNESP, Júlio Mesquita Filho, Araraquara, SP, Brazil.

11 †Corresponding author: Iracilda Zeppone Carlos. Department of Biosciences and
12 Biotechnology Applied to Pharmacy, Araraquara's School of Pharmaceutical Sciences. Rua
13 Expedicionários do Brasil, 1621, Postal Code: 14801-902. Universidade Estadual Paulista-
14 UNESP, Júlio Mesquita Filho, Araraquara, SP, Brazil. Phone: +55 16 33015713; Fax: +55 16
15 3332-0880; e-mail: carlosiz@fcar.unesp.br

16 Abbreviations: ROR γ t (retinoic-related orphan receptor γ t), T-bet (T-box expressed in T
17 cells), GATA-3 (GATA-binding protein 3), Foxp3 (forkhead box P3), HKss (heat-killed *S.*
18 *schenckii* yeast), Tfh (T follicular helper), IL-23R (IL-23 receptor), DCs (dendritic cells),
19 CLRs (C-type lectin family of receptors), i.p. (intraperitoneal), ILC (innate lymphoid cell),
20 iNKT (invariant NKT), LTi (lymphoid-tissue inducer).

21 Abstract

22 The discovery of Th17 cells, along with many other Th cell subsets in the recent years, has
23 expanded the Th1/Th2 paradigm that had persisted since its proposition by Mosmann in 1986.
24 Defined by the characteristic expression of the transcription factor retinoic-related orphan
25 receptor γ t (ROR γ t) and production of IL-17A (IL-17), Th17 cells are powerful inducers of
26 tissue inflammation with a recognized role against extracellular bacteria and fungi. Despite
27 this, the interest in their study came from the pivotal role they play in the development and
28 maintenance of major chronic inflammatory conditions such as multiple sclerosis, rheumatoid
29 arthritis and Crohn's disease, reason why they have been the target of promising new anti-
30 Th17 therapies. Accordingly, the identification of opportunistic pathogens whose clearance
31 relies on the Th17 response is of huge prophylactic importance. As shown here for the first
32 time, this applies to *Sporothrix schenckii*, a thermo-dimorphic fungus and the causative agent
33 of sporotrichosis. Our results show that both Th17 and Th1/Th17 mixed cells are developed
34 during the *S. schenckii* systemic mice infection, which also leads to augmented production of
35 IL-17 and IL-22. Also, by using antibody-mediated IL-23 depletion, we further demonstrate
36 that the optimal fungal clearance, but not survival, depends on an intact Th17 response.

37 Keywords: *Sporothrix schenckii*, sporotrichosis, Th17 cell, Th17 response, IL-23 depletion.

38 1. Introduction

39 Sporotrichosis is an acute or chronic subcutaneous mycosis affecting humans and other
40 mammals, caused by the *Sporothrix schenckii* species complex, including *Sporothrix*
41 *albicans*, *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix luriei*, *Sporothrix mexicana*
42 and *S. schenckii sensu strictu* (Oliveira et al., 2014). Disease follows the traumatic inoculation
43 of the fungus through injuries containing soil, by inhalation of conidia or as a zoonosis,

44 especially from cat scratches, affecting immunocompromised individuals in an opportunistic
45 fashion (Aung et al., 2013; Barros et al., 2011; López-Romero et al., 2011). In several
46 countries, sporotrichosis is regarded as an emerging opportunistic infection, one that's often
47 neglected (Freitas et al., 2014; Rodrigues et al., 2013). Specifically in Brazil, the last two
48 decades saw a surge in feline and canine cases, mainly in the south and southeast regions of
49 the country (Pereira et al., 2014; Madrid et al., 2012; Nobre et al., 2001; Schubach et al.,
50 2004; Schubach et al., 2006). The infection's outcome and clinical manifestation is highly
51 dependent on the immune status of the host: while immunocompetent individuals usually
52 develop localized cutaneous forms, immunocompromised patients, including those infected
53 with HIV, are predominantly affected by disseminated and systemic forms (Carlos et al.,
54 2009). Our research group has been exploring the *S. schenckii* host-pathogen interaction for
55 quite some time and has previously shown that cell-surface antigens present on the cell-wall
56 of *S. schenckii* are employed as an escape mechanism against the host's macrophages (Carlos
57 et al., 2003). We have also assessed the role played by toll-like receptors (TLRs) -2 and -4 in
58 this fungus' innate immune recognition (Negrini et al., 2013; Negrini et al., 2014; Sassá et al.,
59 2012). Moreover, we have recently shown the involvement of nod-like receptors (NLRs) in
60 fungal recognition through the inflammasome-dependent activation of caspase-1 (Gonçalves
61 et al., 2014).

62 T helper (Th) cells are important orchestrators of the adaptative immune response. They can
63 be subdivided into an ever growing number of subsets, two of which, namely Th1 and Th2
64 cells, have been known for a long time since their proposition by Mosmann et al. (1986). For
65 over two decades we have known that cellular responses are developed during the *S. schenckii*
66 mice infection (Carlos et al., 1992) and, more recently, Th1 and Th2 responses were shown to
67 be elicited in an antigen-specific manner against the fungus' cell-wall antigens (Maia et al.,
68 2006). Since then, two other major subsets have been described: Treg cells, which exert

69 various immunosuppressive functions, and Th17 cells, named after the signature production
70 of IL-17A (IL-17) (Nakayamada et al., 2012; Zhu and Paul, 2010). Th17 cells are
71 characterized by expression of the master transcription factor retinoic-related orphan receptor
72 γ t (ROR γ t) and are able to produce, besides IL-17, also IL-17F, IL-22 and IL-21 (Huang et
73 al., 2012). The combination of TGF- β 1 plus IL-6 or IL-21 initiates Th17 cell differentiation,
74 while IL-23 acts later on the commitment program to further stabilize the phenotype. Also,
75 dendritic cells (DCs) are especially suited for promoting Th17 cell development, especially in
76 response to fungal pathogens through the C-type lectin family of receptors (CLRs), whose
77 triggering favors production of Th17-polarizing cytokines such as IL-23 (Huang et al., 2012;
78 McGeachy and McSorley, 2012; Vautier et al., 2010). Accordingly, our group has previously
79 showed that DCs recognition of *S. schenckii* antigens leads to Th1/Th17 response
80 development *in vitro* (Verdan et al., 2012).

81 Owing primarily, but not exclusively, to IL-17 pro-inflammatory actions, which include
82 neutrophil and Th1 cell recruitment and induction of pro-inflammatory cytokines production
83 by epithelial cells, Th17 cells have a key role in host defense against extracellular bacteria and
84 fungi, showing both protective and deleterious effects (Cua and Tato, 2010; Hernández-
85 Santos and Gaffen, 2012; van de Veerdonk et al., 2009). However, a great part of our current
86 understanding of the fungi-Th17 response relationship comes from studies of a narrow sample
87 of pathogens, especially from *Candida albicans*. Specifically in regard to the mechanisms and
88 relative importance of Th17 responses, this sample is even narrower, forcing dangerous
89 generalizations when making therapeutic choices. Furthermore, Th17 cells and its associated
90 cytokines have been implicated in numerous autoimmune and inflammatory diseases (Singh
91 et al., 2014; Zambrano-Zaragoza et al., 2014), sparking interest in novel therapeutic
92 approaches specifically targeted against Th17 responses, ranging from blockade of Th17 cell
93 differentiation and expansion, to the specific neutralization of their effector cytokines (Gaffen

94 et al., 2014; Maddur et al., 2012; Miossec and Kolls, 2012; Toussiro, 2012). However,
95 despite promising results for some diseases, a common problem regards the increased
96 susceptibility to opportunistic infections, commonly by fungal pathogens. Therefore, further
97 understanding how Th17 responses shape the outcome of opportunistic fungal infections like
98 sporotrichosis, has major clinical applications. By using a murine model of systemic
99 infection, this is, to our knowledge, the first study to assess the development and relative
100 importance of the Th17 response against *S. schenckii*, providing valuable insights into the
101 immune mechanisms triggered by sporotrichosis and paving the road to future preventive and
102 curative therapies.

