

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO” - UNESP

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Avaliação do perfil da resposta imune por meio do receptor Dectina-1 na esporotriose murina

JULIANA APARECIDA JELLMAYER

ARARAQUARA – SP

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO” - UNESP

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Avaliação do perfil da resposta imune por meio do receptor Dectina-1 na esporotriose murina

JULIANA APARECIDA JELLMAYER

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Campus de Araraquara, para a defesa de Dissertação de Mestrado, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

ARARAQUARA – SP

2015

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

J48a Jellmayer, Juliana Aparecida
Avaliação do perfil da resposta imune por meio do receptor Dectina-1 na esporotriose murina / Juliana Aparecida Jellmayer – Araraquara, 2015
61 f.

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

1. Esporotriose. 2. S.schenckii. 3. Peróxido de hidrogênio. 4. Fagocitose. 5. Óxido nítrico.
6 Citocinas. 7. Dectina-1. I. Iracilda Zeppone Carlos, orient. II. Título.

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida:

Aos meus pais, Claudemir Jellmayer e Ana Lúcia Mangini Jellmayer, que não mediram esforços para a realização de mais esta etapa, vocês são o alicerce da minha vida.

Dedico também as minhas irmãs Jessica Jellmayer e Rainara Jellmayer, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando nos momentos difíceis, e me dando forças para superar as dificuldades.

Ao meu namorado, Tiago Aragoni por me apoiar, compreender meus momentos de ausência e me fazer feliz.

Obrigada por fazerem parte da minha vida!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre estar sempre presente em minha vida, iluminando e guiando meus passos.

À Prof^a Dr^a Iracilda Zeppone Carlos, pelo privilégio de sua orientação, confiança, por me receber em seu laboratório e tornar possível essa conquista acadêmica. A sua experiência e seu conhecimento sempre serão, para mim, referências de profissionalismo. Obrigada principalmente pela sua valiosa amizade.

Ao Prof. Dr. Alexander Batista Duharte, pelas preciosas contribuições, ajuda e apoio que auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho. Muitíssimo obrigada professor!

À Marisa Campos Polesi Placeres por toda ajuda, atenção e importante colaboração. Má, muito obrigada!

Ao companheiro de trabalho Lucas Souza Ferreira pela sua grande ajuda. Valeu, Lucas!

À equipe do Laboratório de Imunologia Clínica: Amanda, Camila, Carol, Damiana, Deivys, Francine, Lucas e Malu, pelos momentos que compartilhamos durante todo esse período. Obrigada galera!

Aos meus pais, Claudemir e Ana Lúcia, por todo incentivo nesta etapa. Obrigada por mais esta oportunidade!

Ao meu namorado, Tiago que estava comigo em todos os momentos, sempre me incentivando e apoiando. Muito obrigada pela sua dedicação, amor e carinho!

Às funcionárias da seção de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara por toda atenção, disponibilidade e paciência.

Á todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que a realização deste trabalho se tornasse possível, meus sinceros agradecimentos.

Muito obrigada a todos!

Sabemos como é a vida: num dia dá tudo certo e no outro as coisas já não são tão perfeitas assim. Altos e baixos fazem parte da construção do nosso caráter. Afinal, cada momento, cada situação, que enfrentamos em nossas trajetórias é um desafio, uma oportunidade única de aprender, de se tornar uma pessoa melhor. Só depende de nós, das nossas escolhas... Não sei se estou perto ou longe demais, se peguei o rumo certo ou errado. Sei apenas que sigo em frente, vivendo dias iguais de forma diferente. Já não caminho mais sozinho, levo comigo cada recordação, cada vivência, cada lição. E, mesmo que tudo não ande da forma que eu gostaria, saber que já não sou a mesma de ontem me faz perceber que valeu a pena.

Procure ser uma pessoa de valor, em vez de procurar ser uma pessoa de sucesso. O sucesso é só consequência.

(Albert Einstein)

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA	8
LISTA DE FIGURAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. <i>Sporothrix schenckii</i>	14
1.2. Esporotricose.....	16
1.3. Resposta imune frente ao <i>Sporothrix schenckii</i>	18
1.4. Receptores que participam no reconhecimento de patógenos.....	21
2. OBJETIVOS.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. Delineamento experimental.....	25
3.2. Modelo experimental.....	25
3.3. Microrganismo e condições de crescimento.....	26
3.4. Infecção dos animais	26
3.5. Avaliação da carga fúngica	26
3.6. Preparação do fungo <i>S. schenckii</i> termo-inativado (SSTI).....	27
3.7. Reversão do fungo <i>S. schenckii</i> para extração do antígeno fúngico.....	27
3.8. Extração dos antígeno fúngico- Fração Alcali-Insolúvel (F1) do fungo <i>S. schenckii</i>	27
3.9. Obtenção do exsudato peritoneal	28
3.10. Avaliação da viabilidade celular de macrófagos	28
3.11. Obtenção do sobrenadante de macrófagos	29
3.12. Análise de fagocitose por macrófagos.....	29
3.13. Produção de H ₂ O ₂	30
3.14. Determinação da produção de óxido nítrico.....	30
3.15. Determinação das citocinas	31
3.16. Determinação da expressão de Dectina-1.....	32
3.17. Análise dos resultados.....	32

4. RESULTADOS	33
4.1. Carga fúngica nos pontos experimentais	33
4.2. Avaliação da viabilidade celular de macrófagos	34
4.3. Análise da fagocitose por macrófagos e produção de H ₂ O ₂	37
4.4. Determinação da produção de óxido nítrico	38
4.5. Determinação das citocinas	40
4.6. Determinação da expressão de Dectina-1	44
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÕES	51
7. REFERÊNCIAS	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

°C – Graus Celsius

µg - Micrograma

µL – Microlitro

µm – Micrómetro

µmols – Micromols

AIDS- Síndrome de Deficiência Imunológica Adquirida, Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

APC – Células apresentadoras de antígenos

BHI – “Brain heart infusion”

CD- Citocalasina D

CEMIB- Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais

CLR – “Lectina-C receptors”

CO₂ – Dióxido de Carbono

CTLD- “C-Type Lectin-Like Domain”

DCs – Células dendríticas

DHR- Dihidrorodamine 123

DP - Desvio padrão

ELISA – “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”

F1 – Fração alcali-insolúvel obtida a partir de leveduras do fungo *S. schenckii*

g - Força gravitacional

g – Grama

G-CSF – fator de estimulação de fagócitos e granulócitos

GM-SCF – fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos

h – hora

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

i.p.- intraperitoneal

IFN- γ - Interferon gama

IL – Interleucina

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

ITAM- Imuno-receptores ativadores baseados em tirosina

LPS – Lipopolissacarídeo

M- molar

M-CSF- fator de estimulação de macrófagos

mg – Miligrama

min – Minutos

mL - Mililitro

mM – Milimolar

MR- Receptores de manose

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio

NaOH - Hidróxido de sódio

NK - “Natural Killer”

NLR- NOD-like

nm - Nanômetro

NO - Óxido Nítrico

PAMPs – “Pathogen-associated molecular patterns”

PBS - Solução salina tamponada de fosfatos

PEC - Células do exsudato peritoneal

pg – Picogramas pmol – Picomol

pH- potencial hidrogeniônico

PRR – “Pattern recognition receptor”

RLR- RIG-I-like

ROS- espécies reativas de oxigênio

Rpm – Rotações por minutos

RPMI- Meios Roswell Park Memorial Institute

SSTI- *Sporothrix schenckii* termo- inativado

SyK- “Spleen tyrosine kinase”

Tc – Linfócitos T citotóxico

TGF- β - “Transforming Growth Factor ”

Th – Linfócitos T helper

TLR – “Toll-like receptor”

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

Treg – Linfócitos T reguladores

UFC- Unidades Formadoras de Colônias

UV - Ultra-violeta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma das atividades desenvolvidas.

Figura 2. Cinética da infecção sistêmica.

Figura 3. Avaliação da toxicidade dos antígenos fúngicos nas culturas de macrófagos peritoneais de camundongos não infectados.

Figura 4. Avaliação da toxicidade dos antígenos fúngicos nas culturas de macrófagos peritoneais de camundongos infectados.

Figura 5. Índice fagocítico (IF) e produção de H_2O_2 dos macrófagos expostos a diferentes estímulos.

Figura 6. Produção de NO pelos macrófagos peritoneais dos camundongos Balb/c.

Figura 7. Determinação da liberação ex-vivo de IL-10.

Figura 8. Determinação da liberação ex-vivo de TNF- α .

Figura 9. Determinação da liberação ex-vivo de IL-1 β .

Figura 10. Determinação da expressão do Receptor Dectina-1 em macrófagos peritoneais.

RESUMO

A esporotricose é uma micose de distribuição universal causada por fungos termodimórficos do complexo de espécies de *Sporothrix schenckii*. A forma mais comum da doença é a linfocutânea que compromete pele, tecido subcutâneo e gânglios linfáticos regionais. Células do sistema imune inato reconhecem patógenos por meio de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs). Dentre esses, podemos destacar a família dos receptores do tipo “Toll-like” (TLRs) e dos receptores de lectina do tipo C (CLRs), os quais possuem membros capazes de reconhecer antígenos fúngicos. A interação entre os PRRs e os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) desencadeia uma série de vias de sinalização envolvidas na modulação da resposta adaptativa subsequente e na potencialização da capacidade fagocítica e microbicida dos macrófagos e de outros fagócitos. A Dectina-1 é um CLR amplamente expresso em macrófagos, células dendríticas e neutrófilos, sendo um receptor para β -glucana implicado no processo de fagocitose, no “burst” oxidativo e na produção de fatores solúveis, tais como citocinas e quimiocinas. O objetivo do presente estudo foi avaliar o papel das β -glucanas, reconhecidas ligantes de Dectina-1, na fagocitose e na produção de intermediários do oxigênio (H_2O_2) e nitrogênio (NO) e de mediadores solúveis por macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c durante a infecção por *S. schenckii* ATCC 16345. Para tanto, os macrófagos foram desafiados com a fração álcali-insolúvel (F1) extraída da parede celular de *S. schenckii*, composta principalmente de β -glucanas, com uma β -1,3-glucana pura comercial ou com o fungo íntegro termo-inativado. Nossos resultados mostraram que tanto a fagocitose das leveduras de *S. schenckii*, como a produção de NO, H_2O_2 e das citocinas IL-10, TNF- α e IL-1 β se dá pelo reconhecimento tanto das β -glucanas como de componentes adicionais presentes na fração F1. Além disso, a expressão de Dectina-1 se mostrou aumentada nos dias 10 e 15 pós-infecção, sugerindo um papel para esse receptor nas respostas desencadeadas durante a infecção por *S. schenckii*.

Palavras-chave: Esporotricose; *S. schenckii*; Peróxido de hidrogênio; Fagocitose; Óxido nítrico; Citocinas; Dectina-1.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a worldwide distributed mycosis caused by thermodimorphic fungi from the *Sporothrix schenckii* species complex. The disease's most common form is the lymphocutaneous, which compromises the skin, subcutaneous tissue and regional lymphatic ganglia. Cells from the innate immune system recognize pathogens through pattern recognition receptors (PRRs). Among these, the toll-like (TLRs) and C-type lectin (CLRs) receptors can be highlighted for having members capable of recognizing fungal antigens. The interaction between PRRs and pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) triggers various signaling pathways involved in modulating the following adaptive response and in potentiating the phagocytic and microbicidal capabilities of macrophages and other phagocytes. Dectin-1 is a widely expressed CLR in macrophages, dendritic cells and neutrophils, being a receptor for β -glucan implicated in the phagocytic process, the oxidative burst, and in the production of soluble mediators such as cytokines and chemokines. The present study was aimed at assessing the role of β -glucans, known Dectin-1 ligands, in the phagocytosis and production of soluble mediators, oxygen (H_2O_2), and nitrogen (NO) intermediates by peritoneal macrophages from Balb/c mice during infection with *S. schenckii* ATCC 16345. In order to do that, the macrophages were challenged with the alkali-insoluble fraction (F1) extracted from the *S. schenckii* cell wall, which is mainly composed of β -glucans, with a purified commercial β -1,3-glucan, or with whole heat-killed *S. schenckii* yeasts. Our results showed that phagocytosis of the *S. schenckii* yeasts, as well as production of NO, H_2O_2 , and the cytokines IL-10, TNF- α and IL-1 β occur by the recognition of both the β -glucans and other additional components found in the F1 fraction. Furthermore, Dectin-1 expression was augmented on days 10 and 15 post-infection, suggesting a role for this receptor in triggering the immune response during the *S. schenckii* infection.

Keywords: Sporotrichosis; *S. schenckii*; Hydrogen peroxide; Phagocytosis; Nitric oxide; Cytokines; Dectin-1.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Sporothrix schenckii*

O *Sporothrix schenckii* é um fungo termodimórfico, pertencente ao complexo *Sporothrix* (Lopez-Romero *et al.*, 2011). Estudos moleculares demonstraram que o complexo *Sporothrix* é constituído de pelo menos seis espécies, discriminadas filogeneticamente, como *S. brasiliensis*, *S. schenckii stricto sensu*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. pallida* e *S. luriei* (Marimon *et al.*, 2006; Marimon *et al.*, 2007; Marimon *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2014). Pertencem à subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Hyphomycetes* (Kwon-Chung & Bennett, 1992) e estão amplamente distribuídos na natureza, sendo associados ao solo, matéria orgânica em decomposição, plantas e com objetos contaminados (Lacaz *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2015). Por esse motivo, a doença está relacionada com certas profissões como: florista, jardineiro, fazendeiros, caçadores, veterinários (Sidrim & Rocha, 2004). A transmissão da esporotricose geralmente ocorre pela inoculação traumática do fungo na pele a partir de uma fonte infectante (Rippon, 1988; Chakrabarti *et al.*, 2015), presente no ambiente, fômites ou através da arranhadura e mordedura de gatos doentes ou subclínicos, que podem carrear o fungo em suas unhas, cavidade oral e lesões ricas em formas leveduriformes (Barros *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2006). Após inoculação, ocorre um período de incubação do fungo que dura de sete a trinta dias, podendo chegar até seis meses (Sidrim & Rocha, 2004). O Brasil, além de ser um dos países com maior taxa de incidência, a doença tem-se tornado uma importante zoonose (Rodrigues *et al.*, 2015; Gremião *et al.*, 2014).

Os felinos desempenham importante papel na epidemiologia da doença, podendo servir como fonte de infecção secundária do fungo (Madrid *et al.*, 2011, Nobre *et al.*, 2001b). Ocorre principalmente em felinos machos não castrados e de vida livre (Madrid *et al.*, 2010b; Madrid *et al.*, 2011; Schubach *et al.*, 2004), fato diretamente relacionado a hábitos comportamentais dos felinos, como a arranhadura de árvores, escavação do solo para cobrir suas fezes (Reis-Gomes *et al.*, 2012).

Há alguns anos diversos trabalhos têm relatado e pesquisado a variabilidade de virulência do complexo *Sporothrix*, no entanto ainda não está bem elucidado se isto ocorre devido às diferentes espécies ou se é atribuível aos diferentes isolados da mesma espécie (Romeo & Criseo, 2013). O que se sabe é que os fatores de patogenicidade mais descritos são presença de melanina, termotolerância, enzimas extracelulares (proteínases e fosfatases), e alguns componentes da parede celular, como por exemplo, a ramnose (Fernandes *et al.*, 1999; Lacaz *et al.*, 2002; Barros *et al.*, 2011).

Em relação à melanina, já foi demonstrado que a sua presença confere ao agente proteção celular a danos químicos e físicos, provavelmente através do sequestro de radicais livres que dificulta a ação dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Dixon; Ducan; Hurd, 1992, Romero-Martinez *et al.*, 2000; Nobre *et al.*, 2004).

Por sua característica termodimórfica o fungo *Sporothrix schenckii* cresce em duas formas: a forma miceliana (25°C), encontrada no ambiente e infectante, e a forma de levedura (37°C), que é invasiva, produzindo infecções nos órgãos e tecidos. O dimorfismo entre as fases é influenciado por fatores como a mudança de meio de cultura, aeração, tensão de dióxido de carbono (CO₂), pH, presença de fontes de carbono, presença de cátions divalentes, contudo, o fator determinante para o dimorfismo do complexo *S. schenckii* é a temperatura (Lopes-Bezerra, Schubach, Costa, 2006; Fernandes *et al.*, 2013).

As enzimas extracelulares produzidas pelo *S. schenckii*, como as proteinases, desempenham importante função na invasão tecidual, provocando a lise do estrato córneo, colágeno tipo I e elastina da pele, permitindo desta forma, o desenvolvimento fúngico. As fosfatases ácidas influenciam na interação das células leveduriformes com macrófagos, além de atuarem na membrana celular, catalisando e liberando fosfato das fosfoproteínas (Arnold *et al.*, 1986; Yoshiike *et al.*, 1993; Hogan; Klein; Levitz, 1996; Lima *et al.*, 1999). Os fatores de virulência relacionados ao agente favorecem a invasão tecidual e dificultam a resposta imune, propiciando a instalação e permanência do microrganismo no hospedeiro (Hogan; Klein; Levitz, 1996; Nascimento; Almeida, 2005; Lopes-Bezerra; Schubach; Costa, 2006).