103 2. Materials and methods

104 2.1. Microorganism and culture conditions

105 *S. schenckii* ATCC 16345, originally obtained from a human case of diffuse lung infection
106 (Baltimore, MD) and kindly provided by the Oswaldo Cruz Foundation (Rio de Janeiro,
107 Brazil), was used for all experiments. For mice infection and heat-killed *S. schenckii* yeast
108 (HKss) preparation, a piece of the fungal mycelium grown on Mycosel (BD Biosciences) agar
109 tubes was transferred to an Erlenmeyer flask containing 100 mL of brain-heart infusion broth
110 (Difco) and then cultured for 7 days at 37 °C with constant shaking at 150 rpm. After that, an
111 aliquot containing 2×10^7 yeast cells was transferred to a new medium and cultured for 5 days
112 more at the same conditions in order to achieve a virtually 100% mycelium-to-yeast
113 conversion in a logarithmically growing culture.

114 2.2. Preparation of the heat-killed *S. schenckii* yeast

115 HKss cells were prepared from the same 5-day-old fungus' culture in brain-heart infusion
116 broth used for animal infection in each respective experiment. Yeast cells were separated

117 from the supernatant by centrifugation at 200 xg for 5 min at room temperature and then
118 washed twice with 8 mL of sterile PBS, pH 7.4 (hereafter, PBS), after which they were
119 resuspended and adjusted to 2.5×10^8 yeast cells/mL in PBS. After that, three to four 1.5 mL
120 aliquots of this suspension were transferred to disposable sterile 15 mL conical tubes,
121 incubated for 1 hour in a 60 °C water bath, and then stored at 2-8 °C until use. A working
122 suspension was obtained by making a 1/10 dilution of the stock suspension in RPMI complete
123 medium (defined as the base RPMI-1640 medium containing 20 µM of 2β-mercaptoethanol,
124 100 U/mL of penicillin and streptomycin, 2 mM of L-glutamine and 5% fetal calf serum). As
125 a control for the efficiency of the heat-killing process, 100 µL aliquots from each tube were
126 inoculated on Mycosel agar plates and checked for CFU growth before use.

127 2.3. Animals and experimental design

128 Male BALB/c mice, 5-7 weeks old at the time of inoculation, were purchased from “Centro
129 Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório”
130 (CEMIB), UNICAMP University (Brazil). Animals were housed in individually ventilated
131 cages in an ambient with controlled temperature and 12-hour light/dark cycles. Water and food
132 were offered *ad libitum*. For each independent experiment, only age-matched animals were
133 used across all groups. Animals were intraperitoneally inoculated with 10^6 *S. schenckii* yeast
134 cells in PBS or with an equal volume of PBS alone. Alternatively, for the IL-23 depletion
135 experiments, mice were inoculated with sterile PBS (“control”) or with 10^6 *S. schenckii* yeast
136 cells in PBS added with 10 µg of an anti-IL-23p19 mAb (“anti-IL-23”), its isotype control
137 (“iso”) or without any addition (“PBS”). For these experiments, mice continued to be treated
138 through the intraperitoneal (i.p.) route with 10 µg of the anti-IL-23p19 mAb, its isotype
139 control or PBS alone on alternate days, from the day of the infection until 2 days prior to
140 animal sacrifice on days 10 or 28 post-infection. Assessment of the systemic fungal load was

141 performed by counting the CFU grown on Mycosel agar plates after the spread-plating of a
142 previously determined dilution of the spleen macerate, collected before the red cell lysis
143 treatment. All animal procedures were performed according to the guidelines of the Brazilian
144 College of Animal Experimentation (COBEA) and were approved by the research ethics
145 committee of Araraquara's School of Pharmaceutical Sciences from UNESP University.

146 2.4. Antibody-mediated depletion of IL-23

147 In order to assess the role played by the Th17 response in the host's immune response against
148 *S. schenckii*, a group of infected animals were treated through the i.p. route, as detailed above,
149 with 200 μ L of a solution containing 10 μ g of an anti-IL-23p19 neutralizing mAb (clone G23-
150 8, eBiosciences). Effectiveness of the treatment was assessed by measuring the *ex vivo* release
151 of IL-17 and IL-22 in 24-hour culture supernatants from total splenocytes challenged with
152 HKss.

153 2.5. Spleen removal and total splenocytes' preparation

154 Spleens were aseptically removed and passed through a 100 μ m cell strainer with the aid of a
155 syringe plunger into a Petri dish containing 2 mL of PBS. For red cell lysis, the resulting
156 suspension was added with 6 mL of a 0.17 M ammonium chloride solution and then incubated
157 in ice for 5 min. Splenocytes were separated from the supernatant by centrifugation at 300 \times g
158 for 5 min at 4 $^{\circ}$ C, washed once with 3 mL of RPMI complete medium and then resuspended
159 in 1 mL of the same medium. Cell concentration was determined by microscopy using the
160 Trypan blue exclusion test and then adjusted to 5×10^6 cells/mL in RPMI complete medium.

161 2.6. Measurement of *ex vivo* cytokine release

162 Splenocytes, obtained as described earlier, were cultured for 24 hours at 37 °C and 5% CO₂
163 on flat bottom 48-well tissue culture plates in the presence of HKss, at a splenocyte-to-yeast
164 ratio of 1:5. Final concentrations were 2.5 x 10⁶ splenocytes/mL and 1.25 x 10⁷ yeast
165 cells/mL. Concanavalin A (0.25 µg/mL in RPMI complete medium) or RPMI alone were used
166 as positive and negative controls, respectively. Cytokines were measured by ELISA
167 (eBioscience) according to the manufacturer's instructions.

168 2.7. Flow cytometry

169 The following anti-mouse mAb were used: anti-CD16/CD32 purified (clone 93), anti-CD3
170 FITC (clone 172), anti-CD4 APC (clone RM4-5), anti-RORγt PE (clone B2D), anti-T-bet
171 PerCP-cy5.5 (clone eBio4B10) e anti-CD49b APC (clone DX5); all from eBioscience. For all
172 staining procedures, only freshly isolated, unstimulated splenocytes were used. Splenocytes
173 were assessed for the frequency of Th1 (T-bet single-positive Th cells), Th17 (RORγt single-
174 positive Th cells), Th1/Th17 (T-bet+RORγT+ Th cells) or NK (CD3-CD49b+ cells) cells.
175 Briefly, cells were stained for extracellular markers, then fixed and permeabilized using
176 eBiosciences' intracellular fixation & permeabilization buffer set, and then stained for the
177 transcription factors T-bet and RORγt. Alternatively, cells were stained for CD3 and CD49b
178 only. Events were acquired using a BD Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences) and
179 analyzed within the flow cytometer's proprietary software. At least 60,000 events were
180 effectively included in each analysis.

181 2.8. Statistical analysis

182 Statistical analysis was performed in GraphPad Prism ver. 6.01, by using one- or two-way
183 analysis of variance (ANOVA) with Tukey or Sidak's multiple comparisons test, respectively,

184 as indicated. Confidence interval was set at 95% for all tests. Groups of 3, 4 or 10 animals
185 were used in each experiment.