A camada externa da parede celular do *S. schenckii* contém muitos polímeros como peptídeos-ramnomanas e poucos com galactose. As frações antigênicas como a peptídeo-ramnomana foram isoladas das células leveduriformes do *S. schenckii* e têm capacidade de estimular a atividade mitogênica dos linfócitos (Lloyd; Bitton, 1971; Carlos *et al.*, 1999). A parede celular de *S. schenckii* consiste em glucanas alcalinas solúveis e insolúveis, encontradas nas fases morfológicas deste fungo. Dependendo da fonte, existem claras diferenças na estrutura macromolecular das β -glucanas (Volman; Ramakers; Plat, 2008). Seu modo de atuação é dependente da massa molecular, conformação, solubilidade e também do grau e posicionamento de suas ramificações (Chan; Chan; Sze, 2009). Em geral, os originários de plantas são primariamente lineares e possuem ramificações com ligações do tipo β (1-4), enquanto que os provenientes da parede celular de fungos e leveduras consistem de um esqueleto conservado de unidades de β (1-3) D-glucopirasonil com ramificações do tipo β (1-6) de diferentes tamanhos e posições (Sonck *et al.*, 2010; Xiao; Trincado; Murtaugh, 2004).

A identificação dessa classe de fungos deve ser feita mediante a comprovação de seu dimorfismo a partir da mudança de temperatura de incubação das colônias. Deve haver a conversão a forma leveduriforme quando incubadas a 35°C (Koneman *et al.*, 1997). O meio de cultura utilizado para o isolamento do *S. schenckii* é geralmente Agar Sabouraud acrescido ou não de nutrientes, antibacterianos (penicilina, estreptomicina, cloranfenicol) ou de antifúngicos como a cicloheximida. Também são utilizados para cultivo outros meios como Agar fubá, infusão cérebro-coração (BHI) e Agar batata crescendo bem de três a cinco dias após o cultivo (Know-Chung; Bennett, 1992; Lacaz *et al.*, 2002).

Os isolados do complexo *S. schenckii* quando cultivados a 25°C produzem colônias de coloração inicialmente creme, posteriormente se tornando marrons escuras ou cinzas com superfície plana a rugosa e aspecto aveludado a membranosos, a essa temperatura microscopicamente apresentam hifas finas, hialinas, septadas e ramificadas com conídios hialinos piriformes no ápice dos conidióforos e ao redor das hifas (Lacaz *et al.*, 2002). Quando cultivados a 37°C as colônias são lisas, cremosas e de coloração creme e caracterizadas microscopicamente por células ovais a alongadas (Lacaz *et al.*, 2002; Lopes-Bezerra, Schubach, Costa, 2006).

1.2. Esporotricose

A esporotricose é uma micose de evolução subaguda e crônica de lesões nodulares cutâneas ou subcutâneas e, com menor frequência disseminada em pessoas com comprometimento imunológico (Barros *et al.*, 2011). A esporotricose é uma micose subcutânea zoonótica, causada por espécies fúngicas do complexo *Sporothrix schenckii*, encontrado em matérias orgânicas e plantas, com predileção por regiões de clima subtropical, temperado e úmido (Lacaz *et al.*, 2002; Lopes-Bezerra *et al.*, 2006).

A esporotricose foi descrita pela primeira vez em 1898, por Benjamin Schenk nos Estados Unidos (Barros *et al.*, 2010). Casos de esporotricose têm sido reportados em todos os continentes, porém as regiões tropicais e subtropicais com alta temperatura e umidade exibem a maior incidência, principalmente na América Latina, Japão, Índia e África do Sul (Carrada-Bravo e Olvera-Macias, 2013; Bonifaz e Velázquez, 2010; La Hoz; Baddley, 2012). No Brasil, o primeiro caso de esporotricose em humanos foi descrito em 1907 por Lutz e Splendore e desde então um aumento considerável de casos clínicos, em particular, nos últimos 15 anos tem se evidenciado fundamentalmente no Rio de Janeiro onde a doença tem assumido proporções epidêmicas alarmantes (Rodrigues *et al.*, 2013), acometendo regiões com dificuldades socioeconômicas e ambientais, envolvendo a transmissão por gatos infectados (Barros *et al.*,

2010; Schubach *et al.*, 2008). A causa mais comum de infecção é por traumas sofridos na pele, por onde o fungo é inoculado ou muito raramente por inalação (Fernandes *et al.*, 1999; Morris-Jones, 2002; Barros *et al.*, 2010). A transmissão secundária aos ossos, articulações e músculos não é frequente em pacientes com imunidade preservada (Barros *et al.*, 2010). 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). Foram reportados dois casos de pacientes com HIV que desenvolveram meningite por *S. schenckii* associada à síndrome inflamatória da reconstituição imune (Galhardo *et al.*, 2010). Após a inoculação da forma filamentosa de fungos do complexo *S. schenckii* no organismo, inicia-se a conversão dos conídios para leveduras (Meyreles & Nascente, 2009; Schubach, Schubach, 2000).

A sua apresentação clínica é muito variada, observa-se desde nódulos isolados a lesões múltiplas disseminadas. Mais raramente invadem mucosas, músculos, ossos e órgãos internos. A esporotricose em sua forma subcutânea, que é a mais comum entre elas, não altera o estado geral do paciente e a evolução é benigna, respondendo favoravelmente a terapia. A evolução para óbito é rara (Esteves *et al.*, 1990).

As manifestações clínicas da doença se resumem em esporotricose cutânea (localizada e cutânea linfática), esporotricose invasiva (disseminada, osteoarticular, pulmonar) e sistêmica. As formas clínicas mais comumente encontradas são a cutânea linfática e a cutânea localizada, correspondendo a 90% do total dos casos (Zaitz *et al.*, 2010; Vasquez-del-Mercado *et al.*, 2012). A forma cutânea linfática se inicia com um nódulo ou lesão ulcerada no local da inoculação do fungo na pele e segue o trajeto linfático com nódulos que ulceram e fistulam, com o passar do tempo. Essa característica clínica é o motivo de também ser chamada de linfangite ascendente nodular (Lopes-Bezerra *et al.*, 2006). Ou seja, a partir da lesão inicial, seguindo trajeto ascendente nos membros, aparecem nódulos indolores, ao longo dos vasos linfáticos, que podem ulcerar (Zaitz *et al.*, 2010).

A forma cutânea localizada é caracterizada por uma lesão única no local da inoculação do fungo, que não acompanha o trajeto linfático. Essas lesões podem ter inúmeras morfologias, como pápulas que pustulizam e ulceram, abscessos, placas achatadas, lesões eritematosas (Zaitz *et al.*, 2010). Nesse caso, o diagnóstico diferencial deve ser realizado entre as chamadas síndromes verrucosas, que são a leishmaniose, cromomicose, tuberculose verrucosa e psoríase (Lopes-Bezerra *et al.*, 2006; Zaitz *et al.*, 2010).

A esporotricose invasiva pode acometer qualquer tecido ou órgão. Ocorre principalmente em indivíduos imunocomprometidos, nos pulmões e ossos, em sua grande maioria. Já a

sistêmica, também associada a imunodepressão em pacientes com AIDS, acomete olhos e nariz (Zaitz *et al.*, 2010). A forma cutânea disseminada é menos frequente. Está associada a algum tipo de imunodepressão, como AIDS, alcoolismo, idade avançada, Diabetes, uso prolongado de corticoides, e frequentemente associada à forma extra cutânea ou sistêmica (Sidrim & Rocha, 2004; Freitas *et al.*, 201; Freitas *et al.*, 2014).

A esporotricose apresenta um impacto significativo na saúde pública, seja de ordem econômica que leva a perdas de dias de trabalho e custos com saúde pública ou devido aos custos relacionados a perdas pessoais e psicológicas causadas pela doença (Barros *et al.*, 2010).

1.3. Resposta imune frente ao *Sporothrix schenckii*

Apesar da sua especificidade restrita em comparação com o sistema imunitário adaptativo, o sistema imune inato é capaz de distinguir com eficácia células hospedeiras a partir de agentes patogênicos e serve como uma primeira linha de defesa capaz de reagir rapidamente a estímulos. Nos últimos anos, o conhecimento ampliado sobre a complexidade dos receptores e do papel central que as células imunitárias inatas desempenham em fornecer os sinais que desencadeiam e dirigem a resposta imune adaptativa trouxe uma atenção especial para o assunto (Abdelsadik e Trad 2011). Na resposta imune frente aos agentes fúngicos, os fagócitos são atraídos quimiotaticamente para o local da infecção e se ligam ao fungo através de numerosos receptores. Se a membrana for ativada pelo agente infeccioso ligado a ela, este será englobado pelo fagossoma com auxílio de pseudópodos que o envolverão. Dentro da célula, lisossomas se fundirão ao fagossoma formando o fagolisossoma destruindo o agente em uma seqüência de mecanismos tais como pelo sistema da mieloperoxidase, cuja enzima penetra no fagossoma atuando nos peróxidos na presença de halídios, preferencialmente o iodeto, gerando então, outros oxidantes tóxicos como hipo-halitos (Male; Roit, 1994; Rook, 1994).

A regulação da função dos fagócitos na resposta imune a infecções fúngicas está ligada às citocinas como fator de estimulação de fagócitos e granulócitos (G-CSF), fator de estimulação macrófago-granulócito (GM-CSF), fator de estimulação de macrófagos (M-CSF), interferon (IFN- γ), interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF- α). O GM-CSF e o G-CSF atuam aumentando a atividade fagocítica e oxidativa dos polimorfonucleares contra as estruturas fúngicas; o M-CSF modula a função dos fagócitos como a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e aumenta a produção de IL-1, IFN- γ e TNF- α . O IFN- γ aumenta a função de polimorfonucleares e monócitos contra o fungo, a IL-1 tem funções múltiplas, induzindo a relação das citocinas e o TNF- α aumenta a produção de outras citocinas e a função dos polimorfonucleares (Roilides, *et al.*, 1998).

Os lipídios obtidos a partir da parede celular de *S. schenckii* na interação macrófagos/fungo desempenham um papel importante na patogênese desta micose, inibindo o processo de fagocitose e induzindo a elevada produção de óxido nítrico (NO) e de TNF- α (Carlos *et al.*, 2003).

As citocinas pró-inflamatórias podem influenciar na liberação de NO, que é sintetizado através da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em macrófagos ativados. A enzima iNOS é induzida por várias citocinas, incluindo a IL-1 β , TNF- α e IFN- γ . Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que a resposta imune celular é deprimida entre a quarta e sexta semana de infecção, quando é possível observar um aumento na multiplicação fúngica, em animais experimentais, indicando um agravamento da doença. Essa depressão na imunidade pode em parte ser devido à produção aumentada de IL-1 e TNF- α pelos macrófagos ativados, prejudicando assim a amplificação da resposta imune (Carlos *et al.*, 1992; 1994; Carlos *et al.*, 1999; Maia *et al.*, 2006).

O sistema imune adaptativo, sob estimulação do sistema imune inato, desempenha um papel crucial na resposta imune, com participação imprescindível das células B e T. Estas últimas compreendem os tipos citotóxico (células Tc) e “helper” (células Th), as quais, por sua vez, podem sofrer diferenciação para diversos fenótipos com ações efetoras ou de memória. Os diferentes fenótipos de Th são o resultado da ativação das células T “naive” frente a diferentes estímulos (Noben-Trauth, 2000). Os clones Th se diferenciam em quatro categorias distintas, com base no padrão de citocinas produzidas por cada subpopulação. As células Th1 produzem IFN- γ , IL-2, TNF- α , e são eficientes na eliminação de patógenos intracelulares, via ativação de macrófagos. As células Th2 liberam IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que ativam a imunidade humoral e são secretadas de maneira acentuada na presença de antígenos persistentes (Rengarajan *et al.*, 2000). Foi descrito também um novo fenótipo de linfócitos T designado por Th17. Estas células produzem essencialmente IL-17, IL-6 e estão associadas ao desenvolvimento de respostas inflamatórias e possível proteção do hospedeiro contra bactérias intracelulares e fungos (Weaver *et al.*, 2007). Sabe-se que o IFN- γ regula negativamente a diferenciação de células Th17 e a produção da IL-23 (uma citocina importante para a expansão das células Th17), enquanto que TGF- β (fator de crescimento transformante beta) juntamente com IL-6, estimula a diferenciação de células Th17 (Korn *et al.*, 2007). As células TCD4⁺ regulatórias (Treg) suprimem a resposta imune pela secreção de elevados níveis de TGF- β , uma citocina imunossupressora que também pode inibir a secreção de citocinas Th1, com quantidades variáveis de IL-4 e IL-10. Estas citocinas auxiliam no equilíbrio entre proteção e progressão de doenças (Wang *et al.*, 2003; Mcgeachy & Cua, 2008).

As células Th17 apresentam a capacidade de produzir caracteristicamente IL-17A, embora produzam também IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26, GM-CSF e, potencialmente, TNF- α e IL-6 (Korn *et al.*, 2009; Romagnani *et al.*, 2009). A IL-21 produzida pelas próprias células Th17 atua como um fator de crescimento, enquanto a IL-23 proveniente de macrófagos e células dendríticas tem sido reportada como responsável pela manutenção e amplificação de células Th17 já diferenciadas (Romagnani *et al.*, 2009; Van De Veerdonk *et al.*, 2009), funcionando, talvez, como fator de sobrevivência destas células (Mcgeachy & Cua, 2008).

A função primária das células Th17 parece ser a eliminação de patógenos com os quais as células Th1 e Th2 não conseguem lidar adequadamente. São potentes indutoras de inflamação tecidual e têm sido implicadas na patogênese de muitas doenças autoimunes e condições inflamatórias (Korn *et al.*, 2009). Patógenos tão distintos como bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, *Mycobacterium tuberculosis* e fungos como *Pneumocystis carinii* e *C. albicans* podem todos desencadear uma forte resposta Th17 (Beadling & Slifka, 2006). Em infecções fúngicas as células Th17 provocam, em murinos, uma resposta inflamatória caracterizada não apenas pela presença de células mononucleares, mas também de neutrófilos (Romagnani *et al.*, 2009).

Trabalhos realizados no nosso grupo de pesquisa demonstraram que, o reconhecimento de *S. schenckii* por células dendríticas (DCs) leva ao desenvolvimento de uma resposta Th1/Th17 *in vitro* (Verdan *et al.*, 2012). Demonstrou-se, pela primeira vez, que a infecção por *S. schenckii* em camundongos induz o desenvolvimento de células Th17 e Th1/Th17 mistas *in vivo*, assim como a liberação antígeno-específica de IL-17 e IL-22 *ex vivo* (Ferreira *et al.*, 2015).

Existe controvérsia em relação à importância da imunidade humoral na proteção contra patógenos fúngicos, mas estudos indicaram que ambas as respostas imunológicas, mediadas por anticorpos e por células, contribuem na proteção contra *Candida albicans*, *Sporothrix schenckii* e *Cryptococcus neoformans* (Casadevall *et al.*, 1998; Nascimento; Almeida, 2005).

Na esporotricose humana o título de anticorpos contribui para diagnóstico e para monitorar respostas ao tratamento (Roberts; Howard, 1971; Welsh; Dolan, 1973; Casserone *et al.*, 1983; Donadel *et al.*, 1993). Os títulos de anticorpos variam entre esporotricose sistêmica, articular, pulmonar e cutânea, sendo maiores na forma pulmonar e articular, devendo-se levar em conta que no caso da doença sistêmica os títulos podem ter variações diretamente ligadas à capacidade imunológica do paciente (Roberts; Howard, 1971; Casserone *et al.*, 1983; Fisher; Cook, 2001). O prognóstico da esporotricose é benigno conforme extensão e tempo de duração da doença. As formas viscerais, que são mais raras, têm evolução grave e podem levar a óbito (Esteves *et al.*, 1990).

1.4. Receptores que participam no reconhecimento de patógenos

Atualmente, são descritos pelo menos quatro grandes famílias de PRRs (“Pattern Recognition Receptors”), que operam de forma cooperativa para reconhecer patógenos e sinais de stress produzidos pelas células durante infecção ou injúria celular: 1) receptores de lectina C (CLRs), como Dectina-1 e Dectina-2, “DC-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin” (DC-SIGN), mincle e receptor de manose; 2) receptores semelhantes a NOD (domínio de oligomerização e ligação de nucleotídeo), como o inflamassomo NALP3; 3) receptores scavenger (CD5 e CD36) e 4) fundamentalmente a família de receptores parecido a “Toll-like” (TLR), considerada a maior classe de reconhecimento inato em vertebrados (Netea *et al.*, 2006; Levitz, 2010, Romani, 2011).

Estudos no nosso grupo têm abordado alguns dos PRRs implicados no reconhecimento de *S. schenckii*, identificando-se o papel dos componentes da parede deste fungo. Utilizando camundongos C3H/HeJ, deficientes no receptor TLR-4, foi avaliado o papel deste receptor durante 10 semanas de infecção com *S. schenckii*. A produção de NO, TNF- α e IL-10 foi diminuída nos camundongos C3H/HeJ, demonstrando que o TLR-4 está envolvido no reconhecimento de frações lipídicas na parede celular *S. schenckii* (Sassá, *et al.*, 2009; 2012). O receptor TLR-2 também participa no reconhecimento de componentes da parede celular de *S. schenckii*, sendo que outros estudos demonstraram que os macrófagos obtidos de camundongos “knockout” para o receptor TLR-2 (TLR2^{-/-}) apresentaram diminuição tanto na fagocitose como na produção de TNF- α , IL-1 β , IL-2 e IL-10 quando estimulados em cultura com os antígenos solúveis e lipídicos da parede celular do fungo, indicando a importância desse receptor no reconhecimento desse fungo. O mesmo grupo também demonstrou que a produção de IL-17 foi independente de TLR-2 apresentando alta produção deste mediador quando comparados aos animais selvagens, portando o receptor TLR-2 (Negrini *et al.*, 2013).

O receptor Dectina-1 é uma CLR expressa em macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (Cambi; Koopman; Fidgor, 2005). Dectina-1, também conhecida como CLEC7A, é uma proteína transmembrana tipo II classificada como uma lectina do tipo C não clássica pertencente ao grupo V que contém um único CTLD (“C-Type Lectin-Like Domain”) na região extracelular e um imunoreceptor de ativação baseada em tirosina. Em sua estrutura estão ausentes os resíduos envolvidos na ligação com cálcio, que geralmente são necessários para a ligação a carboidratos (Olynych *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2002; Willment *et al.*, 2005). O “splicing” alternativo determina a presença ou ausência de uma haste (que liga o CTLD a região transmembranica) que também dá origem a múltiplas isoformas menores. As diferenças

subjacentes, a expressão da isoforma específica e função são claras, embora haja evidências de que a isoforma apresente funções específicas relacionadas ao sistema murino (Heinsbroek *et al*, 2006; Jimenez *et al*, 2008). O mecanismo pelo qual a Dectina-1 reconhece carboidratos ainda não é claro, embora tenha sido mostrado ser independente de cálcio, ao contrário de muitos outros CLRs. Dectina-1 também pode reconhecer outras moléculas não identificadas, incluindo um ligante endógeno em células T e um ligante de micobactérias. Por estimulação do ligante, a Dectina-1 media a sinalização intracelular, através do seu motivo ITAM (imuno-receptores ativadores baseados em tirosina) semelhante, e foi a primeira PRR não-TLR (não-“Toll-like” Receptor) mostrando esta capacidade (Brown, 2006). Esta sinalização em parte é mediada por Syk (“Spleen tyrosine kinase”). O mecanismo de sinalização está relacionado com CLR, CLEC-2 (“C-type lectin-like receptor”), isso pode ajudar a explicar algumas lacunas (Hughes *et al*; 2010; Severin *et al*., 2011). O PAMP (“Pathogen-associated molecular patterns”) identificado para Dectina-1 é a β -glucana, um carboidrato encontrado nas paredes celulares de fungos e algumas bactérias e plantas (Brown, 2006). O receptor β -glucana pode mediar várias funções celulares através do seu domínio de sinalização citoplasmática incluindo a fagocitose, a explosão respiratória, e a produção de fatores solúveis, tais como citocinas e quimiocinas (Hernandez-Santos *et al.*, 2012). Os receptores Dectina-1 e suas vias de sinalização intracelular são agora reconhecidos desempenhando um papel importante na condução destas e de outras respostas imunológicas protetoras antifúngicas. CLRs são necessários para o reconhecimento e a ingestão de fungos pelos fagócitos, a indução de mecanismos efetores antimicrobianos e de mediadores inflamatórios, direcionando e modulando a imunidade adaptativa, incluindo as respostas Th17 (Hernandez-Santos *et al.*, 2012).

Dectina-1 tem se mostrado um desencadeador de fagocitose e produtor de espécies reativas de oxigênio (ROS), em resposta a zymosan em macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (Bauer *et al.*, 2008; Brown, 2001). A capacidade de influenciar PRRs na imunidade adaptativa tem sido de grande interesse, e o estudo da Dectina-1 tem proporcionado novas perspectivas particularmente sobre o desenvolvimento das respostas Th17. A atuação da Dectina-1 na resposta antifúngica ainda é incerta. Várias controvérsias têm surgido em torno do papel de Dectina-1 *in vivo* e suas interações com fungos. A importância da Dectina-1 foi exemplificada em estudos que mostraram sua participação também no controle da imunidade anti-fúngica nos seres humanos (Lliev Id, *et al.*, 2012). Loures *et al.*, 2014, descreve que camundongos C57BL / 6 dectin-1 deficiente são altamente suscetíveis à infecção pelo *P. brasiliensis*. Estes animais são ineficientes na ativação dos macrófagos na fase inata e deficientes na resposta imune adaptativa T helper-17 (Th17). Também demonstraram que dectin-1 exerce

um efeito sinérgico com receptor de manose (MR) e TLR 4 na diferenciação de linfócitos Th17 e T citotóxico-17 induzidas por DCs estimulada com *P. brasiliensis* (Loures *et al.*, 2015).

Um estudo com ratos co-infectados com *Taenia*, *Taenia* e *S. schenckii* ou infectado com *S. schenckii* sozinho, revelou que no grupo co-infecção houve uma expressão elevada do receptor Dectina-1 nas lesões cutâneas detectado por coloração imuno-histoquímica das lesões na pele, mas no grupo a infecção por *S. schenckii* esta expressão não foi observado. Os autores deste estudo concluíram que *S. schenckii* tem um padrão diferente de reconhecimento molecular e evoca outros do que Dectina -1 e IL-17 mecanismos anti- infecção (Zhang *et al.* , 2012) . Em contraste, um estudo recente do nosso grupo utilizando um modelo de infecção em camundongos evidenciou que Th17 é importante para eliminação da infecção por *S. schenckii* (Ferreira *et al.*, 2015). Deste modo, os mecanismos de Dectina-1 dependente da produção de IL-17 durante a infecção fúngica tem sido demonstrada (Werner *et al.*, 2011).

As infecções fúngicas causam prejuízos significativos nos seres humanos e são um problema crescente devido ao aumento da utilização de antifúngicos de amplo espectro e terapias imunossupressoras (Veerdonk *et al.*, 2015). O mecanismo de defesa e suscetibilidade do organismo pelo fungo *S. Schenckii* ainda não são bem elucidados, por isso a importância de se estudar os mecanismos imunes desencadeados pela esporotricose. Considerando a crescente incidência de casos de esporotricose, torna-se relevante conhecer a participação do receptor Dectina-1 na infecção com o fungo *S. Schenckii*.

2. OBJETIVOS

O estudo tem como objetivo avaliar a presença do receptor Dectina-1 em macrófagos peritoneais a partir de modelo murino de esporotricose, buscando elucidar ferramentas da resposta imune inata para melhor compreensão da resposta do hospedeiro. Para tanto serão estudados no curso da infecção fúngica:

- ❖ A participação de antígeno fúngico 1,3 β - glucana comercial, da fração álcali-insolúvel (F1) e *S. schenckii* termo-inativado (SSTI) no desencadeamento de resposta imune avaliando a produção de H₂O₂, fagocitose, NO, IL-10, TNF- α e IL-1 β na esporotricose murina.
- ❖ A presença do receptor Dectina-1 em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

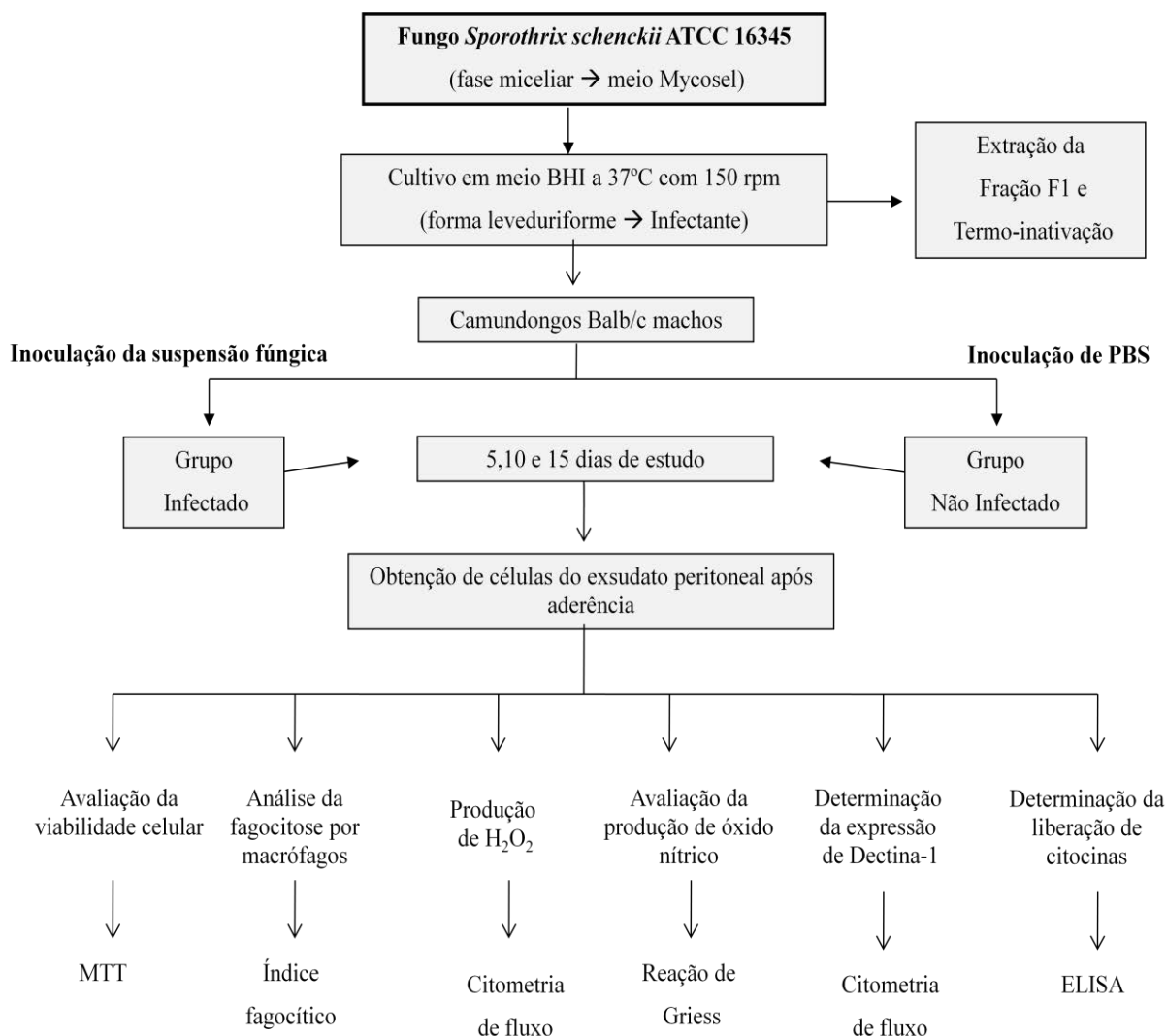


Figura 1. Fluxograma das atividades desenvolvidas. Camundongos Balb/c infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii* durante os dias 5, 10 e 15 foram avaliados em diversos parâmetros imunológicos conforme descrito no fluxograma das atividades desenvolvidas.

3.2. Modelo experimental

Foram utilizados camundongos isogênicos Balb/c, machos pesando 18-25g, com aproximadamente quatro a seis semanas de idade, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) de Campinas, SP. Estes animais foram mantidos em gaiolas, em condições ambientais estáveis. Os grupos de estudo consistiram de 12 animais não infectados e 12 animais infectados com o fungo *S. schenckii*, que foram eutanasiados em três pontos específicos da infecção, para coleta das células do exsudato peritoneal e baço. Todos os

procedimentos foram realizados de acordo com as regras da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, Parecer Comitê de Ética nº 24/2014.

3.3. Microrganismo e condições de crescimento

A cepa de *Sporothrix schenckii* ATCC 16345, cedida pela Fundação Oswaldo Cruz e originalmente obtida de um caso humano de infecção pulmonar difusa (Baltimore, MD) foi utilizada neste estudo. O fungo foi mantido em sua forma miceliar a 25 °C em meio de cultura sólido Mycoseltm (BD Biosciences). Para obtenção da forma leveduriforme, a massa de crescimento fúngico em forma miceliar foi transferida para meio líquido BHI (Difco) e cultivada a 37 °C sob agitação constante de 150 rpm por um período de 12 dias.

3.4. Infecção dos animais

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), cultivada por 7 dias 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 90%.

Cada animal foi inoculado intraperitonealmente (i.p.) com 200µL desta suspensão. Posteriormente, foram eutanasiados em três períodos específicos de 5, 10 e 15 dias após a infecção, sendo acompanhada pela determinação das unidades formadoras de colônias (UFC).

3.5. Avaliação da carga fúngica

A avaliação da carga fúngica sistêmica foi avaliada por meio da contagem das unidades formadoras de colônia (UFC), o baço foi assepticamente removido em câmara de fluxo laminar e passado através de uma malha de nylon com poros de 100µm e em seguida tratado com solução de cloreto de amônio 0,17M para lise das hemácias. Uma alíquota da suspensão celular assim obtida foi diluída e plaqueada em placas de Petri contendo meio Mycoseltm (BD Biosciences). As placas foram checadas para a contagem de UFC após 3 e 7 dias de incubação à temperatura ambiente.

3.6. Preparação do fungo *S. schenckii* termo-inativado (SSTI)

Como estímulo antígeno-específico para a reestimulação *ex vivo* das células do exsudato peritoneal foram utilizadas leveduras termo-inativadas de *S. schenckii*, segundo Baronetti *et al*, 2009. O SSTI foi preparado 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 3.4. As leveduras foram separadas do sobrenadante por centrifugação a 200 xg em temperatura ambiente e em seguida lavadas duas vezes com 8 mL 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).

3.7. Reversão do fungo *S. schenckii* para extração do antígeno fúngico

Após a proliferação do fungo *S. schenckii*, em sua fase miceliar, uma amostra do tapete fúngico foi transferida para um erlenmeyer contendo 100 mL de meio BHI (caldo), este foi colocado sob agitação no shaker por 7 dias. Após esse período foi transferido 12,5 mL do meio para um tubo cônico e centrifugado por 5 minutos à 2000 rpm, posteriormente foi transferida a massa fúngica para um erlenmeyer contendo 250 mL de meio BHI, que foi colocado sob agitação no shaker por 7 dias. Após esse período foi transferido 50 mL do meio para um tubo cônico e centrifugado por 5 minutos à 2000 rpm, posteriormente foi transferida a massa fúngica para um erlenmeyer contendo 1000 mL de meio BHI, que permaneceu sob agitação no shaker por 7 dias. Após esse período foi realizada a extração dos antígenos.

3.8. Extração dos antígeno fúngico- Fração Álcali-Insolúvel (F1) do fungo *S. schenckii*

Após a extração do lipídio segundo Kanetsuna *et al.*, (1969), continuou-se a extração da fração F1 (resíduo seco). Para realizar o procedimento foi necessário diluir o resíduo seco em NaOH na proporção de 50 mg/mL. A solução foi agitada por 2 horas em béquer com agitador

magnético. Após esse período, o sobrenadante foi estocado em geladeira. O resíduo restante foi re-suspendido em NaOH 1N, repetindo esse procedimento 4 vezes. O produto residual das 4 repetições foi centrifugado várias vezes com água destilada até ser neutralizado (pH 7,0), o sobrenadante da lavagem foi descartado. O resíduo foi tratado com etanol / acetona / éter etílico para secagem. O resíduo de cada solvente foi homogeneizado separadamente. Posteriormente colocou-se em uma placa de Petri para secagem. Depois de seco, foi pesado e armazenado em geladeira (CARLOS *et al.*, 1999).

3.9. Obtenção do exsudato peritoneal

Os animais, infectados e controle, nos dias 5, 10 e 15 da infecção, foram previamente inoculados com 3 mL de tioglicolato de sódio a 3%, três dias antes de serem eutanasiados em câmara de CO₂. A pele da região abdominal foi retirada assepticamente em câmara de fluxo laminar classe 100 e o peritônio exposto. Foram inoculados 5 mL de PBS pH 7,4 estéril gelado na cavidade abdominal, aplicando-se leve massagem para estimular a liberação das células. O líquido resultante foi colhido com auxílio de agulha e seringa, transferido para tubo cônico estéril de 15 mL e centrifugado a 400 xg por 5 min. O sedimento celular foi lavado 3 vezes com 3 mL de PBS, sendo ressuspendido após a última lavagem em 1 mL de meio de cultura RPMI-1640, para a contagem de células em câmara de Neubauer. As suspensões celulares foram então ajustadas para a concentração de 5×10^6 células/mL para a realização dos testes propostos.

3.10. Avaliação da viabilidade celular de macrófagos

Em placa de microtitulação de 96 cavidades de fundo plano (Corning, Inc.) foram distribuídos 100 µL por cavidade das suspensões de células do exsudato peritoneal de animais infectados e normais, ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL em meio de cultura RPMI-1640-C em presença de 100 µL de antígeno F1 nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL, β-glucana comercial (Sigma) nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL, SSTI, LPS (lipopolissacarídeo bacteriano, *E. coli*- 0111:B4- Sigma L2630) e somente o meio de cultura RPMI-1640-C, em duplicata. As placas foram incubadas por 24 h a 37° C em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific). Após esta incubação as células aderentes foram tratadas com 100 µL de uma solução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio), (Across Organics) a 0,5 mg/mL em RPMI-1640. A placa foi incubada por mais 3 horas nas mesmas condições anteriores. Após esta incubação os sobrenadantes foram descartados e as células aderentes tratadas com 100 µL de isopropanol (Mallinckrodt Chemical)

para solubilizar os cristais de formazana formados. A leitura da densidade ótica foi determinada em espectrofotômetro (Multiskan Ascent, Labsystems) em UV/visível a 540 nm com filtro de referência de 620 nm.

3.11. Obtenção do sobrenadante de macrófagos

As suspensões celulares ajustadas para 5×10^6 células/mL obtidas acima (item 3.7), foram distribuídas em placas de cultura de tecidos (Corning, Inc.) em presença do antígeno F1 e β -glucana, nas concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$, SSTI, LPS como controle positivo (0,5 $\mu\text{g/mL}$) ou apenas com o meio RPMI-1640C como controle negativo e incubadas a 37°C por 24 h em estufa com tensão constante de 5% de CO_2 (Forma Scientific). Após, os sobrenadantes obtidos das placas foram centrifugados a 4°C durante 10 min a 300 x g, aliqüotados e estocados em freezer a -80°C até o momento da dosagem das citocinas.