186 3. Results

187 3.1. Infection's kinetics

188 Our first step, in order to establish the most adequate time-points to perform further
189 experiments, was to assess the kinetics of the systemic infection following the i.p. inoculation
190 of mice with 10^6 *S. schenckii* yeast cells. We did this by following the spleen's fungal load
191 until all animals had zeroed CFU counts on duplicate plates of a 1/10 dilution of the spleen
192 macerate. The spleen's fungal load reached a peak on day 6 post-infection, after which it
193 started to decrease until all animals had completely eliminated the fungus on day 28 post-
194 infection (Figure 1), although a later survival experiment showed that some animals may
195 actually take longer than 28 days to clear the infection (see item 3.3, Figure 4E). For
196 subsequent experiments, we chose to sacrifice animals on days 5, 10 and 15 post-infection
197 (dotted lines in Figure 1) in order to assess selected parameters of the immune response at,
198 respectively, the peak of animal susceptibility, the ongoing elimination of the fungus and the
199 final clearance of the infection.

200 3.2. Th1/Th17 cell phenotyping and measurement of *ex vivo* cytokine release

201 To understand the roles played by Th1 and Th17 responses and how they're balanced during
202 the *S. schenckii* systemic mice infection, we proceeded to assess these two subsets' frequency
203 in the spleen of mice based on the expression of their lineage-specifying transcription factors,
204 T-bet and ROR γ t, respectively. We found a clear bias toward the development of Th17-
205 instead of Th1-like cells in infected mice, predominantly in the form of ROR γ t single-
206 positive, but also of T-bet+ROR γ t+ Th cells (Figures 2E and 2F). On the other hand, T-bet

207 single-positive cells were only found in very low frequency among Th cells in either control
208 or infected mice (Figure 2D). In order to address to what extent these two subsets' frequency
209 changes would impact cytokine production, we measured the *ex vivo* release of both lineages'
210 main effector cytokines, IFN- γ for Th1 cells, and IL-17, IL-21 and IL-22 for Th17 cells, from
211 24-hour culture supernatants of total splenocytes challenged with the heat-killed *S. schenckii*
212 yeast (HKss). We found that IL-17 and IL-22, but not IL-21, were significantly increased on
213 day 10 post-infection (Figure 3). In fact, we could not find any detectable amount of IL-21 in
214 neither control nor infected mice during the entire evaluated period, which may have been due
215 to a combination of assay sensibility and culturing conditions. However, contrary to expected
216 given the scarcity of T-bet single-positive cells and only moderate numbers of T-bet+ROR γ t+
217 cells, the amount of IFN- γ released was surprisingly high on day 10 post-infection. As
218 discussed later, this is more likely explained by the presence of other IFN- γ -producing cells in
219 our system, especially CD3-CD49b+ NK cells. Collectively, our results show that a Th17
220 response is developed against the *S. schenckii* systemic mice infection, but whether or not
221 Th17 cells are indeed the main source of IL-17 and/or IL-22 in the spleen is not clear,
222 although the time-frame of their increase suggests so (Cua and Tato, 2010).

223 3.3. IL-23 antibody-mediated depletion and survival analysis

224 Given IL-23's well defined role as an inducer of Th17-related cytokines production in both
225 innate and adaptive lymphoid cells, including Th17 cells themselves, as well as its critical role
226 in Th17 cells' development and expansion (Guo et al., 2012; Tan et al., 2009), we expected its
227 depletion would significantly diminish production of the major Th17 effector cytokines. In
228 order to do that, mice were intraperitoneally treated with 10 μ g of an anti-IL-23p19
229 neutralizing mAb, its isotype control or PBS alone on alternate days, from the day of the
230 infection until 2 days prior to animal sacrifice on day 10 or, in a parallel survival experiment,
231 on day 28 post-inoculation. Effectiveness of the treatment was assessed on day 10 post-

232 infection by measuring the *ex vivo* release of IL-17 and IL-22 in 24-hour culture supernatants
233 from total splenocytes challenged with HKss (Figures 4A and 4B). Treatment with the anti-
234 IL-23 mAb caused a marked, although not complete, reduction in both cytokines, which was
235 shown to be directly correlated with an impaired capacity to control the *S. schenckii* infection,
236 as fungal loads in the spleens of anti-IL-23-treated mice were about 5x higher than those
237 found in isotype-treated animals on day 10 post-infection (Figure 4D). However, both anti-IL-
238 23- and isotype-treated animals were equally able to survive the infection. Furthermore, when
239 mice were sacrificed on day 28 post-infection, we found no differences in the spleen's
240 remaining fungal load between these two groups, with exactly 6 out of 10 mice in both groups
241 still showing detectable CFU (Figure 4E). Our results thus indicate that the Th17 response is
242 necessary for the optimal *S. schenckii* elimination during the early stages of infection, but not
243 for animal survival nor for the ability to ultimately clear the infection.

244 Additionally, if IFN- γ -producing highly inflammatory "pathogenic" Th17 cells were an
245 important source of this cytokine in our previous experiments, one would expect this
246 cytokine's release by splenocytes of IL-23-depleted mice to be significantly diminished, as
247 IL-23 is indispensable for attaining IFN- γ -producing T-bet+ Th17 cells (Gaffen et al., 2014;
248 Hemdan et al., 2012; Zúñiga et al., 2013). Results on this front were a bit confusing, since
249 IFN- γ release by splenocytes from IL-23-depleted mice was, indeed, markedly diminished
250 when compared to that of isotype-treated mice, but only slightly lower (and not significant)
251 than that of PBS-treated infected mice (Figure 4C). Considering the increased IFN- γ release
252 by splenocytes from isotype-treated mice, the difference observed between mice treated with
253 the isotype and the anti-IL-23 mAb seems to be due more to the unexpected effects of the
254 former than to the effects of the latter. Lastly, as before, we found no detectable levels of IL-
255 21 in this system.

256 3.4. Changes in spleen's Th1, Th17 and NK cells frequency following IL-23 depletion.

257 To shed some light on the mechanisms responsible for the impaired immune response against
258 *S. schenckii* observed in anti-IL-23-treated mice, we assessed the frequency of selected
259 immune cell subsets in the spleens of these animals. Given the impaired Th17 response and
260 changes in the cytokine milieu, we first thought of the possibility that anti-IL-23-treated mice
261 could prompt the upregulation of Th1 cell development. However, we did not find any
262 difference in T-bet single-positive Th cells' frequency among the different treatment groups.
263 Conversely, the frequencies of both T-bet+ROR γ t+ and, to a certain extent, of ROR γ t single-
264 positive Th cells were found to be increased following the IL-23 antibody-mediated depletion
265 (Figure 5E-G). This was especially unexpected given that the T-bet+ROR γ t+ mixed
266 phenotype is commonly associated with "pathogenic" Th17 cells, whose development
267 absolutely requires IL-23 (Gaffen et al., 2014; Hemdan et al., 2012; Zúñiga et al., 2013). We
268 are currently looking into ways to address these questions.

269 Moreover, given our own unpublished results showing a marked increase in the frequency of
270 CD3-CD49b+ NK cells in the spleens of mice during *S. schenckii* infection, together with
271 these cells' recognized role in anti-fungal host defense (Ivanova et al., 2014; Schmidt et al.,
272 2013), we assessed this population following IL-23 antibody-mediated depletion in order to
273 further explore the causes of the impaired fungal control we found earlier. The frequency of
274 CD3-CD49b+ NK cells was found to be equally increased across all three groups of infected
275 mice (Figure 5H), which is in line with a recent report by Bär et al. (2014) showing that the
276 frequency of CD3-CD49b+NKp46+ NK cells in the spleen of *Il17ra*^{-/-} mice was not different
277 from that of wild type mice. This same report goes on to show that temporary blockade of the
278 IL-17 pathway does not impair NK cell production of IFN- γ nor its fungicidal activity, further

279 implicating NK cells, instead of pathogenic Th1/Th17 cells, as a major source of IFN- γ in our
280 model.