3.12. Análise de fagocitose por macrófagos

Para os ensaios de fagocitose, 500 μL de RPMI - 1640C (contendo aproximadamente 10^6 macrófagos peritoneais) foram transferidos para lâminas de câmara de 4 poços (1.8cm²/well ; LabTek : Nunc, Naperville IL) e incubadas a 37 ° C , 5 % de CO_2 durante 2 horas. Após esse período foram adicionados na câmara os compostos (β -glucana, fração F1, SSTI, LPS, Citocalasina D (CD) (Sigma) e somente o meio RPMI, em concentrações determinadas pelo método de MTT), posteriormente a câmara foi incubada novamente por 4 horas, o meio foi removido e o mesmo volume da suspensão fúngica (contendo cerca de 5×10^6 leveduras) foi adicionado à camada com macrófagos aderidos e incubados durante 2 horas. A suspensão foi removida e 3 lavagens foram realizadas para retirada das leveduras que não foram fagocitadas. As lâminas foram coradas com Giemsa (Sigma) e analisadas em microscópio óptico (em objetiva de 100x).

Como controle negativo da fagocitose, os macrófagos foram incubados com 10 μM de citocalasina D em meio RPMI- 1640C contendo 0,1 % de DMSO (Negrini *et al.*; 2013).

O índice fagocítico (IF) foi determinado pelo percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose, multiplicado pelo número médio de leveduras fagocitadas por macrófagos (SHAW; GRIFFIN, 1981).

$$\text{IF} = \% \text{ Macrófagos envolvidos na fagocitose} \times \text{média de leveduras fagocitadas}$$

3.13. Produção de H₂O₂

A produção do peróxido de hidrogênio foi determinada usando o marcador dihidrorodamina 123(DHR). Este método permite avaliar o “burst” oxidativo de macrófagos frente a diferentes estímulos. A dihidrorodamina 123 (DHR) reage especificamente com H₂O₂ produzindo o fluoróforo rodamina 123 que é detectado no canal FL1 do citômetro de fluxo (Walrand *et al.*, 2003).

As células do exsudato peritoneal foram obtidas como descrito acima (item 3.7.) e ajustadas a concentração de 5x10⁵ céls/mL. Para o teste foram adicionados em todos os tubos, 100µL de células. Os tubos foram centrifugados a 300xg por 5 min e o sobrenadante descartado, posteriormente as células precipitadas foram ressuspensas em 100 µL de PBS pH 7,4 e em seguida foram adicionados aos tubo: somente células, DHR (células+DHR) e Teste (células+DHR+ PMA, F1 100µg/mL, β-glucana 100µg/mL comercial ou SSTI).

Os tubos foram incubados por 2 horas a 37°C com 5% de CO₂. Após esse período foram adicionados 6 µL de DHR em todos os tubos, exceto células e estes foram incubados novamente por 10 min a 37°C com 5% de CO₂. Em seguida os tubos foram lavados com 1mL de PBS pH 7,4 e centrifugados a 300xg por 5 min. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram resuspensos em 150 µL de PBS pH 7,4.

As amostras foram lidas no citômetro de fluxo BD Accuri C6 (BD Biosciences). O limiar de aquisição das amostras foi ajustado para 1.800.000 no parâmetro FSC-H (“forward scatter – height”) para exclusão do *debris* celular e pelo menos 50.000 eventos foram efetivamente incluídos em cada análise.

3.14. Determinação da produção de óxido nítrico

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

Alíquotas de 50 µL dos sobrenadantes das culturas de células do exsudato peritoneal foram transferidas para nova placa de cultura de 96 cavidades de fundo plano (Corning, Inc.), acrescidas de igual volume de reagente de Griess e então incubadas por 10 min em temperatura ambiente ao abrigo da luz. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro UV/visível para microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems) em 540 nm. As concentrações de NO liberado nos sobrenadantes das culturas celulares foram calculadas a partir de curva padrão,

previamente estabelecidas com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio, e os valores serão expressos em μmols de nitrito/ 5×10^5 células.

3.15. Determinação das citocinas

As citocinas IL-10, TNF- α e IL-1 β foram quantificadas no sobrenadante das culturas de células do exsudato peritoneal pelo teste imunoenzimático ELISA sandwich (eBioscience®).

As placas de 96 orifícios foram adsorvidas com anticorpo de captura, monoclonal, obtidos de rato, anti-citocina de camundongo, na concentração adequada para cada citocina em PBS pH 7,0 (100 μL por cavidade) e incubadas 18 horas à 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (PBS pH 7,0 contendo 0,05% de Tween-20) e bloqueadas com 200 μL /cavidade de PBS pH 7,0 contendo 10% de soro fetal bovino (dilúente de ensaio) à temperatura ambiente por 60 min. Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem e em seguida adicionadas de 100 μL por cavidade do padrão de citocinas ou dos sobrenadantes das culturas de células a foram testados. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 2 horas e lavadas 3 vezes com tampão de lavagem. Em seguida, foram adicionados 100 μL por cavidade de anticorpo monoclonal de cabra (anticorpo anti-citocina de camundongo) marcado com biotina e diluído à concentração adequada de cada citocina em dilúente de ensaio. As placas foram incubadas por mais 2 horas à temperatura ambiente e posteriormente lavadas mais 3 vezes com tampão de lavagem, sendo adicionadas de 100 μL por cavidade do conjugado peroxidase-estreptavidina (diluído à concentração adequada de cada citocina em dilúente de ensaio) e incubadas novamente à temperatura ambiente por 30 min. Após este período, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem e em seguida adicionadas de 100 μL do substrato [10 mM de tampão citratofosfato, contendo 0,4 mM de tetrametilbenzidina (Sigma) e 1,2 mM de H₂O₂ (Mallinckrodt Chemical)] a cada cavidade. A reação foi interrompida com 50 μL de H₂SO₄ 2N a cada cavidade e a absorvância foi lida em 450 nm com filtro de referência em 570nm em espectrofotômetro UV/visível para microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems). As concentrações de cada citocina foi quantificada através da curva padrão previamente estabelecida com quantidades conhecidas de cada uma delas. Os resultados foram expressos em pg/mL.

3.16. Determinação da expressão de Dectina-1

Os seguintes anticorpos monoclonais (mAb) foram utilizados: anti CD16/CD32 purificado (clone 2.4G2), anti-CD11b FITC (clone M1/70), anti-F4/80 APC (clone BM8) e anti-Dectina-1 PE (clone bg1fpj), todos obtidos da eBioscience. Células do exsudato peritoneal não estimuladas, obtidas de animais infectados e não infectados, foram avaliadas quanto à expressão do receptor Dectina-1. As células foram marcadas extracelularmente com os mAb anti-CD11b, anti-F4/80 e anti-Dectina-1. O controle da marcação inespecífica foi feito pela incubação prévia de todas as amostras com anti CD16/CD32 purificado e, adicionalmente, por amostras marcadas com anti-CD11b FITC mais anti-F4/80 APC e incubada com o isotipo controle IgG2a κ PE. 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 1.800.000 no parâmetro FSC-H (“forward scatter – height”) para exclusão do *debris* celular e pelo menos 50.000 eventos foram efetivamente incluídos em cada análise. A determinação do percentual de células positivas para cada marcação foi feita pela subtração da leitura do isotipo controle daquela do anticorpo de interesse.

3.17. Análise dos resultados.

A análise estatística dos resultados foi realizada por intermédio do programa estatístico GraphPad InStat versão 6.01, aplicando-se análise de variância (ANOVA) de 1 ou 2 vias, com teste para comparações múltiplas de Sidak ou Tukey, conforme indicado. O intervalo de confiança foi definido em 95%. Todos os experimentos foram realizados usando quatro animais por período experimental e cada determinação foi realizada em duplicata.

4. RESULTADOS

4.1. Carga fúngica nos pontos experimentais

Para determinar a progressão da infecção sistêmica a fim de estabelecer os pontos mais adequados para conduzir os demais experimentos. A carga fúngica, foi 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 2). Deste modo, todos os experimentos foram executados seguindo esse padrão de infecção, os animais foram eutanasiados nos dias 5, 10 e 15 pós-infecção, os quais correspondem, respectivamente, ao pico de suscetibilidade dos animais, à fase de eliminação ativa do fungo e à fase de resolução da infecção (Ferreira *et al*, 2015). O controle de qualidade da infecção foi realizado pela análise da carga fúngica presente no baço dos animais concomitantemente à realização dos experimentos, a fim de garantir a adequabilidade dos resultados obtidos frente ao comportamento esperado do modelo utilizado.

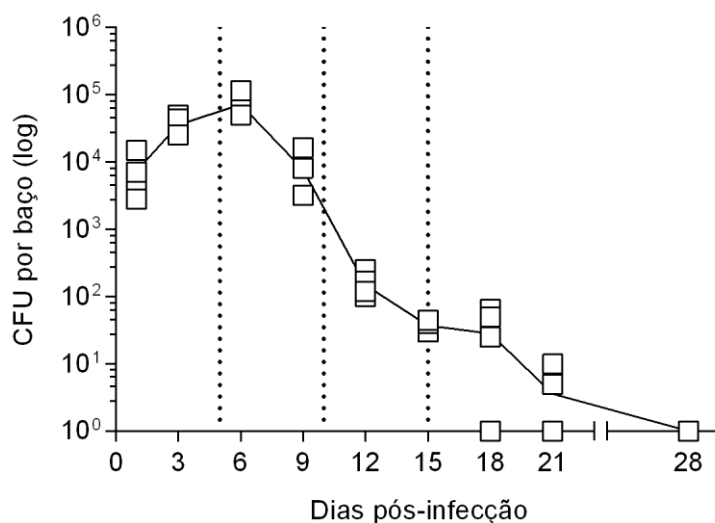


Figura 2. Cinética da infecção sistêmica. Os camundongos foram inoculados pela via i.p. com 10⁶ leveduras de *S. schenckii*. Nos dias indicados, os camundongos foram eutanasiados e os baços removidos para avaliação da carga fúngica sistêmica. Contagens iguais a zero estão apresentadas como 1 (um) para 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. Avaliação da viabilidade celular de macrófagos

O teste de viabilidade celular foi realizado na cultura de macrófagos peritoneais para observar se as condições de cultura, bem como a infecção no animal ou os antígenos fúngicos utilizados como estímulos, poderiam ser tóxicos para estas células. Os percentuais das substâncias testadas foram calculados considerando como a maior viabilidade celular (100%) aquelas culturas realizadas somente em presença de meio RPMI-C.

As células dos animais não infectados e infectados nos diferentes períodos testados (Figuras 3 e 4), apresentaram viabilidade satisfatória mediante cultivo de 24 horas com uma fração álcali-insolúvel da parede celular de *S. schenckii* contendo, principalmente, β -glucanas (F1) nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$, com uma β -1,3-glucana comercial (β -glucana) nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$ ou com a levedura de *S. schenckii* termo-inativada (SSTI).

Os compostos não foram tóxicos para as células do hospedeiro, uma vez que as viabilidades celulares permaneceram maiores que 80%, optando-se por utilizar nos testes a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, tanto para a fração F1 quanto para a β -glucana.

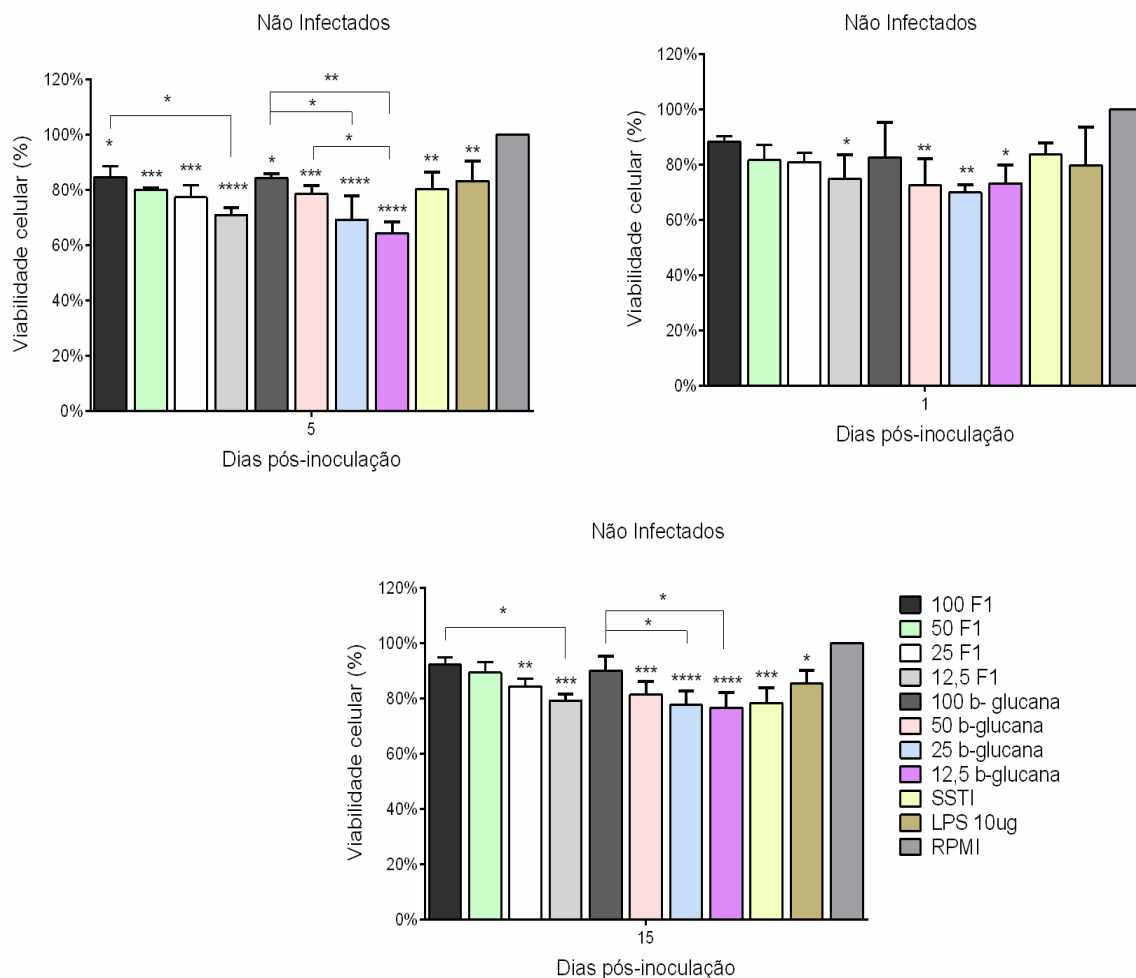


Figura 3. Avaliação da toxicidade dos antígenos fúngicos nas culturas de macrófagos peritoneais de camundongos não infectados. Os camundongos foram inoculados pela via i.p. com PBS estéril. Nos dias indicados, os camundongos foram eutanasiados para a obtenção dos macrófagos do exsudato peritoneal, os quais foram cultivados por 24 h na presença de diferentes estímulos (Fração F1 a 100, 50, 25 e 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, β -glucana a 10, 50, 25 e 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, SSTI a uma relação macrófago:levedura de 1:5, LPS ou meio RPMI 1640 completo). (A-C) Viabilidade celular. A significância estatística foi determinada por ANOVA de 1 vias usando o teste de comparações múltiplas de Sidak com intervalo de confiança de 95%. ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$) para a comparação entre os estímulos ou conforme indicado. Os resultados são apresentados como a média \pm DP de 3 ou 4 animais.

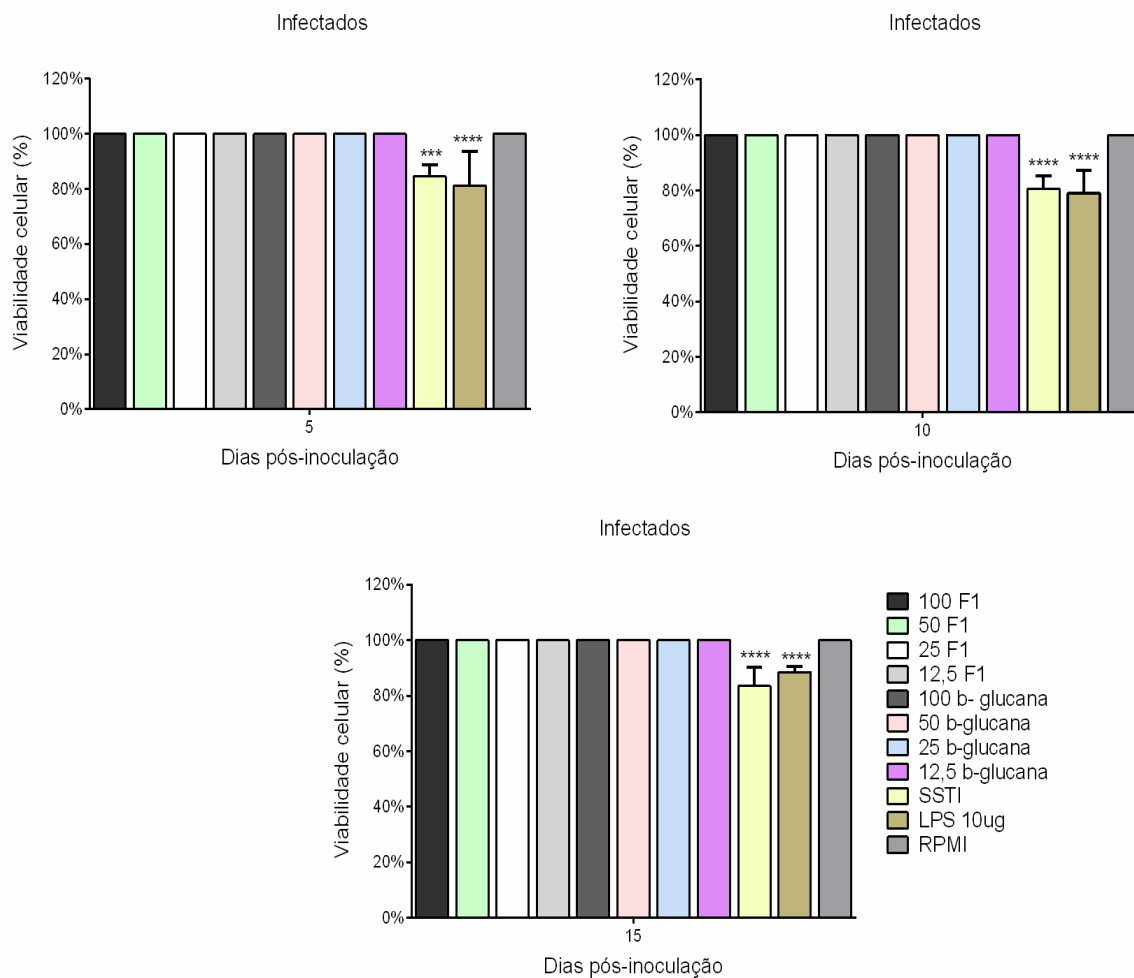


Figura 4. Avaliação da toxicidade dos antígenos fúngicos nas culturas de macrófagos peritoneais de camundongos infectados. Os camundongos foram inoculados pela via i.p. com 10^6 leveduras de *S. schenckii* em PBS. Nos dias indicados, os camundongos foram eutanasiados para a obtenção dos macrófagos do exsudato peritoneal, os quais foram cultivados por 24 h na presença de diferentes estímulos (Fração F1 a 100, 50, 25 e 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, β -glucana a 10, 50, 25 e 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, SSTI a uma relação macrófago:levedura de 1:5, LPS ou meio RPMI 1640 completo). (A-C) Viabilidade celular. A significância estatística foi determinada por ANOVA de 1 vias usando o teste de comparações múltiplas de Sidak com intervalo de confiança de 95%. ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$) para a comparação entre os estímulos ou conforme indicado. Os resultados são apresentados como a média \pm DP de 3 ou 4 animais.

4.3. Análise da fagocitose por macrófagos e produção de H₂O₂

No nosso próximo passo foi investigar o papel das β -glucanas de *S. schenckii* na fagocitose do fungo por macrófagos peritoneais. Houve um aumento significativo da fagocitose quando os macrófagos foram previamente expostos a quaisquer dos estímulos, mas especialmente quando expostos à F1 e ao SSTI (Figura 3A). Resultado semelhante foi observado para a produção de H₂O₂ por estas mesmas células (Figura 3B).

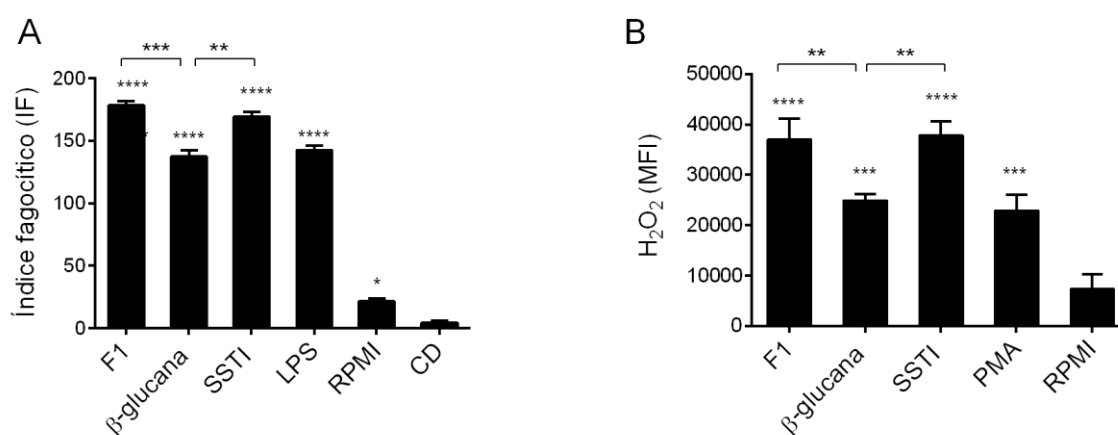


Figura 5. Índice fagocítico (IF) e produção de H₂O₂ dos macrófagos expostos a diferentes estímulos. Macrófagos do exsudato peritoneal de camundongos Balb/c foram pré-incubados com diferentes estímulos (Fração F1 a 100 μ g/mL, β -glucana a 100 μ g/mL, SSTI a uma relação macrófago:levedura de 1:5, LPS ou meio RPMI 1640 completo) e, após lavagem para remoção dos mesmos, colocados em contato com leveduras vivas de *S. schenckii* a uma relação macrófago:levedura de 1:5 por mais 4 h. (A) Determinação do índice fagocítico. (B) Determinação da produção de H₂O₂. Os resultados são apresentados como a média \pm DP de 3 ou 4 animais. A significância estatística foi determinada por ANOVA de 1 via usando o teste de comparações múltiplas de Tukey com intervalo de confiança de 95%. ** (p < 0,01), *** (p < 0,001) e **** (p < 0,0001) para a comparação de cada estímulo com o controle negativo (RPMI), ou conforme indicado. Quando os estímulos foram comparados com LPS ou PMA, utilizados como controle positivo, somente F1 e SSTI tiveram diferença significativa. CD: Citocalasina D.

4.4. Determinação da produção de óxido nítrico

A fim de investigar o papel das β -glucanas de *S. schenckii* no desencadeamento da resposta imune durante a infecção, nós primeiramente avaliamos a produção de NO por macrófagos peritoneais desafiados com uma fração álcali-insolúvel da parede celular de *S. schenckii* contendo, principalmente, β -glucanas (F1), com uma β -1,3-glucana comercial (β -glucana), ou com a levedura de *S. schenckii* termo-inativada (SSTI). A produção de NO pelas células dos animais infectados foi aumentada durante todo o período avaliado em resposta a todos os estímulos testados (Figura 4). Em todos os casos, a maior produção de NO foi encontrada quando as células foram expostas à F1 e ao SSTI, enquanto que a produção estimulada pela β -glucana, apesar de significativa, foi relativamente baixa durante todo o período experimental. Isto sugere que a produção de NO durante a infecção por *S. schenckii* resulta não apenas do reconhecimento das β -glucanas do fungo, mas também de componentes adicionais presentes na fração F1 empregada em nosso sistema.

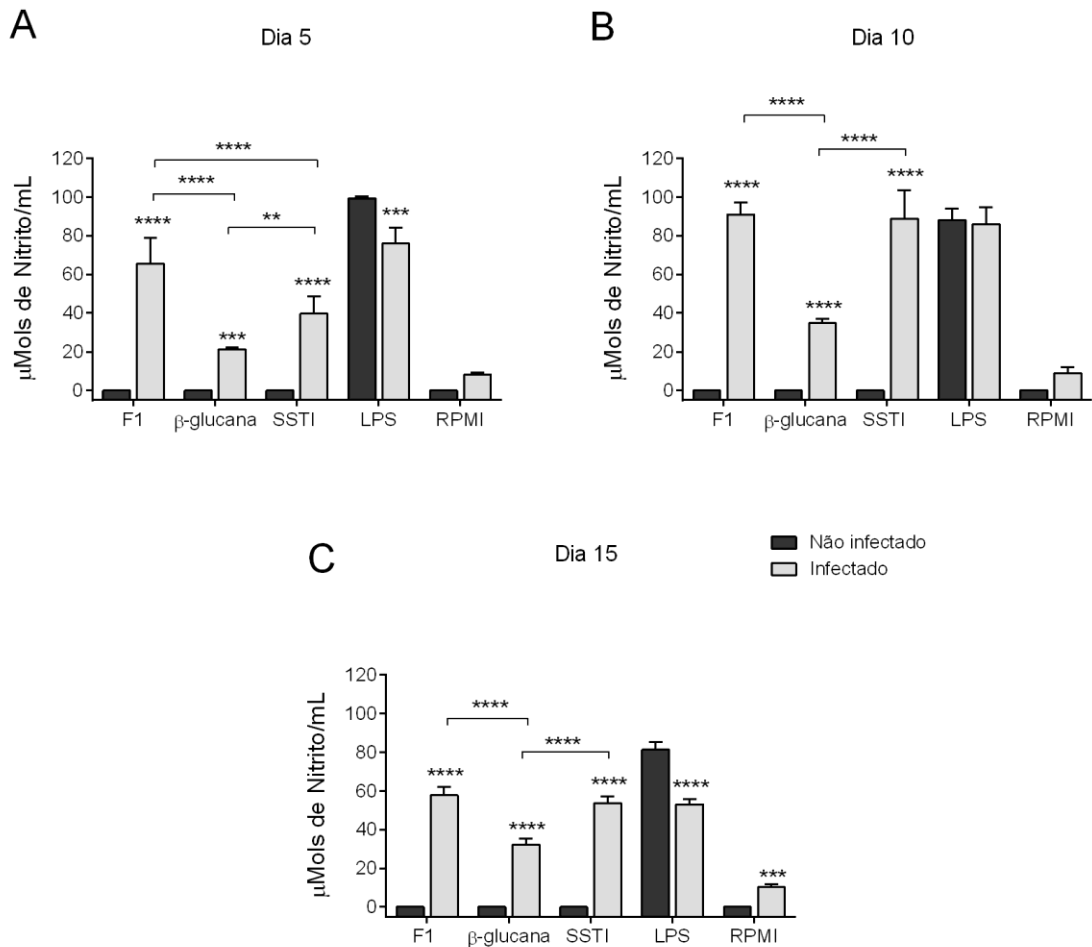


Figura 6. Produção de NO pelos macrófagos peritoneais dos camundongos Balb/c. Os camundongos foram inoculados pela via i.p. com 10^6 leveduras de *S. schenckii* em PBS (infectado) ou somente com PBS estéril (não infectado). Nos dias indicados, os camundongos foram eutanasiados para a obtenção dos macrófagos do exsudato peritoneal, os quais foram cultivados por 24 h na presença de diferentes estímulos (Fração F1 a 100 µg/mL, β-glucana a 100 µg/mL, SSTI a uma relação macrófago:levedura de 1:5, LPS ou meio RPMI 1640 completo). (A-C) Produção *ex-vivo* de NO. A significância estatística foi determinada por ANOVA de 2 vias usando o teste de comparações múltiplas de Sidak com intervalo de confiança de 95%. ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$) para a comparação entre os grupos “infectado” e “não infectado” sujeitos a cada estímulo, ou conforme indicado. Os resultados são apresentados como a média ± DP de 3 ou 4 animais.

4.5. Determinação das citocinas

Em seguida, avaliou-se a liberação das citocinas IL-10, TNF- α e IL-1 β pelos macrófagos peritoneais. Com exceção da β -glucana, todos os demais estímulos foram capazes de induzir, em maior ou menor grau, a liberação das três citocinas avaliadas durante todo o período de estudo. Quando desafiados com a β -glucana, os macrófagos dos animais infectados por *S. schenckii* foram capazes de liberar quantidades significativas de IL-10 apenas nos dias 5 e 10 pós-infecção (Figura 7 A e B) e de IL-1 β apenas nos dias 10 e 15 pós-infecção (Figura 9 B e C). Por outro lado, a liberação de TNF- α induzida por este composto só foi significativa no dia 10 pós-infecção (Figura 8 B), ainda que a média das concentrações liberadas no dia 15 pós-infecção em resposta à β -glucana tenha sido mais de 4 vezes maior que aquela apresentada pelas células dos animais infectados não estimuladas ou pelas células dos animais não infectados em resposta ao mesmo estímulo. Exceto pela liberação de IL-10 no dia 5 pós-infecção e de IL-1 β no dia 15 pós-infecção, o mesmo padrão observado anteriormente se manteve, com F1 e SSTI sendo estímulos mais eficientes que a β -glucana para a liberação *ex vivo* de IL-10, IL-1 β e TNF- α pelas células dos animais infectados. Além disso, ao contrário da liberação de IL-10 e TNF- α , a liberação de IL-1 β , apesar de significativa, está visivelmente reduzida no dia 15 pós-infecção.

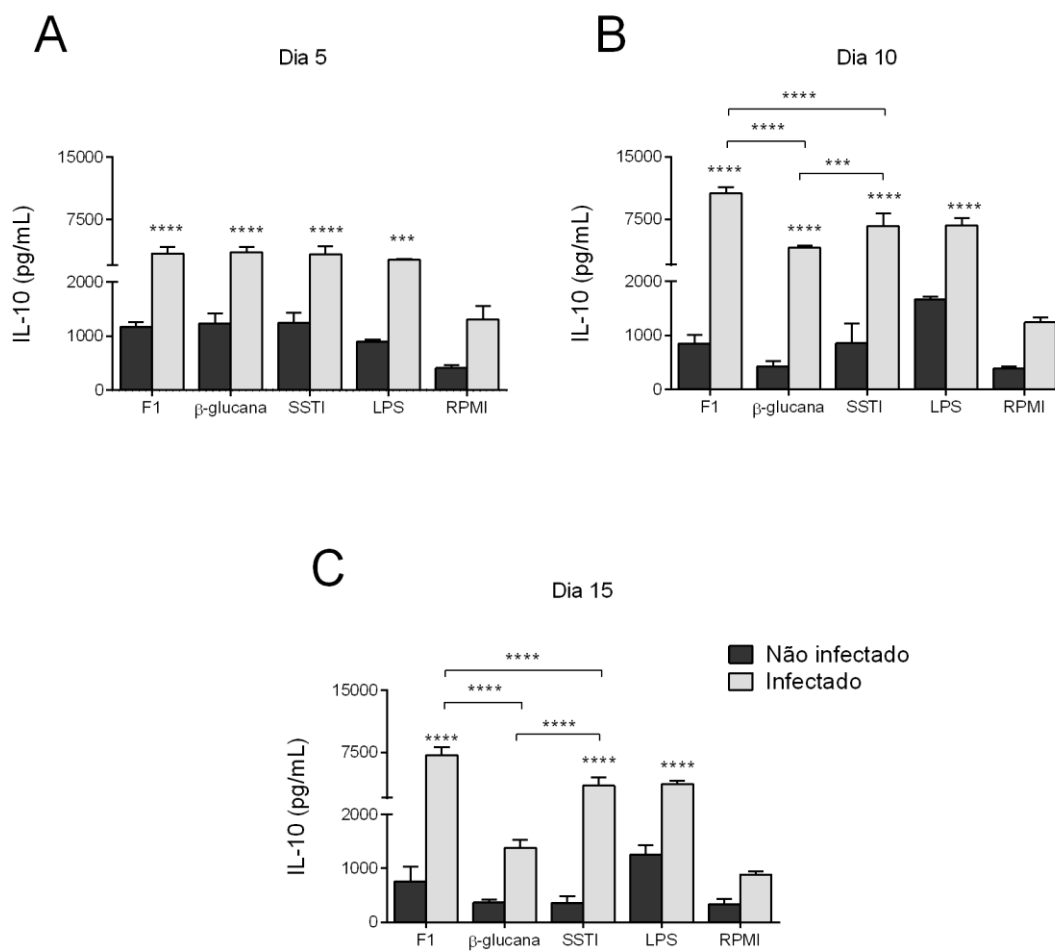


Figura 7. Determinação da liberação *ex-vivo* de IL-10. Os camundongos foram inoculados pela via i.p. com 10^6 leveduras de *S. schenckii* em PBS (infectado) ou somente com PBS estéril (não infectado). Nos dias indicados, os camundongos foram eutanasiados para a obtenção dos macrófagos do exsudato peritoneal, os quais foram cultivados por 24 h na presença de diferentes estímulos (Fração F1 a 100 μ g/mL, β -glucana a 100 μ g/mL, SSTI a uma relação macrófago:levedura de 1:5, LPS ou meio RPMI 1640 completo). A citocina foi dosada por ELISA de acordo com as instruções do fabricante. (A-C) Liberação *ex-vivo* de IL-10. A significância estatística foi determinada por ANOVA de 2 vias usando o teste de comparações múltiplas de Sidak com intervalo de confiança de 95%. ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$) para a comparação entre os grupos “infectado” e “não infectado” sujeitos a cada estímulo, ou conforme indicado. Os resultados são apresentados como a média \pm DP de 3 ou 4 animais.