281 4. Discussion

282 It has been suggested that, as it does for Th1 and Th2 cells, the strength of the TCR
283 stimulation also critically influences Th17 cell differentiation, through a mechanism requiring
284 very strong antigen stimulation leading to upregulation of T cell CD40L (CD40 ligand)
285 expression and the subsequent enhancement of IL-6 production by DCs (Huang et al., 2012).
286 Since for our experiments mice were intraperitoneally infected with *S. schenckii*, and Zhong
287 et al. (2007) reported that peritoneal B1 cells preferentially induce Th1/Th17 cell
288 differentiation *in vitro* owing to their greater antigen presentation capacity, we're therefore
289 led to believe that our model's route of infection may have contributed to the skewed Th17
290 cell development found by us. Furthermore, there's been reports linking infection induced
291 apoptosis to Th17 cell development, due to DCs' production of TGF- β and IL-6 driven by
292 simultaneous recognition of microbial and apoptotic cell ligands (Brereton and Blander,
293 2010). Aligned with this, we have evidenced that splenocyte apoptosis, as measured by the
294 Annexin V binding assay, is increased on days 10 and 15 post-infection (Supplementary
295 Figure 1), suggesting yet another mechanism by which Th17 cell development is
296 preferentially induced in our model.

297 Surprisingly, despite the scarce numbers of T-bet single-positive Th cells, antigen-specific
298 IFN- γ release in culture supernatants was greatly increased on day 10 post-infection.
299 Although this could be the result of the development of an IL-23-driven highly inflammatory
300 T-bet+ROR γ t+ mixed phenotype that co-express IFN- γ and IL-17 (Gaffen et al., 2014;
301 Hemdan et al., 2012; Zúñiga et al., 2013), the T-bet+ROR γ t+ Th cell population still accounts
302 for only about 2% of all Th cells on day 10 post-infection and our IL-23 depletion

303 experiments do not support this hypothesis. Thus, our results suggest that other sources of
304 IFN- γ , such as $\gamma\delta$ T, NK, NKT or CD8⁺ T cells, as well as other members of a subset of innate
305 lymphoid cells (ILCs) termed ILC1s (Cella et al., 2014; Guo et al., 2012; Schoenborn and
306 Wilson, 2007), could also be responsible for this cytokine's release in our model. A stronger
307 case is built for CD3-CD49b⁺ NK cells, since they account for around 15% of all splenocytes
308 on day 10 post-infection, a 3-fold increase over their frequency in control mice. Furthermore,
309 NK cell-produced IFN- γ has been shown to be directly responsible for NK cell-mediated anti-
310 fungal activity against *Aspergillus fumigatus in vitro* (Bouzani et al., 2011) and to enhance the
311 fungicidal activity of phagocytes both *in vitro* and *in vivo* (Schmidt et al., 2013).

312 Although ROR γ t single-positive Th cells' frequency is increased in the spleen of infected
313 mice and could be readily associated to the augmented release of IL-17 and IL-22 in these
314 animals, the contribution of other sources cannot be disregarded. As a matter of fact, besides
315 Th17 cells, many other cell types including Th1, $\gamma\delta$ T, invariant NKT (iNKT), lymphoid-tissue
316 inducer (LTi)-like, ILC17 and CD8⁺ T (in this case termed Tc17) cells, plus neutrophils and
317 mast cells are all able to produce IL-17 (Cua and Tato. 2010; Kim and Jordan, 2013; Rutz et
318 al., 2013). With the exception of neutrophils and mast cells, all of the above (although Th1
319 and ILC17 cells to a lesser degree), plus ILC22 cells, are also able to produce IL-22 in mice
320 (Guo et al., 2012; Cella et al., 2014; Rutz et al., 2013). Among these other sources, LTi-like
321 cells and a subset of $\gamma\delta$ T cells are known to reside in the spleen during the steady state (Cua
322 and Tato, 2010; Gaffen et al., 2014) and could, therefore, be accounted for at least part of the
323 IL-17 and IL-22 release in our cultures. Further research is evidently necessary in order to
324 address the relative importance of each one of these sources in our model.

325 One of the key points to take into consideration when evaluating the impaired *S. schenckii*
326 control by IL-23-depleted mice lies within the incomplete blockade of the Th17 response in

327 these animals. There are two easily recognizable reasons for that, one being that antibody-
328 mediated depletion is an inherently incomplete process. The other reason regards the IL-23-
329 independent production of Th17 effector cytokines, via the classical TCR-dependent route on
330 $\alpha\beta$ T cells or through other mechanisms (Guo et al., 2012; Kim and Jordan, 2013; Rutz et al.,
331 2013). However, if on one hand our model's IL-23 depletion design may allow mice to
332 ultimately survive and clear the *S. schenckii* infection, on the other it's also responsible for
333 Th17-unrelated defects in the immune response. First, the IL-23R is expressed by many cell
334 types other than Th17 cells, such as $\gamma\delta$ T, iNKT, NKp46 and LTI-like cells, DCs, ILC3s,
335 macrophages and neutrophils (Tan et al., 2009; Zúñiga et al., 2013), although the iNKT cell
336 subset present in mouse spleen doesn't seem to express IL-23R or produce IL-17 (Guo et al.,
337 2012). Second, IL-23R engagement in these cells leads to STAT3-dependent ROR γ t
338 upregulation and production of Th17-effector cytokines, being noteworthy that, in contrast to
339 Th17 cells, IL-23R expression by nearly all innate IL-17 producing cells is constitutive (Cua
340 and Tato, 2010; Zúñiga et al., 2013). Third, it has been suggested that maintenance of IL-23R
341 expression in Th17 cells depends on constant stimulation by IL-23, whose absence may cause
342 Th17 cells to undergo conversion into a IL-10-producing phenotype (Zúñiga et al., 2013).
343 Therefore, while it would be elucidating to explore the host's ability to contain the *S.*
344 *schenckii* infection in the settings of a complete absence of IL-23, it's equally important to
345 clarify the specific role played by the Th17 response and by single effector cytokines within
346 it.

347 Our findings add *S. schenckii* to the list of opportunistic pathogens needing attention in the
348 wake of new therapies, specifically targeted against Th17 responses, developed to minimize
349 transplant rejections, combat certain kinds of cancer and, more prominently, chronic
350 inflammatory conditions. We wonder what effects the complete abrogation of all Th17 or IL-
351 17 family responses, or the specific blockade of IL-17 or IL-17F, would have on the host's

352 susceptibility to *S. schenckii*, given that recent human clinical trials targeting IL-23, IL-17, IL-
353 17 receptor A (IL-17RA) or the IL-12/23p40 subunit have shown big differences both in
354 susceptibility to infections and efficacy of the treatment. In summary, this is the first report
355 showing both the development of the Th17 response and its importance for the host immune
356 response to *S. schenckii*, advancing the current understanding of the pathogenesis of this
357 emerging opportunistic pathogen.

358 5. Conclusions

- 359 ▪ The *S. schenckii* systemic infection was able to stimulate both the development of Th17
360 cells and the release of the major effector cytokines produced by them: IL-17 and IL-22.
- 361 ▪ The infection was effectively controlled despite the near absence of Th1 cells.
- 362 ▪ Inhibition of the Th17 response by treating mice with the anti-IL-23p19 mAb
363 significantly impaired the animals' ability to control, but not to survive the infection.
- 364 ▪ Apoptosis, as measured by the Annexin V binding assay, increased during infection with
365 a similar kinetic to that of the Th17 cell development.