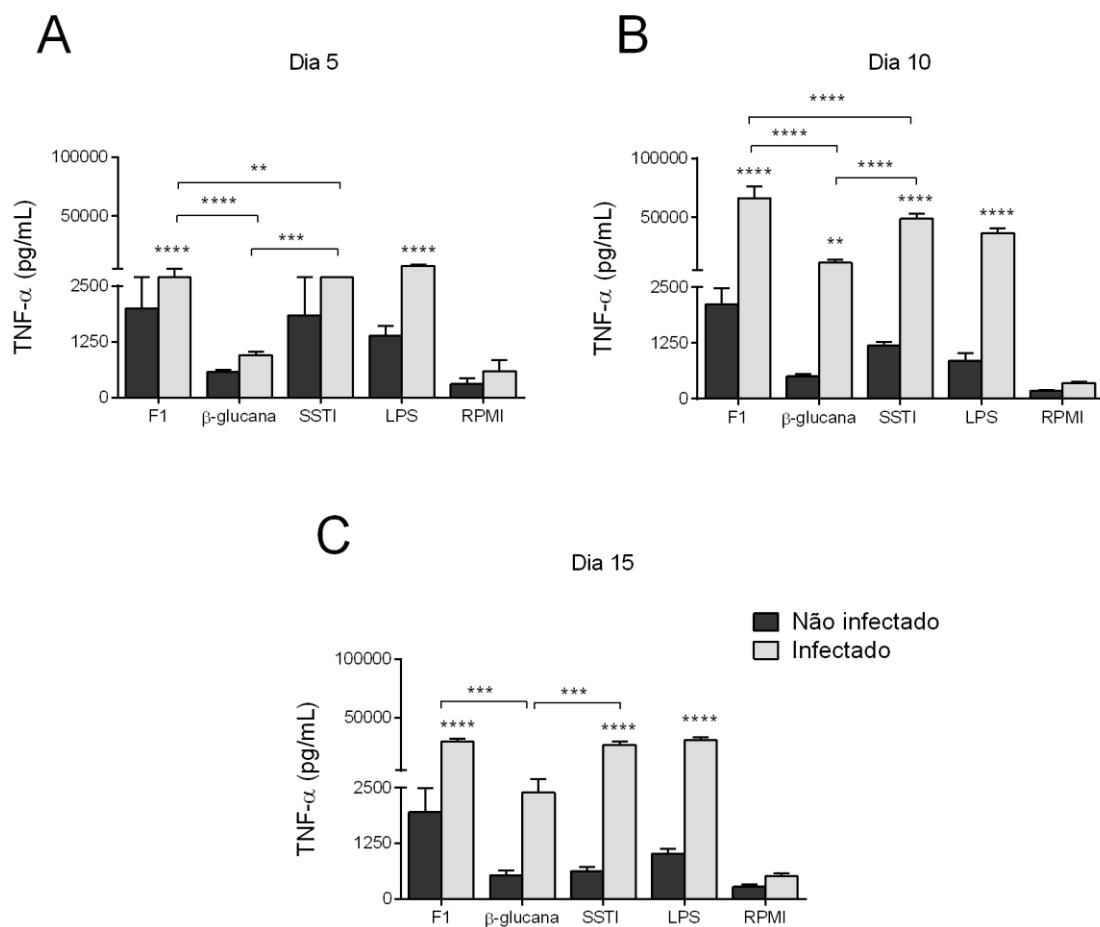


Figura 8. Determinação da liberação ex-vivo de TNF- α . Os camundongos foram inoculados pela via i.p. com 10^6 leveduras de *S. schenckii* em PBS (infectado) ou somente com PBS estéril (não infectado). Nos dias indicados, os camundongos foram eutanasiados para a obtenção dos macrófagos do exsudato peritoneal, os quais foram cultivados por 24 h na presença de diferentes estímulos (Fração F1 a 100 μ g/mL, β -glucana a 100 μ g/mL, SSTI a uma relação macrófago:levedura de 1:5, LPS ou meio RPMI 1640 completo). A citocina foi dosada por ELISA de acordo com as instruções do fabricante. (A-C) Liberação *ex-vivo* de TNF- α . A significância estatística foi determinada por ANOVA de 2 vias usando o teste de comparações múltiplas de Sidak com intervalo de confiança de 95%. ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$) para a comparação entre os grupos “infectado” e “não infectado” sujeitos a cada estímulo, ou conforme indicado. Os resultados são apresentados como a média \pm DP de 3 ou 4 animais.

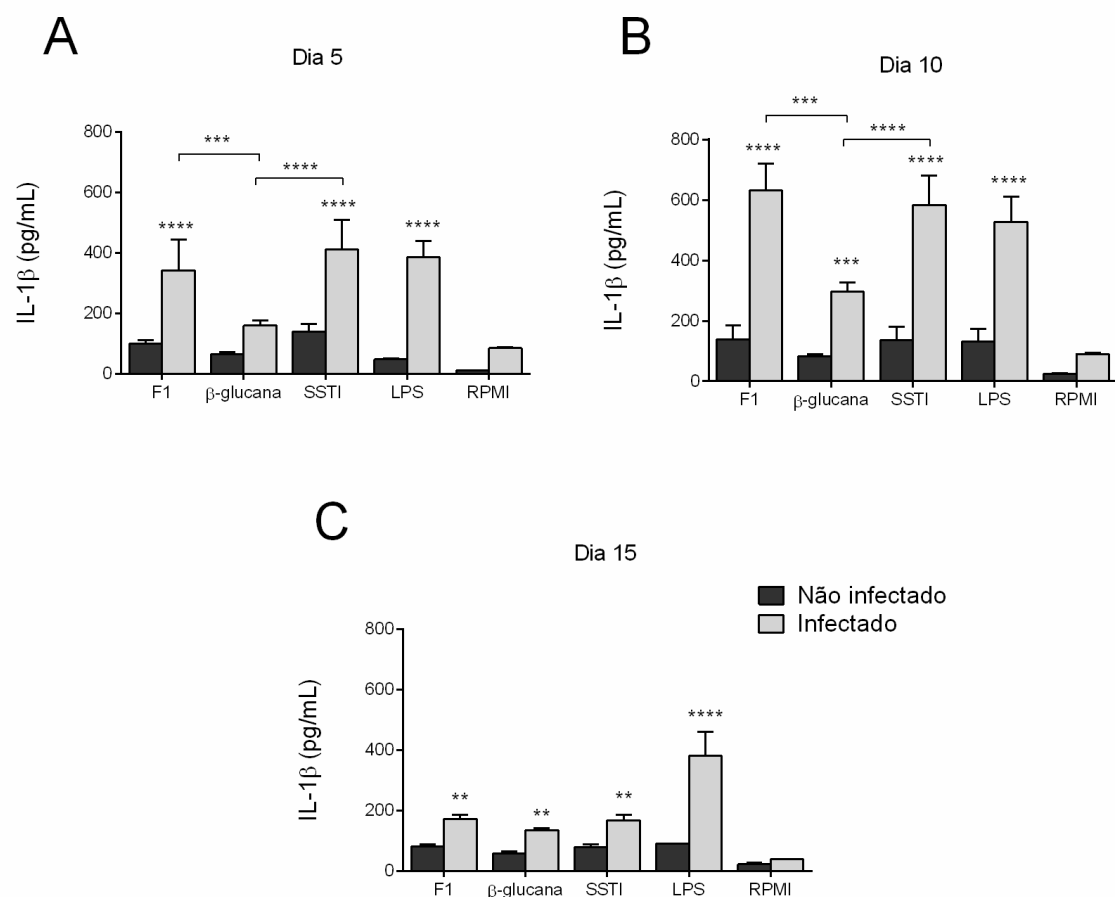


Figura 9. Determinação da liberação ex-vivo de IL-1 β . Os camundongos foram inoculados pela via i.p. com 10^6 leveduras de *S. schenckii* em PBS (infectado) ou somente com PBS estéril (não infectado). Nos dias indicados, os camundongos foram eutanasiados para a obtenção dos macrófagos do exsudato peritoneal, os quais foram cultivados por 24 h na presença de diferentes estímulos (Fração F1 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, β -glucana a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, SSTI a uma relação macrófago:levedura de 1:5, LPS ou meio RPMI 1640 completo). A citocina foi dosada por ELISA de acordo com as instruções do fabricante. (A-C) Liberação ex-vivo de IL-1 β . A significância estatística foi determinada por ANOVA de 2 vias usando o teste de comparações múltiplas de Sidak com intervalo de confiança de 95%. ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$) para a comparação entre os grupos “infectado” e “não infectado” sujeitos a cada estímulo, ou conforme indicado. Os resultados são apresentados como a média \pm DP de 3 ou 4 animais.

4.6. Determinação da expressão de Dectina-1

Finalmente, levando em consideração o papel dos PRRs e da Dectina-1 em particular, através do reconhecimento de β -glucanas, no desencadeamento da resposta imune contra fungos (Brown & Gordon, 2001; Taylor *et al.*, 2002), nosso próximo passo foi avaliar a frequência e o nível de expressão desse receptor ao longo da infecção por *S. schenckii*. Nos animais infectados, a frequência de macrófagos peritoneais expressando Dectina-1 e o nível de expressão desse receptor estavam ambos aumentados nos dias 10 e 15 pós-infecção (Figura 6). Já, o nível de expressão de Dectina-1 nos macrófagos dos animais infectados estava reduzido no dia 5 pós-infecção e também a frequência dessas células, embora a análise estatística não tenha apontado diferença significativa nesse último caso. Os resultados apresentados indicam que a expressão de Dectina-1 é modulada no decorrer da infecção por *S. schenckii*, sugerindo um papel para as respostas desencadeadas por esse receptor no controle da infecção.

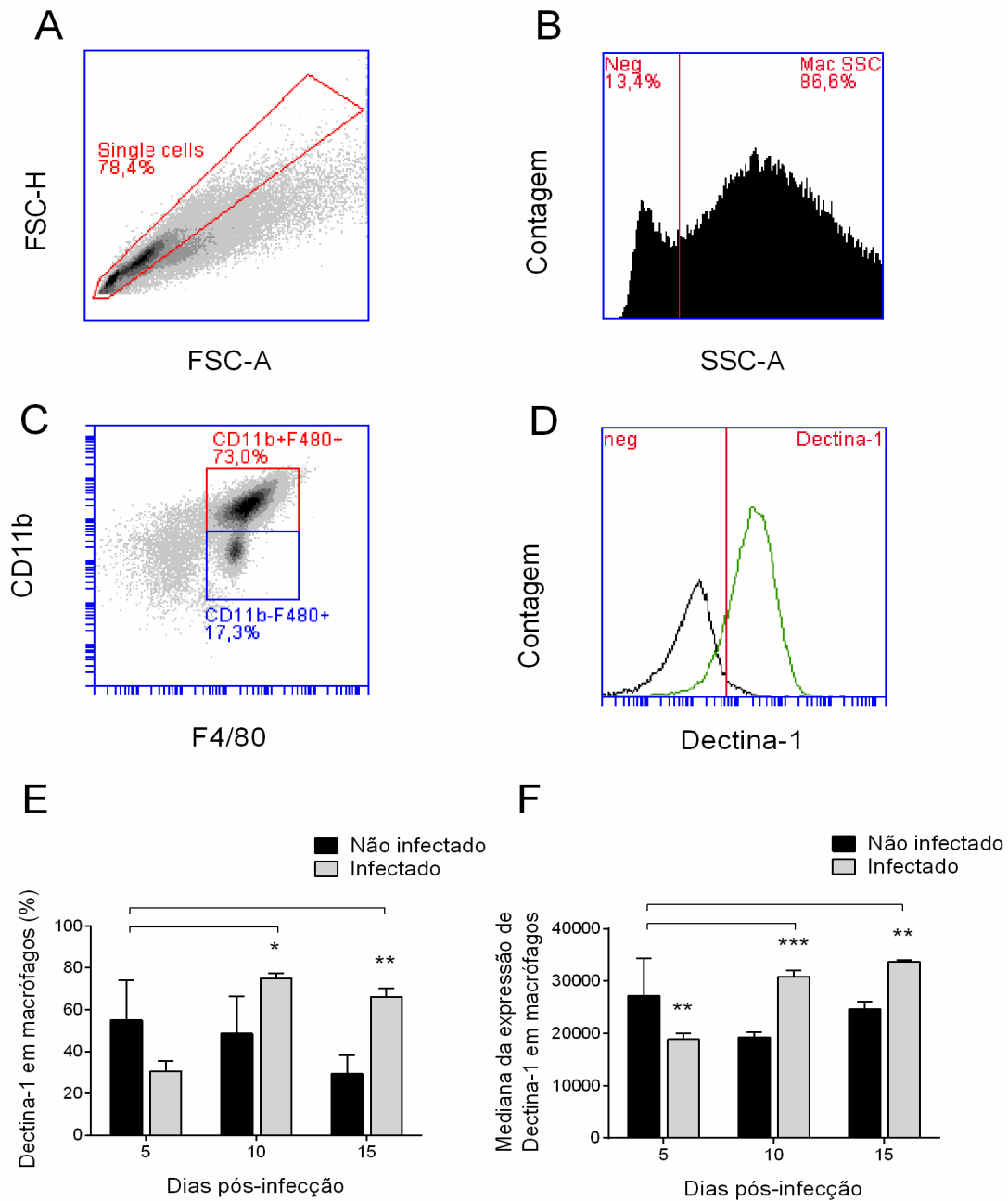


Figura 10. Determinação da expressão do Receptor Dectina-1 em macrófagos peritoneais. Os camundongos foram inoculados pela via i.p. com 10^6 leveduras de *S. schenckii* em PBS (infectado) ou somente com PBS estéril (não infectado). Nos dias indicados, os camundongos foram eutanasiados para a obtenção das células do exsudato peritoneal, as quais foram marcadas conforme mostrado. (A-D) Estratégia de “gating” representativa da determinação da presença de Dectina-1 em macrófagos (células CD11b+F4/80+Dectina-1+). (E) Percentual de macrófagos positivos para Dectina-1. (F) Mediana da intensidade de fluorescência (MFI) da marcação de Dectina-1 nos macrófagos. A significância estatística foi determinada por ANOVA de 2 vias usando o teste de comparações múltiplas de Sidak e intervalo de confiança em 95%. * ($p < 0,05$), ** (0,001) e *** ($p < 0,0001$) para a comparação entre os grupos “infectado” e “não infectado” em cada ponto respectivo. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão de 3 ou 4 animais.

5. DISCUSSÃO

O sistema imune inato é capaz de detectar a invasão de patógenos por meio do reconhecimento de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), desencadeando a resposta imune. Os PAMPs são reconhecidos pelo hospedeiro através de PRRs, altamente expressos em macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Atualmente, há pelo menos quatro grandes famílias de PRRs que operam de forma cooperativa para reconhecer os patógenos e sinais de stress produzidos pelas células durante uma infecção ou injúria celular: Toll-like (TLRs), RIG-I-like (RLRs), lectina-C (CLRs) e mais recentemente, os NOD-like (NLRs) (Romani, 2011).

Na grande família dos Toll-like receptors (TLRs), estudos em nosso laboratório demonstraram na esporotricose que macrófagos de animais C3H/HeJ infectados (com mutação pontual natural no gene TLR-4) foram deficientes na produção de H₂O₂, IL-1 β e IL-6 *ex vivo*, em resposta à liberação aos extratos lípidos quando comparados com animais HePas/C3H, competentes para esse receptor (Carlos *et al.*, 2009; Sassá *et al.* 2012).

O envolvimento dos receptores TLR-2 também já foi comprovado em estudos prévios, nos quais, animais “Knockout” para esse receptor tiveram menor porcentagem de leveduras internalizadas por macrófagos e diminuição na produção das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-12 e IL-10 quando comparados com os animais portadores do receptor (Negrini *et al.* 2013). Na sequência, outro estudo demonstrou que a ausência de TLR-2 interferiu na produção de mediadores pró-inflamatórios e NO, e que a produção de IL-17 foi independente desse receptor, levando-nos à conclusão de que a ausência de resposta Th1 em animais “Knockout” foi concomitante com a produção de IL-17, sugerindo que o receptor TLR-2 interfere com o curso da infecção induzida pelo fungo *S. schenckii* (Negrini *et al.*, 2014).

Os NLRs são receptores citosólicos que formam complexos multiprotéicos chamados inflamassomas e a descoberta destes PRRs sugeriu que os microrganismos que evadissem da detecção de receptores extracelulares encontrariam uma segunda linha de reconhecimento dentro do citosol do hospedeiro, atuando como segundos sensores de defesa (Philpott *et al.*, 2000). Além do receptor NLR, o inflamassoma é composto pela molécula adaptadora ASC e pela enzima caspase-1. A ativação do NLR leva ao recrutamento da ASC e da caspase-1 com formação destes complexos protéicos pentaméricos ou heptaméricos (Kumar *et al.*, 2011; Paiva-Oliveira *et al.*, 2012). Em estudo prévio, Gonçalves *et al.* 2015, mostraram a importância da interação entre caspase-1 e as citocinas IL-1 β e IL-18 na defesa do hospedeiro contra a infecção por *S. schenckii*, pois a diminuição da atividade de caspase-1 foi acompanhada pela secreção reduzida dessas citocinas, sugerindo uma participação do inflamassoma na esporotricose.

Curiosamente, essa redução transitória da atividade das caspase-1 ocorreu em um período de tempo que segue de perto o período de aumento da carga fúngica e imunossupressão relatado antes em modelos semelhantes (Carlos et al. 2009).

Dentre os receptores de lectinas tipo C não clássicas (CLRs), encontramos a Dectina-1 (Reppley et al., 2007), que reconhece a β -glucana nas paredes celulares de fungos, e é um receptor crucial para a imunidade protetora contra os agentes fúngicos patogênicos. A interação das β -glucanas com a dectina-1 expressa em fagócitos mielóides ativam a fagocitose, produzem espécies reativas de oxigênio (ROS), sintetizam citocinas pro-inflamatórias e quimiocinas, além de influenciar no desenvolvimento da imunidade adaptativa (Goodridge et al., 2009; Brown, 2011).

Nosso trabalho foi realizado seguindo um modelo experimental murino previamente estabelecido em nosso laboratório por Ferreira et al., 2015, onde foi analisado o curso da infecção durante 28 dias em camundongos Balb/c, a fim de se estabelecer os pontos mais adequados para conduzir os demais experimentos. Verificou-se que a infecção 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 2). De acordo com esses resultados decidimos eutanasiar os animais nos dias 5, 10 e 15 pós-infecção para realização dos experimentos subsequentes. Nos dias específicos foi realizada a análise dos parâmetros selecionados da resposta imune.

Após a exposição a um estímulo adequado, por exemplo, bactérias, fungos e parasitas, os fagócitos polimorfonucleares e mononucleares sofrem uma mudança em seu metabolismo. Nesse caso, ocorre um aumento no consumo de oxigênio, que chega a atingir níveis 50 vezes maiores do que os observados quando as células estão em repouso. Além desse aumento no consumo de oxigênio também é observado substancial aumento na oxidação da glicose via hexose monofosfato com produção de NADPH. Através da NADPH oxidase ocorre a redução unieletrônica do O_2 à $O^{\cdot-1/2}$ e este, por dismutação espontânea ou pela superóxido dismutase, leva à formação de H_2O_2 . Todos esses eventos tomados em conjunto são conhecidos como surto ou “burst” respiratório ou oxidativo. A ativação do “burst” respiratório sucede o estímulo por volta de um período aproximado de 1 minuto. É um processo reversível que não requer internalização nem degranulação na célula (Absolom, 1986; Nauseff et al., 1983). O “burst” respiratório em fagócitos profissionais está relacionado ao início da fagocitose (Berkiten et al., 2000).

Após a escolha dos pontos experimentais, foram realizadas *in vitro* a dosagem da produção de H_2O_2 e fagocitose, onde os macrófagos dos animais não infectados foram desafiados com os componentes fúngicos a fim de observar a ativação das células e o índice fagocítico.

Com nossos testes podemos verificar que todos os componentes foram capazes de ativar os macrófagos, especialmente a F1 e SSTI.

Considerando que houve uma menor indução de fagocitose e produção de H_2O_2 pela β -1,3-glucana pura quando comparada à fração F1 e o ao SSTI, podemos sugerir que essa diferença pode estar relacionada à composição dos antígenos fúngicos presentes nas preparações utilizadas por nós. Kanetsuna *et al.*, 1970, em seu trabalho mostrou que a fração F1 é um potente indutor para liberação de H_2O_2 . A parede celular dos fungos é composta em sua maior parte por glicoconjugados, cuja composição é de 80-90% de carboidratos, cerca de 6% a 25% de proteínas livres e 1-7% de lipídios (Chaffin *et al.*, 1998). De maneira geral os polissacarídeos presentes na parede celular dos fungos compreendem glicose, manose, galactose e os polímeros α -glucana, β -glucana, galactomanana e quitina (Kanetsuna *et al.*, 1972, Kanetsuna e Carbonell, 1970, San-Blas *et al.*, 1987). As β -glucanas podem ser glucanas álcali-solúveis ou insolúveis encontradas nas duas fases morfológicas de *S. schenckii*. As glucanas álcali-solúveis presentes na forma de levedura de *S. schenckii* contém ligações $\beta(1,3)$, $\beta(1,6)$ e $\beta(1,4)$ na proporção de 44%, 28% e 28%, respectivamente. Já as glucanas insolúveis, que compõem a fração F1, contém ligações $\beta(1,3)$, $\beta(1,6)$ e $\beta(1,4)$ na proporção de 66%, 29% e 5%, respectivamente (Previato *et al.*, 1979).

As espécies reativas de oxigênio podem também lesar o tecido do hospedeiro especialmente na vizinhança do sítio inflamatório. De fato, essas espécies reativas têm sido envolvidas em injúria tecidual associadas com um número de doenças inflamatórias (Berkiten & Berkiten, 2000). A geração de H_2O_2 parece ser um processo celular natural, resultante de várias reações específicas à atividade celular; no entanto a liberação de quantidades consideráveis de H_2O_2 induz a quebra de fita de DNA e/ou perturbação no citoesqueleto da membrana, levando à morte celular (Ramasarma, 1990).

O “burst” respiratório compreende a produção das espécies reativas de oxigênio (EROs), ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, e a produção de peroxinitrito e seu intermediário NO, principalmente por macrófagos (Goupil *et al.*, 2009).

Outro mediador estudado foi o NO que é um radical livre que apresenta papel na patologia e fisiologia humana (Wink & Mitchell, 1998). O caminho bioquímico da síntese de NO nas células de mamíferos foi inicialmente estudado em macrófagos murinos ativados (Hibbs *et al.*, 1990). A molécula de NO sofre degradação oxidativa em solução aquosa para formar nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) (Hibbs *et al.*, 1992).

Nossos resultados mostraram elevada produção de NO pelos macrófagos dos animais infectados durante todo o período avaliado frente a qualquer um dos estímulos. O aumento de NO na esporotricose já foi relatado em trabalhos realizados em nosso laboratório. Carlos *et al.*

(2003) encontraram maiores concentrações de NO nos animais infectados frente ao extrato lipídico de *S. schenckii* durante a fase aguda da infecção em camundongos Swiss. Usando o mesmo modelo de infecção, Maia *et al.* (2006) demonstraram que a elevada produção de NO durante a fase aguda da infecção estava acompanhada pelo aumento da expressão de iNOS frente ao exoantígeno do *S. schenckii*. A iNOS em macrófagos é cálcio independente e tem elevada a transição de seu gene em resposta à estimulação com certas citocinas TNF- α ou LPS, IL-1 β , IFN- γ (Eigler *et al.*, 1997; Holland & Souza, 1985).

Padrão semelhante ao exposto acima também foi observado para a liberação de IL-10, TNF- α e IL-1 β , com algumas exceções. A liberação de IL-10 durante a fase de resolução da infecção (dia 15 pós-infecção), e de TNF- α e IL-1 β durante o pico de suscetibilidade dos animais (dia 5 pós-infecção) parece não depender do reconhecimento da β -1,3-glucana, mas sim dos componentes adicionais da parede celular de *S. schenckii* presentes da fração F1 utilizada por nós. Além disso, é possível sugerir que a liberação de IL-10 durante o pico de suscetibilidade dos animais, e de IL-1 β durante a fase de resolução da infecção depende exclusivamente do reconhecimento das β -1,3-glucanas de *S. schenckii*, uma vez que nesses casos a liberação dessas citocinas foi virtualmente idêntica àquela induzida pela fração F1 ou pelo SSTI. Em todo caso, é importante considerar que, apesar de termos usado uma quantidade equivalente da β -1,3-glucana pura e da fração F1 (100 μ g/mL de cada) e do fato de que a maior parte das glucanas presentes nesta fração serem do tipo β (1,3), ainda existem diferenças suficientes entre as duas preparações para justificar pelo menos parte das diferenças observadas, a saber: (1) a presença de glucanas do tipo β (1,6) e β (1,4) e (2) a menor concentração de β -1,3-glucana na fração F1, além da presença de outros componentes nessa fração. Estudos futuros irão claramente se beneficiar do uso de preparações mais purificadas contendo componentes específicos da parede celular de *S. schenckii*.

A Dectina-1 pode induzir uma série de respostas celulares protetoras contra fungos, tais como fagocitose e atividade fungicida, que são mediadas, pelo menos em parte, pela indução do “burst” respiratório (Gantner *et al.*, 2005; Steele *et al.*, 2003; Luther *et al.*, 2007). Devido a sua especificidade para β -glucanas, a Dectina-1 pode reconhecer uma variedade de fungos, incluindo *Coccidioides*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Pneumocystis*, *Candida* e *P. brasiliensis* (Brown & Dambuzza, 2015).

Outros estudos utilizando camundongos “knockout” para dectina-1 demonstraram um papel importante para este receptor na imunidade antifúngica *in vivo*, em camundongos, nos quais a deficiência de dectina-1 resultou em resposta inflamatória e morte fúngica deficitárias, levando a um aumento da suscetibilidade na infecção sistêmica por *C. albicans* (Taylor *et al.*,

2007). Já, estudos *in vitro* mostraram que o reconhecimento da *C. albicans* via dectina-1 pode resultar na ativação de células Th17 com alto potencial inflamatório (Leibundgut-Landmann *et al.*, 2007; Romani, 2008). Por meio da citometria de fluxo, mostramos que a frequência de macrófagos expressando Dectina-1, assim como o nível de expressão desse receptor por essas células estavam ambos aumentados nos dias 10 e 15 pós-infecção, evidenciando que esse receptor possa estar participando do reconhecimento a esse fungo.

A Dectina- 1 pode interagir com TLRs no reconhecimento de PAMPS fúngicos. Netea *et al.* (2006), mostraram que *C. albicans* induz a produção de citocinas por monócitos e macrófagos através da ligação a diferentes tipos de receptores, cada um reconhecendo uma das estruturas que forma a parede das células fúngicas. Polímeros do tipo manana são reconhecidos por receptores de manose, e β -glucanas por dectina-1 e TLR2, demonstrando que a colaboração no reconhecimento de componentes fúngicos distintos por diferentes classes de receptores da resposta imune inata é crucial para o desenvolvimento da resposta inflamatória. Nesse sentido pode ocorrer uma interação da Dectina-1 com TLR2 para induzir maior liberação de citocinas por macrófagos e células dendríticas (Gantner *et al.*, 2003, Dennehy *et al.*, 2007). Esse receptor também está envolvido na resposta pró-inflamatória de macrófagos alveolares ao *A. fumigatus* (Steele *et al.*, 2005).

Nossos resultados são aparentemente contraditórios ao estudo anterior realizado por Zhang *et al.* 2012. Eles observaram que os ratos infectados com *S. schenckii* não expressaram Dectina-1 nas lesões cutâneas avaliadas pela coloração imuno-histoquímica. Por haver homologia do receptor Dectina-1 entre ratos (Kato *et al.* 2008), essas diferenças possivelmente podem estar relacionadas as condições experimentais e ao tempo de estudo. É provável que Dectina-1 seja um receptor versátil no sistema imunitário. Neste sentido, Reid *et al* relataram que a expressão Dectina-1 em macrófagos murinos residentes e DCs de pele é baixa em comparação com outras regiões anatômicas (Reid *et al.* 2004). Mais estudos serão necessários para se conhecer se estas condições experimentais ou modelo de infecção influenciaram nos diferentes resultados da expressão de Dectina-1.

O presente estudo sugere que o receptor Dectina-1 pode participar no reconhecimento do *S. schenckii*. Como os mecanismos pelos quais o receptor Dectina-1 participa da infecção por *S. schenckii* ainda não são bem elucidados, para um melhor entendimento se faz necessário aprimorar os estudos utilizando animais “Knockout” ou bloqueadores desse receptor.

6. CONCLUSÕES

- ❖ No nosso estudo podemos sugerir que o receptor dectina-1 participa da resposta imune frente ao fungo *S. schenckii*.
- ❖ As β -glucanas podem atuar como modulador biológico devido a sua capacidade de aumentar a resposta imune.
- ❖ Ocorreu um aumento da produção de H_2O_2 , fagocitose e NO frente a todos os componentes fúngicos, principalmente quando as células foram expostas a Fração F1 e o SSTI.
- ❖ As células dos animais infectados em contato com SSTI e F1 produziram maior quantidade das citocinas IL-10, TNF- α e IL-1 β .
- ❖ Nos macrófagos peritoneais obtidos de animais infectados observou-se maior expressão do receptor de Dectina-1.

7. REFERÊNCIAS

- ABDELSADIK, A., & TRAD, A. Toll-like receptors on the fork roads between innate and adaptive immunity. *Human immunology* 2011, 72,12:1188-1193.
- ABSOLOM, D.R. Basic methods for the study of phagocytosis. In: Di Sabato, G.; Everse, J. *Methods in Enzymology*. Orlando, CA: v.132, 1986, p. 95-180.
- 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.
- ARENAS, R. *Micologia Médica Ilustrada*. México – DF. 1993. Cap. 13: Esporotricosis.: p. 145-151.
- ARNOLD, W.N.; MANN, L.C.; SAKAI, K.H.; GARRISON, R.G.; COLEMAN, P.D. Acid phosphatases of *Sporothrix schenckii*. *Journal of General Microbiology*, v.132; p.3421-3432, 1986.
- BARROS, M.B.L.; SCHUBACH, T.M.P.; COLL, J.O.; GREMIÃO, I.D.; WANKE, B.; SCHUBACH, A. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. *Revista Panamericana de Salud Pública*. Washington, v. 27, n. 6, Jun, p.455-60, 2010.
- BARROS, M. B.; PAES, R. A.; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 24, No. 4 p. 633–654, 2011.
- BAUER S, HARTMANN G, GOODRIDGE HS, UNDERHILL DM: Fungal recognition by TLR2 and Dectin-1. In *Toll-Like Receptors (TLRs) and Innate Immunity*. Edited by Hofmanns F. Berlin, Heidelberg: Springer; 2008:87-109
- BEADLING, C., SLIFKA, M.K. Regulation of innate and adaptive immune responses by the related cytokines IL-12, IL-23, and IL-27. *Arch. Immunol.* 54:15-24, 2006.
- BERKITTEN M., OKAR I., BERKITTEN R. *In vitro* study of the penetration of *Streptococcus sanguis* and *Prevotella intermedia* strain into human dental tubules. *J. Endod.*, v. 26, p.236-239, 2000.
- BETTELLI, E., T. KORN, V.K. KUCHROO. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19 (6):652-7.
- BONIFAZ A, VÁZQUEZ-GONZÁLEZ D. Sporotrichosis: an overview. *G Ital Dermatol Venereol* 2010;145:6509-6657
- BORBA, C.M.; SILVA, A.M.M.; OLIVEIRA, P.C. Long-time survival and morphological stability of preserved *Sporothrix schenckii* strains. *Mycoses*, v.35, p. 185-188, 1992.
- BROWN GD, GORDON S: Immune recognition: a new receptor for [beta]-glucans. *Nature* 2001, 413:36-37.
- BROWN GD: Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol* 2006, 6:33-43.
- BROWN, G. D. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. *Annu. Rev. Immunol.* , 2011. 29, 1–21, 2011.
- BROWN, G. D; DAMBUZA I. M. C-type lectins immunity: recent developments. *Immunology*.2015. 32, 21-27.

- CAMBI, A.; KOOPMAN, M.; FIDGOR, C. G. How C-type lectins detect pathogens. *Cell. Microbiol.*, v. 7, p. 481-488, 2005.
- CAPRILES, C.C.; ESSAYAG, M.S.; LANDER, A.; CAMACHO, R. Experimental pathogenicity of *Sporothrix schenckii* preserved in water (Castellani). *Mycopathologia*, v.122, n.3, p.129-133, 1993.
- CARLOS, I.Z.; SGARBI, D.B.G.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C.S.; SILVA, C.L. Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the systemic form of the disease. *Mycopathologia*, v.117, p.139-144, 1992.
- CARLOS, I.Z.; ZINI, M.M.C.; SGARBI, D.B.G.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C.S.; SILVA, C.L. Disturbances in the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor in disseminated murine sporotrichosis. *Mycopathologia*, v.127, p.189-194, 1994.
- CARLOS, I.Z.; SGARBI, D.B.G.; PLACERES, M.C.P. Host organism defense by a peptide-polysaccharide extracted from the fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*, v.144, n.1, p.9-14, 1999.
- CARLOS, I.Z.; SASSÁ, M.F.; SGARBI, D.B.G.; PLACERES, M.C.P.; MAIA, D.C.G. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. *Mycopathologia*, v.168, p.1-10, 2009.
- CARLOS, I.Z.; SGARBI, D.B.G.; PLACERES, M.C.P. Host organism defense by a peptide-polysaccharide extracted from the fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*, v.144, n.1, p.9-14, 1999.
- CARRADA-BRAVO, TEODORO; OLVERA-MACÍAS, MIGUEL IVÁN. New observations on the ecology and epidemiology of *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Rev Latinoamer Patol Clin*, 2013, Vol. 60.
- CASADEVALL, A.; CASSONE, A.; BISTONI, F.; CUTLER, J.E.; MAGLIANI, W.; MURPHY, J.W.; POLONELLI, L.; ROMANI, L. Antibody and/or cell-mediated immunity, protective mechanisms in fungal disease: an ongoing dilemma or an unnecessary dispute. *Medical Mycology*, v.36, n.1, p.95-105, 1998.
- CASERONE, S.; COMTI-DIAZ, I.A.; ZANETTA, E.; PEREIRA, M.E.P. Serologia de la esporotricosis cutánea. *Sabouraudia*, v.21, p.317-321, 1983.
- CHAFFIN W.L.J; LÓPEZ-RIBOT J.L; CASANOVA M; GOZALBO D; MARTÍNEZ J.P. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: Identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62:130-180.
- CHAKRABARTI A, BONIFAZ A, GUTIERREZ-GALHARDO MC, MOCHIZUKI T, LI S. Global epidemiology of sporotrichosis. *Med Mycol*. 2015; 53(1):3-14.
- CHAN, G.C.F.; CHAN, W. K.; SZE, D. M. Y. The effects of β -glucans on human immune and cancer cell. *Journal of Hematology & Oncology*, London, v.2, n. 25, p.1-11, 2009.
- DENNEHY KM, WILLMENT JA, WILLIAMS DL, BROWN GD: Reciprocal regulation of IL-23 and IL-12 following co-activation of Dectin-1 and TLR signaling pathways. *Eur J Immunol* 2009, 39:1379-1386.
- DENNEHY KM BROWN GD. The role of the beta-glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. *J Leukoc Biol* 2007; 82: 253-8.
- DIXON, D. M.; DUNCAN, R.; HURD, N. J. Use of a mouse model to evaluate clinical and environmental isolates of *Sporothrix* spp. From the largest U.S. Epidemic of sporotrichosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, p. 951-954, 1992.

DONADEL, K.W.; REINOSO, Y.D.; OLIVEIRA, J.C.; AZULAY, R.D. Esporotricose: revisão. An. Bras. Dermatol., v.68, n.1, p.45-52, 1993.

EIGLER, A.; SINHA, B.; HARTMANN, G.; ENDRESS, S. Taming TNF: strategies to restrain this pro inflammatory cytokine. *Immunol. Today.*, v. 18, p. 487-492, 1997.

ESTEVEZ, J.A.; CABRITA, J.D.; NOBRE, G.N. Micologia Médica. 2ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1990. 1058 p.

FARAH, C. S.; SAUNUS, J. M.; HU, Y.; KAZOULLIS, A.; ASHMAN, R. B. Gene targeting demonstrates that inducible nitric oxide synthase is not essential for resistance to oral candidiasis in mice, or for killing of *Candida albicans* by macrophages in vitro. *Oral microbiology and Immunology*, Copenhagen, v. 24, n. 1, p. 83-88, 2009

FERNANDES GF, DOS SANTOS PO, RODRIGUES AM, SASAKI AA, BURGER E, DE CAMARGO ZP. Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. *Virulence*. 2013;4:241-9.