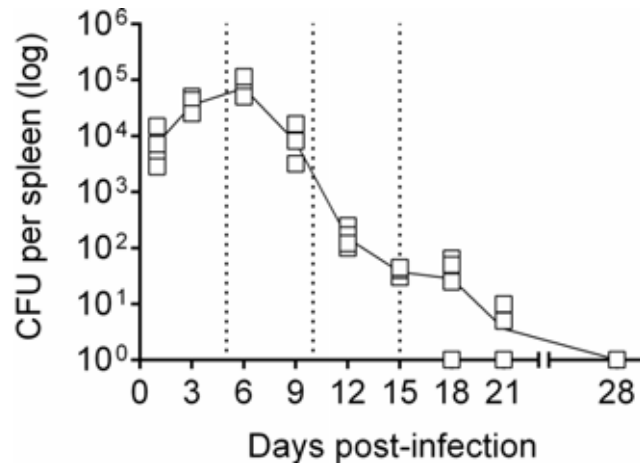
366 Acknowledgments

367 This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
368 (FAPESP, grant n°. 2012/24187-0), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
369 Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
370 (CAPES). None of these funding sources had any role in the determination of the study
371 design, in the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report or in
372 the decision to submit the article for publication.

373 Conflicts of interest

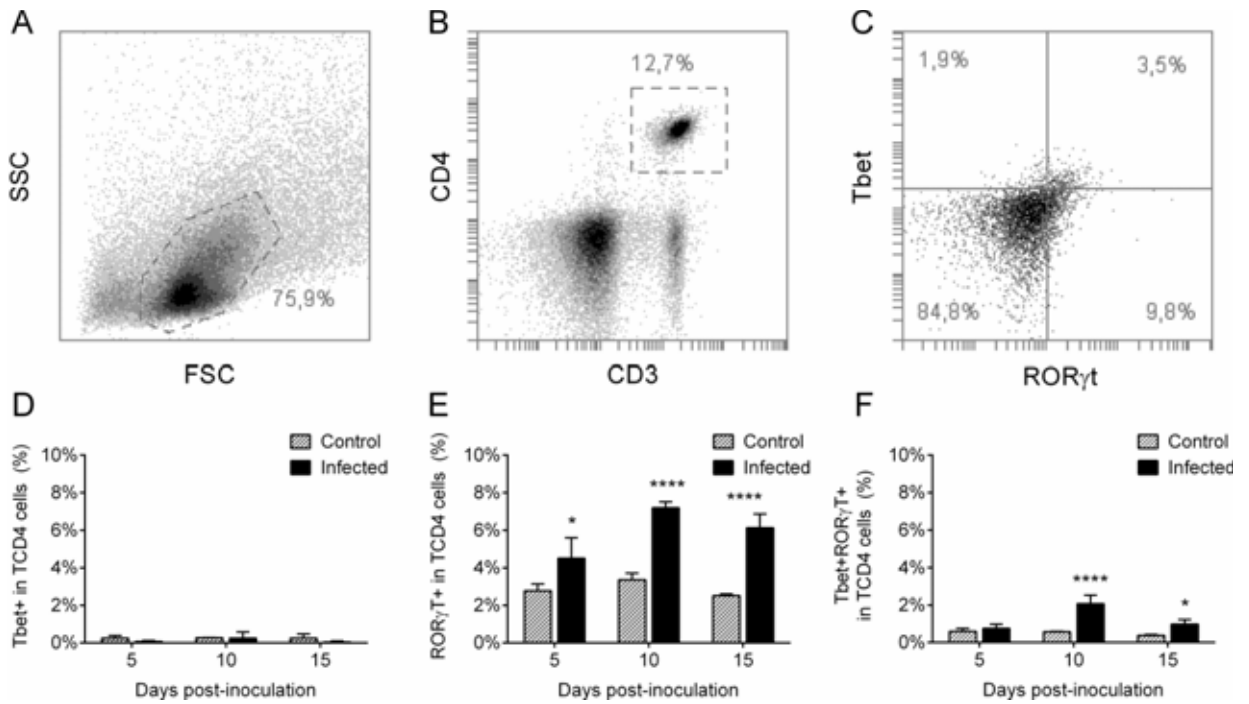
374 The authors declare no commercial or financial conflict of interest.

375 Figures and figure legends



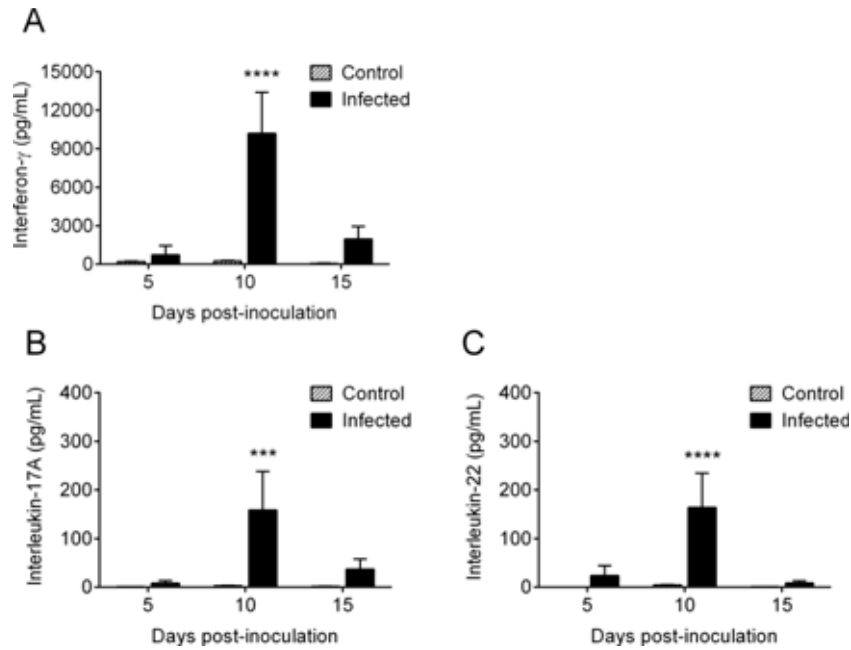
376

377 Figure 1. *Systemic infection kinetics*: mice were intraperitoneally inoculated with 10⁶ *S. schenckii* yeast
378 cells. On indicated days, mice were sacrificed and the spleens were removed for assessment of the
379 systemic fungal load. Adequate dilutions of the spleen macerate were inoculated, in duplicate, on
380 Mycosel agar plates and the resulting CFU were counted after 3 and 6 days post-inoculation. CFU
381 counts equal to zero are presented as 1 (one) in order to appear on the log scale. Doted lines represent
382 the chosen time-points for conducting further experiments. Results are presented as the individual
383 measures from 4 independent experiments.



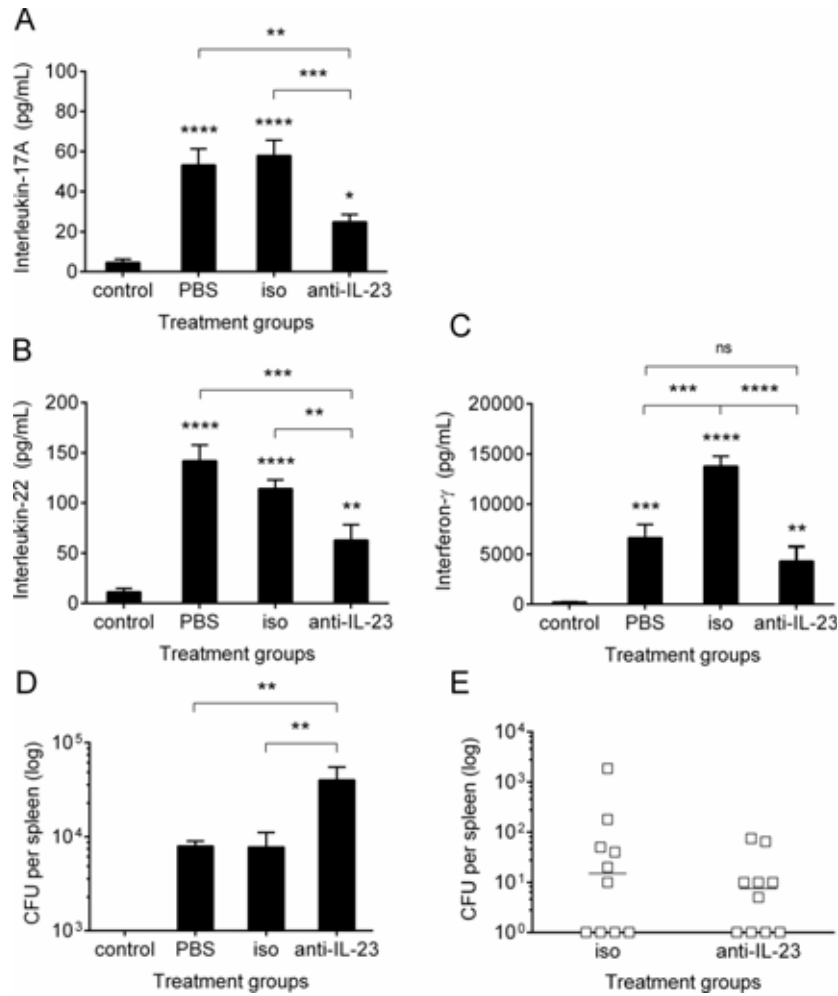
384

385 Figure 2. Kinetics of T-bet and RORγt expressing Th cells in the spleen: mice were intraperitoneally
 386 inoculated with 10^6 *S. schenckii* yeast cells in PBS (infected) or sterile PBS only (control). On
 387 indicated days post-inoculation, mice were sacrificed for removal of the spleen and the resulting
 388 splenocytes were stained as indicated. A-C: representative plots and gating strategy for determination
 389 of Tbet+, RORγt+ or Tbet+RORγt+ Th cells. D-F: percentage of indicated subsets inside the
 390 spleen's main population. Statistical significance was determined by two-way ANOVA using Sidak's
 391 multiple comparisons test and a 95% confidence interval. * ($p < 0.05$) and **** ($p < 0.0001$), when
 392 compared to the control group in each time-point. Results are presented as the mean \pm SD of 3
 393 animals.



394

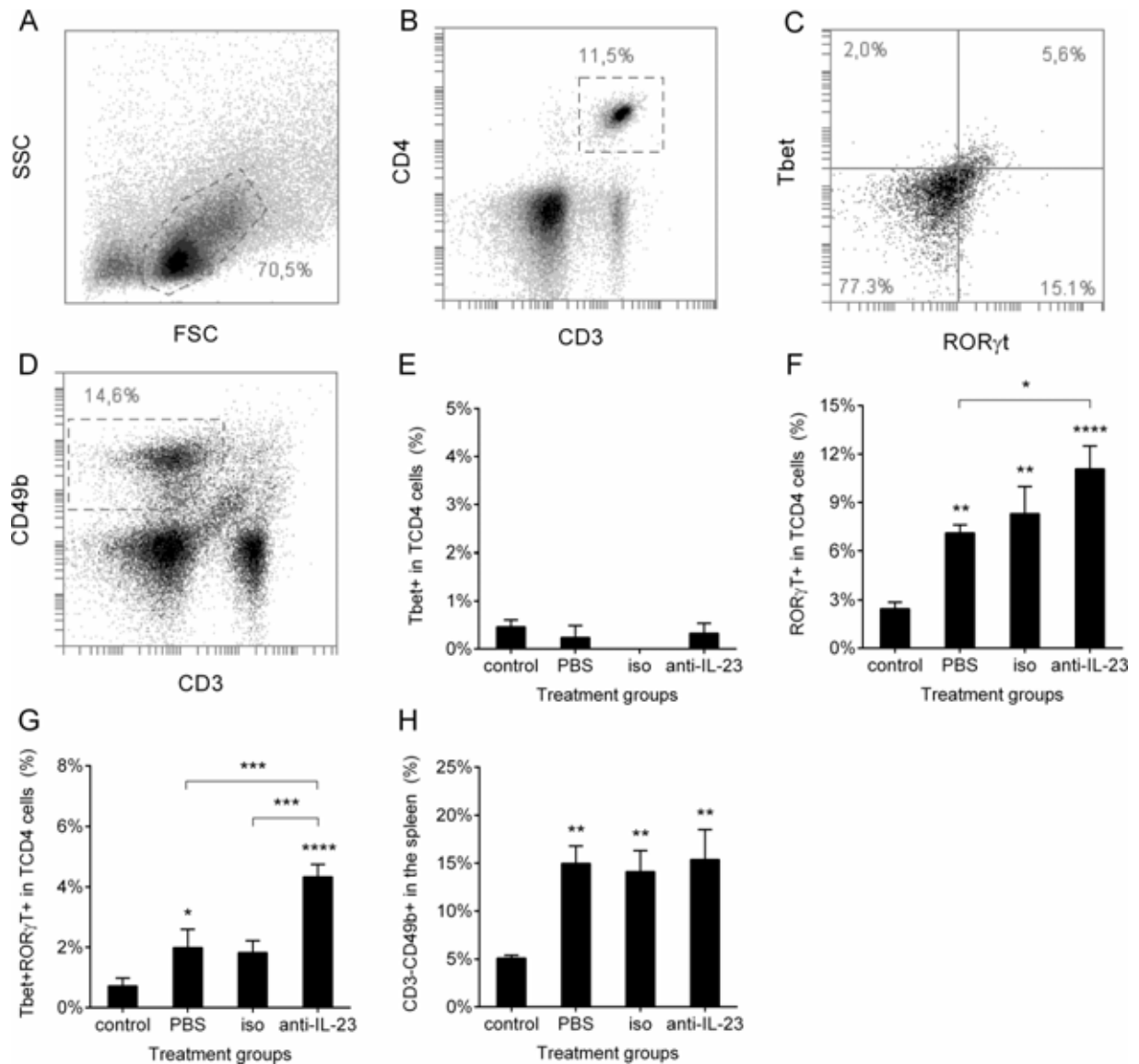
395 Figure 3. *Kinetics of splenocytes' ex vivo release of Th1 and Th17 effector cytokines*: mice were
 396 intraperitoneally inoculated with 10^6 *S. schenckii* yeast cells in PBS (infected) or sterile PBS only
 397 (control). On indicated days post-inoculation, mice were sacrificed for removal of the spleen and the
 398 resulting splenocytes were cultured for 24 hours in the presence of HKss. Supernatant-accumulated
 399 cytokines were measured by ELISA, in duplicate, according to the manufacturer's instructions. A-C:
 400 *ex-vivo* release of indicated cytokines. Statistical significance was determined by two-way ANOVA
 401 using Sidak's multiple comparisons test and a 95% confidence interval. *** ($p < 0.001$) and **** ($p <$
 402 0.0001), when compared to the control group in each time-point. Results are presented as the mean \pm
 403 SD of 3 animals.



404

405 Figure 4. *Systemic fungal load and ex vivo release of cytokines following IL-23 depletion*: mice were
 406 intraperitoneally inoculated with sterile PBS (control) or 10⁶ *S. schenckii* yeast cells in PBS added
 407 with 10 µg of an anti-IL-23p19 neutralizing mAb (anti-IL-23), its isotype control (iso) or without any
 408 addition (PBS) and then treated on alternate days through the same route with 10 µg of the anti-IL-23
 409 mAb (anti-IL-23), its isotype control (iso) or PBS alone (control and PBS), as indicated. On day 10
 410 post-infection, mice were sacrificed and the spleens were removed for assessment of the systemic
 411 fungal load by plating an adequate dilution of the spleen macerate, in duplicate, on Mycosel agar.
 412 Additionally, splenocytes were cultured for 24 hours in the presence of HKss and the supernatant-
 413 accumulated cytokines were measured by ELISA, in duplicate, according to the manufacturer's
 414 instructions. A-C: *ex vivo* release of indicated cytokines. D: fungal load in the spleen of mice on day
 415 10 post-infection; CFU counts equal to zero are not shown on the log scale. E: fungal load in the
 416 spleen of surviving mice on day 28 post-infection; CFU counts equal to zero are presented as 1 (one)
 417 in order to appear on the log scale. Statistical significance was determined by one-way ANOVA using
 418 Tukey's multiple comparisons test, except for Figure E, where statistical significance was determined
 419 by the T test with correction for multiple comparisons by the Holm-Sidak method. In both cases the
 420 confidence interval was set at 95%. * (p < 0.05), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001), **** (p < 0.0001) and

421 ns (non-significant), when compared to the control group or as indicated. Results are presented as the
422 mean \pm SD of 3 animals (A-D) or as the individual measures from 10 mice with the line crossing at the
423 median (E).



424

425 Figure 5. Changes in spleen's Th1, Th17 and NK cells frequency following IL-23 depletion: mice were
 426 intraperitoneally inoculated with sterile PBS (control) or 10^6 *S. schenckii* yeast cells in PBS added
 427 with 10 μ g of an anti-IL-23p19 neutralizing mAb (anti-IL-23), its isotype control (iso) or without any
 428 addition (PBS) and then treated on alternate days through the same route with 10 μ g of the anti-IL-23
 429 mAb (anti-IL-23), its isotype control (iso) or PBS alone (control and PBS), as indicated. On day 10
 430 post-infection, mice were sacrificed for removal of the spleen and the resulting splenocytes were
 431 stained as indicated. A-C: representative plots and gating strategy for determination of Tbet+,
 432 ROR γ t+ or Tbet+ROR γ t+ Th cells. D: representative plot and gating strategy for determination of
 433 CD3-CD49b+ NK cells. E-G: percentage of indicated subsets inside the spleen's main population. H:
 434 percentage of CD3-CD49b+ NK cells in the un gated sample. Statistical significance was determined
 435 by one-way ANOVA using Tukey's multiple comparisons test and a 95% confidence interval. * (p <
 436 0.05), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001) and **** (p < 0.0001), when compared to the control group or as
 437 indicated. Results are presented as the mean \pm SD of 3 animals.

438 References

- 439 1. Aung A K, The B M, McGrath C, Thompson P J. Pulmonary sporotrichosis: case series
440 and systematic analysis of literature on clinico-radiological patterns and management
441 outcomes. *Med Mycol* 2013; 51: 534-544.
- 442 2. Bär E, Whitney P G, Moor K, Reis e Sousa C, LeibundGut-Landmann S. IL-17 regulates
443 systemic fungal immunity by controlling the functional competence of NK cells. *Immunity*
444 2014; 40: 117-127.
- 445 3. Barros M B, de Almeida Paes R, Schubach A O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis.
446 *Clin Microbiol Rev* 2011; 24: 633-654.
- 447 4. Bouzani M, Ok M, McCormick A, Ebel F, Kurzai O, Morton C O, et al. Human NK cells
448 display important antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*, which is directly
449 mediated by IFN- γ release. *J Immunol* 2011; 187: 1369-1376.
- 450 5. Brereton C F, Blander J M. Responding to infection and apoptosis - a task for Th17 cells.
451 *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1209: 56-67.
- 452 6. Carlos I Z, Sgarbi D B, Angluster J, Alviano C S, Silva C L. Detection of cellular
453 immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the systemic form
454 of the disease. *Mycopathologia* 1992; 117(3): 139-44.
- 455 7. Carlos I Z, Sgarbi D B, Santos G C, Placeres M C. *Sporothrix schenckii* lipid inhibits
456 macrophage phagocytosis: involvement of nitric oxide and tumour necrosis factor-alpha.
457 *Scand J Immunol* 2003; 57(3): 214-20.
- 458 8. Carlos I Z, Sassá M F, da Graça Sgarbi D B, Placeres M C, Maia D C. Current research on
459 the immune response to experimental sporotrichosis. *Mycopathologia* 2009; 168(1): 1-10.
- 460 9. Cella M, Miller H, Song C. Beyond NK cells: the expanding universe of innate lymphoid
461 cells. *Front Immunol* 2014; 16: 282.

- 462 10. Cua D J, Tato C M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. Nat
463 Rev Immunol 2010; 10: 479-489.
- 464 11. Freitas D F, Valle A C, da Silva M B, Campos D P, Lyra M R, de Souza R V, et al.
465 Sporotrichosis: an emerging neglected opportunistic infection in HIV-infected patients in
466 Rio de Janeiro, Brazil. PLoS Negl Trop Dis 2014; 8(8): e3110.
- 467 12. Gaffen S L, Jain R, Garg A, Cua D J. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to
468 therapeutic testing. Nat Rev Immunol 2014; 14: 585-600.
- 469 13. Gonçalves A C, Maia D C, Ferreira L S, Monnazzi L G, Alegranci P, Placeres M C, et al.
470 Involvement of Major Components from *Sporothrix schenckii* Cell Wall in the Caspase-1
471 Activation, Nitric Oxide and Cytokines Production During Experimental Sporotrichosis.
472 Mycopathologia 2014; DOI 10.1007/s11046-014-9810-0.
- 473 14. Guo L, Junttila I S, Paul W E. Cytokine-induced cytokine production by conventional and
474 innate lymphoid cells. Trends Immunol 2012; 33: 598-606.
- 475 15. Hemdan N Y, Birkenmeier G, Wichmann G. Key molecules in the differentiation and
476 commitment program of T helper 17 (Th17) cells up-to-date. Immunol Lett 2012; 148: 97-
477 109.
- 478 16. Hernández-Santos N, Gaffen S L. Th17 cells in immunity to *Candida albicans*. Cell Host
479 Microbe 2012; 11: 425-435.
- 480 17. Huang G, Wang Y, Chi H. Regulation of Th17 cell differentiation by innate immune
481 signals. Cell Mol Immunol 2012; 9: 287-295.
- 482 18. Ivanova D, Krempels R, Ryfe J, Weitzman K, Stephenson D, Gigley J P. NK cells in
483 mucosal defense against infection. Biomed Res Int 2014; DOI: 10.1155/2014/413982.
- 484 19. Kim J S, Jordan M S. Diversity of IL-17-producing T lymphocytes. Cell Mol Life Sci
485 2013; 70: 2271-2290.

- 486 20. López-Romero E, Reyes-Montes Mdel R, Pérez-Torres A, Ruiz-Baca E, Villagómez-
487 Castro J C, Mora-Montes H M, et al. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an
488 emerging health problem. *Future Microbiol* 2011; 6: 85-102.
- 489 21. Maddur M S, Miossec P, Kaveri S V, Bayry J. Th17 cells: biology, pathogenesis of
490 autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am J Pathol* 2012; 181:
491 8-18.
- 492 22. Madrid I M, Mattei A S, Fernandes C G, Nobre M O, Meireles M C. Epidemiological
493 findings and laboratory evaluation of sporotrichosis: a description of 103 cases in cats and
494 dogs in southern Brazil. *Mycopathologia* 2012; 173(4): 265-73.
- 495 23. Maia D C G, Sassá M F, Placeres M C P, Carlos I Z. Influence of Th1/Th2 cytokines and
496 nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*
497 2006; 161: 11-19.
- 498 24. McGeachy M J, McSorley S J. Microbial-induced Th17: superhero or supervillain? *J*
499 *Immunol* 2012; 189: 3285-3291.
- 500 25. Miossec P, Kolls J K. Targeting IL-17 and Th17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev*
501 *Drug Discov* 2012; 11: 763-776.
- 502 26. Mosmann T R, Cherwinski H, Bond M W, Giedlin M A, Coffman R L. Two types of
503 murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and
504 secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136: 2348-2357.
- 505 27. Nakayamada S, Takahashi H, Kanno Y, O'Shea J J. Helper T cell diversity and plasticity.
506 *Curr Opin Immunol* 2012; 24: 297-302.
- 507 28. Negrini T de C, Ferreira L S, Alegranci P, Arthur R A, Sundfeld P P, Maia D C, et al. Role
508 of TLR-2 and fungal surface antigens on innate immune response against *Sporothrix*
509 *schenckii*. *Immunol Invest* 2013; 42(1): 36-48.

- 510 29. Negrini T, Ferreira L S, Arthur R A, Alegranci P, Placeres M C, Spolidorio L C, et al.
511 Influence of TLR-2 in the immune response in the infection induced by fungus *Sporothrix*
512 *schenckii*. Immunol Invest 2014; 43(4): 370-90.
- 513 30. Nobre M O, Castro A P, Caetano D, Souza L L, Meireles M C A, Ferreiro L. Recurrence
514 of sporotrichosis in cats with zoonotic involvement. Rev Iberoam Micol 2001; 18:137-40.
- 515 31. Oliveira M M, Almeida-Paes R, Gutierrez-Galhardo M C, Zancope-Oliveira R M.
516 Molecular identification of the *Sporothrix schenckii* complex. Rev Iberoam Micol 2014;
517 31: 2-6.
- 518 32. Pereira S A, Gremião I D, Kitada A A, Boechat J S, Viana P G, Schubach T M. The
519 epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro,
520 Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2014; 47(3): 392-3.
- 521 33. Rodrigues A M, de Hoog S, de Camargo Z P. Emergence of pathogenicity in the
522 *Sporothrix schenckii* complex. Med Mycol 2013; 51(4):405-12.
- 523 34. Rutz S, Eidenschenk C, Ouyang W. IL-22, not simply a Th17 cytokine. Immunol Rev
524 2013; 252: 116-132.
- 525 35. Sassá M F, Ferreira L S, Ribeiro L C, Carlos I Z. Immune response against *Sporothrix*
526 *schenckii* in TLR-4-deficient mice. Mycopathologia 2012; 174(1): 21-30.
- 527 36. Schmidt S, Zimmermann S Y, Tramsen L, Koehl U, Lehrnbecher, T. Natural killer cells
528 and antifungal host response. Clin Vaccine Immunol 2013; 20: 452-458.
- 529 37. Schoenborn J R, Wilson C B. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive
530 immune responses. Ad Immunol 2007; 96: 41-101.
- 531 38. Schubach T M, Schubach A, Okamoto T, Barros M B, Figueiredo F B, Cuzzi T, et al.
532 Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). J Am Vet Med
533 Assoc 2004; 224(10): 1623-9.

- 534 39. Schubach T M, Schubach A, Okamoto T, Barros M B, Figueiredo F B, Cuzzi T, et al.
535 Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis
536 and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). *Med Mycol* 2006; 44(1): 87-92.
- 537 40. Singh R P, Hasan S, Sharma S, Nagra S, Yamaguchi D T, Wong D, et al. Th17 cells in
538 inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2014; DOI:
539 10.1016/j.autrev.2014.08.019.
- 540 41. Tan Z Y, Bealgey K W, Fang Y, Gong Y M, Bao S. Interleukin-23: immunological roles
541 and clinical implications. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41: 733-735.
- 542 42. Toussirot E. The IL23/Th17 pathway as a therapeutic target in chronic inflammatory
543 diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2012; 11: 159-168.
- 544 43. van de Veerdonk F L, Gresnigt M S, Kullberg B J, van der Meer J W M, Joosten L A B,
545 Netea M G. Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. *BMB*
546 *Reports* 2009; 42: 776-787.
- 547 44. Vautier S, Sousa Mda G, Brown G D. C-type lectins, fungi and Th17 responses. *Cytokine*
548 *Growth Factor Rev* 2010; 21: 405-412.
- 549 45. Verdán F F, Faleiros J C, Ferreira L S, Monnazzi L G, Maia D C, Tansine A, et al.
550 Dendritic cell are able to differentially recognize *Sporothrix schenckii* antigens and
551 promote Th1/Th17 response *in vitro*. *Immunobiology* 2012; 8: 788-794.
- 552 46. Zambrano-Zaragoza J F, Romo-Martínez E J, Durán-Avelar Mde J, García-Magallanes N,
553 Vibanco-Pérez N. Th17 cells in autoimmune and infectious diseases. *Int J Inflamm* 2014;
554 DOI: 10.1155/2014/651503.
- 555 47. Zhong X, Gao W, Degauque N, Bai C, Lu Y, Kenny J, et al. Reciprocal generation of
556 Th1/Th17 and T(reg) cells by B1 and B2 B cells. *Eur J Immunol* 2007; 37: 2400-2404.
- 557 48. Zhu J, Paul W E. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res* 2010; 20(1): 4-12.

558 49. Zúñiga L A, Jain R, Haines C, Cua D J. Th17 cell development: from the cradle to the
559 grave. *Immunol Rev* 2013; 252: 78-88.

1 Highlights

- 2
- 3
- 4
- 5 1. *S. schenckii* systemic mice infection upregulates Th17 cells, IL-17 and IL-22.
- 6
- 7 2. The infection is effectively controlled despite the near absence of Th1 cells.
- 8
- 9
- 10 3. Blockade of the Th17 response significantly impaired early fungal control.
- 11
- 12 4. Blockade of the Th17 response didn't affect survival nor late fungal control.
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60
- 61
- 62
- 63
- 64
- 65

Supplementary Figure 1

[Click here to download Supplementary Material: Supplemental Figure 1.docx](#)

Conflict of Interest form

Conflict of interest form.

We wish to confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

We confirm that the manuscript has been read and approved by all named authors and that there are no other persons who satisfied the criteria for authorship but are not listed. We further confirm that the order of authors listed in the manuscript has been approved by all of us.

We confirm that we have given due consideration to the protection of intellectual property associated with this work and that there are no impediments to publication, including the timing of publication, with respect to intellectual property. In so doing we confirm that we have followed the regulations of our institutions concerning intellectual property.

We further confirm that any aspect of the work covered in this manuscript that has involved either experimental animals or human patients has been conducted with the ethical approval of all relevant bodies and that such approvals are acknowledged within the manuscript.

We understand that the Corresponding Author is the sole contact for the Editorial process (including Editorial Manager and direct communications with the office). She is responsible for communicating with the other authors about progress, submissions of revisions and final approval of proofs. We confirm that we have provided a current, correct email address which is accessible by the Corresponding Author and which has been configured to accept email from The Journal of Infection editorial office.