FERNANDES, K. S.; MATHEWS, H. L.; BEZERRA, L. Differences in virulence of *Sporothrix schenckii* conidia related to culture conditions and cell-wall components. *Journal Medical Microbiology*, v.48, p.195-203, 1999.

FERREIRA KS, BASTOS KR, RUSSO M, ALMEIDA SR. Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and pulmonary dendritic cells induces interleukin-10 production and toll-like receptor-2 expression: possible mechanisms of susceptibility. *J Infect Dis* 2007; 196: 1108-15.

FERREIRA, L.S.; GONÇALVES, A.C.; PORTUONDO, D.L.; MAIA, D.C.G.; PLACERES, M.C.P.; BATISTADUHARTE, A.; CARLOS, I.Z.. Optimal clearance of *Sporothrix schenckii* requires an intact Th17 response in a mouse model of systemic infection. *Immunobiology*, 2015.

FISCHER, F.; COOK, N.B. Fungos subcutâneos. *Micologia: fundamentos e diagnóstico*. Rio de Janeiro, Revinter, cap 6, p.153-192, 2001.

FREITAS, D. F. S. F.; LIMA, I. A. R.; CURI, C. L.; JORDÃO, L.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; VALLE, A. C. F.; GALHARDO, M. C. G.; CURI, A. L. L. Acute dacryocystitis: another clinical manifestation of sporotrichosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.109, n.2, p.262-264, 2014.

FREITAS, D. F.; DO VALLE, A. C.; DE ALMEIDA PAES, R.; BASTOS, F. I.; GALHARDO, M. C. Zoonotic Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: a protracted epidemic yet to be curbed. *Clin Infect Dis.*, v.50, n.3, p.453, 2011.

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. *Sporothrix schenckii* meningitis in AIDS during immune reconstitution syndrome. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2010, 81: 696-699.

GONÇALVES, A. C.; MAIA, D. C.; FERREIRA, L. S.; MONNAZZI, L. G.; ALEGRANCI, P.; PLACERES, M. C.; BATISTA-DUHARTE, A.; CARLOS, I. Z. Involvement of major components from *Sporothrix schenckii* cell wall in the caspase-1 activation, nitric oxide and cytokines production during experimental sporotrichosis. *Mycopathologia*. v.179, p.21-30, 2015.

GANTNER BN, SIMMONS RM, CANAVERA SJ, AKIRA S, UNDERHILL DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* 2003; 197: 1107-17.

- 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.
- GOODRIDGE, H.S., WOLF, A.J., UNDERHILL, D.M. (2009). Beta-glucan recognition by the innate immune system. *Immunol. Rev.* 230, 38–50. doi: 10.1111/j.1600065X.2009.00793.x
- GOUPIL, M.; TRUELLE, E. B.; DUGAS, V.; RACICOT-BERGERON, C.; AUMONT, F.; SÉNÉCHAL, S.; HANNA, Z.; JOLICOEUR, P.; REPENTIGNY, L. Macrophage-mediated responses to *Candida albicans* in mice expressing the human immunodeficiency virus type 1 transgene. *Infection and Immunity*, Washington, v. 77, n. 9, p. 4136-4149, 2009.
- GREMIÃO, I. D., MENEZES, R. C., SCHUBACH, T. M., FIGUEIREDO, A. B., CAVALCANTI, M. C., & PEREIRA, S. A. Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. *Medical mycology*, 2014, 53(1), 15-21.
- HARRINGTON, L.E., P.R.MANGAN, C.T. WEAVER. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol*, 2006, 18 (3):349-56.
- HARDISON SE, BROWN GD. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nat Immunol* 2012; 139:817–22
- HEINSBROEK SEM, TAYLOR PR, ROSAS M, WILLMENT JA, WILLIAMS DL, GORDON S, BROWN GD: Expression of functionally different Dectin-1 isoforms by murine macrophages. *J Immunol* 2006, 176:5513-5518.
- HERNANDEZ-SANTOS N, GAFFEN SL (2012) Th17 cells in immunity to *Candida albicans*. *Cell Host and Microbe* 11: 425–435.
- HIBBS, J.B. Jr; TAINTOR, R. R; VAVRIN, Z; GRANGER, D. L; DRAPIER, J.C; AMBER, I. J; LANCASTER, J. R. Jr. Synthesis of nitric oxide from a terminal guanidino nitrogen atom of L-arginine: a molecular mechanism regulation cellular proliferation that targets intracellular iron. In MONCADA, S.; Higgs, E.A. *Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory system*. Amsterdam: Elsevier, 1990. P. 189-223.
- HIBBS, J. B. Jr.; WESTENFELDER, C; TAINTOR, R.R.; VAVRIN, Z.; KABLITZ, C.; BARANOWSKI, J. H.; WARD, R. L.; MENLOVE, R.L.; MCMURRY, M. P.; KUSHNER, J.P.; SAMLOWSKI, W. Evidence for cytokine- inducible nitric oxide synthesis from L- arginine in patients receiving interleukin-2 therapy. *J. Clin. Invest.*, v. 89, p.867-877, 1992.
- HOGAN, L.H.; KLEIN, B.S.; LEVITZ, S.M. Virulence factors of medically important fungi. *Clinical Microbiology Reviews*, v.9, n.4, p.469-488, 1996.
- HOLLAND, R.; SOUZA, V. Ability of a new calcium hydroxide root canal filling material to induce hard tissue formation. *J. Endod.*, v. 11, p. 535-543, 1985.
- HUGHES CE, POLLITT AY, MORI J, EBLE JA, TOMLINSON MG, HARTWIG JH, O'CALLAGHAN CA, FUTTERER K, WATSON SP: CLEC-2 activates Syk through dimerization. *Blood* 2010, 115:2947-2955.
- JIMENEZ-A MD, VIRIYAKOSOL S, WALLS L, DATTA SK, KIRKLAND T, HEINSBROEK SEM, BROWN G, FIERER J: Susceptibility to *Coccidioides* species in C57BL/6 mice is associated with expression of a truncated splice variant of Dectin-1 (Clec7a). *Genes Immun* 2008, 9:338-348.
- KANETSUNA F, CARBONELL LM, MORENO RE, RODRIGUES J. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol.* 1969;97:1036–41
- KANETSUNA F., CARBONELL L. M. Cell wall glucan of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal Bacteriol.*, 101(3), 675-680, Mar, 1970.

- KANETSUNA F., CARBONELL L. M., AZUMA I., YAMAMURA Y. Biochemical studies on thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal Bacteriol.*, 110(1), 208-18, Apr, 1972.
- KATO Y, ADACHI Y, OHNO N. Characterization of rat beta-glucan receptor Dectin-1. *Microbiol Immunol.* 2008;52(8):418-28.
- KAUFFMAN, C.A. Sporotrichosis. *Clinical Infectious Diseases*, v.29, n.2, p.231-236, 1999.
- KNOW-CHUNG, K. J.; BENNETT, J.E. *Medical Mycology*. Lea & Fibeger, Philadelphia, 1992, 866p.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, V.C.; WINN, W.C. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5^a ed. Philadelphia: Lippincott, 1997. 1395 p.
- KORN, T., OUKKA, M., KUCHROO, V., BETTELLI, E. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol.*; 19(6):362-371, 2007.
- KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M. IL-17 and Th17 cells. *Annu. Rev. Immunol.* v.27, p.485–517, 2009.
- KOVALOVSKY D, REFOJO D, HOLSBOER F, ARZT E. Molecular mechanisms and Th1/Th2 pathways in corticosteroid regulation of cytokine production. *J Neuroimmunol* 2000; 109: 23–29
- KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol.*, v.30, n.1, p.16–34, 2011.
- KWON-CHUNG, K.; BENNETT, J.. Sporotrichosis. *Medical Mycology*. Ed. Philadelphia: Lea & Febiger. p.707-729. 1992.
- LA HOZ, R. M.; BADDLEY, J. W. Subcutaneous Fungal Infections. *Curr Infect Dis Rep*, v.14, p.530–539, 2012.
- LACAZ, CS; PORTO, E; MARTINS, JEC; HEINS-VACCARI, EM; MELO, NT. *Tratado de Micologia Médica*, Ed: Savier, São Paulo, 9^a ed., 2002, p.479-497.
- LEIBUNDGUT-LANDMANN S, GROSS O, ROBINSON MJ. Syk- and CARD9dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol.* 2007; 8(6):549-51.
- LEVITZ, S. M. Innate recognition of fungal cell walls. *PLoS Pathog.* v.6:e1000758. 2010.
- LIMA, O.C.; FIGUEIREDO, C.C.; PEREIRA, B.A.S.; COELHO, M.G.P.; MORANDI, V.; LOPES-BEZERRA, L.M. Adhesion of the human pathogen *Sporothrix schenckii* to several extracellular matrix proteins. *Brazilian Journal of Medical and Biological*, v.32, n.5, p. 651-657, 1999.
- LLOYD, K.O.; BITTON, M.A. Isolation and purification of a peptido-rhamnomannan from yeast form of *Sporothrix schenckii*. Structural and immunochemical studies. *J. immunol.* v.7, p.663-671, 1971.
- LLUIE ID, FUNARI VA, TAYLOR KD, NGUYEN Q, REYES CN, et al. (2012) Interactions between commensal fungi and the C-type lectin receptor Dectin-1 influence colitis. *Science* 336: 1314–1317.
- LOPES-BEZERRA, L; SCHUBACH, A; ROSANE, COSTA, O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 78, p. 293-308, 2006.
- LOPES-BEZERRA, L.M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R.O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Anais Acadêmicos Brasileiros de Ciência*. Rio de Janeiro, v. 78, n.2, 2006.

- LOPEZ-ROMERO, E.; REYES-MONTES, M. R. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. *Future Microbiol.*, v.6, n.1, Jan, p.85-102. 2011.
- LOURES, F. V., ARAÚJO, E. F., FERIOTTI, C., BAZAN, S. B., AND CALICH, V. L. G. TLR-4 cooperates with dectin-1 and mannose receptor to expand Th17 and Tc17 cells induced by *Paracoccidioides brasiliensis* stimulated dendritic cells. *Front. Microbiol.* 6:261, 2015.
- LOURES, F. V., ARAÚJO, E. F., FERIOTTI, C., BAZAN, S. B., COSTA, T. A., BROWN, G. D. Dectin-1 induces M1 macrophages and prominent expansion of CD8+IL-17+ cells in pulmonary *Paracoccidioidomycosis*. *J. Infect. Dis.* 210, 762–773, 2014.
- MADRID, I.M.; MATTEI, A.S.; MARTINS, A.A.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A. Feline sporotrichosis in the Southern region of Rio Grande do Sul, Brazil: clinical, zoonotic and therapeutic aspects. *Zoonoses and Public Health*, v.57, p.151-154, 2010a.
- MADRID, I. M.; MATTEI, A. S.; XAVIER, M. O.; GUIM, T. N.; FERNANDES, C. G.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M.C.A. Role of melanin in the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis. *Microbes and Infection*, v.1, p.:162-165, 2010b.
- MADRID, I.M.; MATTEI, A.S.; FERNANDES, C.G.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A. Epidemiological Findings and Laboratory Evaluation of Sporotrichosis: A Description of 103 Cases in Cats and Dogs in Southern Brazil. *Mycopathologia*. 2011.
- MAIA, D.C.G.; SASSÁ, M.F.; PLACERES, M.C.P.; CARLOS, I.Z. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*, v.161, p.11-19, 2006.
- MARIMON, R.; CANO, J. et al. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *Journal of Clinical Microbiology*, v.45, n.10, Oct, p.3198-206. 2007.
- MARIMON, R.; GENE, J. et al. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.44, n.9, Sep, p.3251-6. 2006.
- MARIMON, R.; SERENA, C. et al. In vitro antifungal susceptibilities of five species of sporothrix. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.52, n.2, Feb, p.732-4. 2008.
- MALE, D.; ROIT, I. Introdução ao sistema imune. In: ROITT, I; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Imunologia.*, cap 1, 3º ed, Manole Ltda, São Paulo, p. 1-12, 1994.
- MEIRELES, M. C. A. & NASCENTE, P. S. *Micologia veterinária*. Pelotas: Ed.Universitária UFPel, 2009.
- MCGEACHY, M.J; CUA, D.J. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity*, v.28, p.445-453, 2008.
- MORRIS-JONES, R. Sporotrichosis. *Clin. Exp. Dermatol.* 2002.v.27, p.427–431.
- NASCIMENTO, R.C.; ALMEIDA, S.R. Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis. *Immunology and Medical Microbiology*, v.43, p.241-247, 2005
- NAUSEEF, W. M.; METCALF, J. A.; ROOT, R. K. Role of myeloperoxidase in the respiratory burst of human neutrophils. *Blood*. v 61, n 3, p 483-492, march., 1983

NEGRINI, T.C; FERREIRA, L.S; ALEGRANCI P; ARTHUR R.A; SUNDFELD P.P; MAIA D.C.G; SPOLIDORIO, L.C.; CARLOS, I.Z. Role of TLR-2 and Fungal Surface Antigens on Innate Immune Response Against *Sporothrix schenckii*. Immunological Investigations, 2013; 42(1): 36–48

NEGRINI T, FERREIRA LS, ARTHUR RA, ALEGRANCI P, PLACERES MC, SPOLIDORIO LC, CARLOS IZ. Influence of TLR-2 in the immune response in the infection induced by fungus *Sporothrix schenckii*. Immunol Invest. 2014;43(4):370-90.

NEGRINI T, FERREIRA LS, ARTHUR RA, ALEGRANCI P, PLACERES MC, SPOLIDORIO LC, CARLOS IZ. Influence of TLR-2 in the imune response in the infection induced by fungus *Sporothrix schenckii*. Immunol Invest. 2014;43(4):370-90.

NETEA, M.G. et al. Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors. Curr Pharm Des. 2006; 12 (32): 4195-201.

NETEA MG, BROWN GD, KULLBERG BJ, GOW NA. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. Nat Rev Microbiol 2008; 6:67–78

NOBEN-TRAUTH, N. Conventional naive CD4+ T cells provide na initial source of IL-4 during Th2 differentiation. J. Immunol.; 165:3620-3625, 2000.

NOBRE, M.O.; ANTUNES, T.A.; MEIRELES, M.C.A.; FERREIRO, L. Production and evaluation of albino mutants of *Sporothrix schenckii* Acta Scientiae Veterinariae, 32(2), p.119-123, 2004.

OLIVEIRA, M. M.; ALMEIDA-PAES, R.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Molecular identification of the *Sporothrix schenckii* complex. Rev Iberoam Micol. v.31, n.1, p.2–6, 2014.

OLYNYCH T. J; JAKEMAN D.L; MARSHALL J. S. Fungal zymosan induces leukotriene production by human mast cells through a dectin-1- dependent mechanism. J Allergy Clin Immunol. 2006, 118(4):837-43.

O’GARRA A, ARAI N. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell diferentiation. Trends Cell Biol 2000; 10:541 542–550.

PAIVA-OLIVEIRA, E. L.; SILVA, A. C.; SILVA, R. M.; SEVENINI, L. M; MELO, H. A.; LAGROTA-CANDIDO, J.; QUIRICO-SANTOS, T. Inflammasome and its clinical impact: literature review. Revista de Ciências Médicas e Biológicas, v.11, n.1, p.96-102, 2012.

PHILPOTT, D. J.; YAMAOKA, S.; ISRAEL, A.; SANSONETTI, P. J. Invasive *Shigella flexneri* activates NF-Kappa B through a lipopolysaccharide – dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. J Immunol, v.165, p.903-914, 2000.

RAMASARMA, T. H₂O₂ has a role in cellular regulation. Indian J.Biochem. Biophys., v. 27, p. 269-274, 1990.

RAPPLEYE C. A., EISSENBERG L. G., GOLDMAN W. E. Histoplasma capsulatum α -(1-3)-glucan blocks innate immune recognition by the β -glucan receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 4 (104), 1366-70, Jan 23, 2007 .

REID DM, MONTOYA M, TAYLOR PR, BORROW P, GORDON S, BROWN GD, WONG SY. Expression of the beta-glucan receptor, Dectin-1, on murine leukocytes in situ correlates with

its function in pathogen recognition and reveals potential roles in leukocyte interactions. *J Leukoc Biol.* 2004;76(1):86-94.

REIS-GOMES, A.; MADRID, I. M.; MATOS, C. B.; TELLES, A. J.; WALLER, S. B.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Dermatopatias fúngicas: aspectos clínicos, diagnósticos e terapêuticos. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.6, n.4, p.272-284, 2012.

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

RIPPON, J. Sporotrichosis. In: J. Rippon (Ed.). *Medical Mycology - The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1988. Sporotrichosis, p.325-352.

ROBERTS, G.D.; HOWARD, W.L. The serologic diagnosis of extracutaneous sporotrichosis. *Am. J. Clin. Pathol.*, v.56, n.5, p.597-600, 1971.

RODRIGUES, A.M., DE HOOG, G.S., DE CÁSSIA PIRES, D. Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. *BMC Infect. Dis.*, 2014. 14(1):219.

RODRIGUES AM, TEIXEIRA MDM, DE HOOG GS, SCHUBACH TMP, PEREIRA SA, *et al.* Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013, 7(6): e2281.

RODRIGUES, A. M., KUBITSCHKE-BARREIRA, P. H., FERNANDES, G. F., DE ALMEIDA, S. R., LOPES-BEZERRA, L. M., & DE CAMARGO, Z. P. Immunoproteomic analysis reveals a convergent humoral response signature in the *Sporothrix schenckii* complex. *Journal of proteomics* 2015, 115, 8-22.

RODRIGUES, A. M.; HOOG, S.; CAMARGO, Z. P. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Medical Mycology*, v.51, 405-412, 2013.

ROILIDES, E.; DIGNANI, M.C.; ANAÏSSIE, E.J.; REX, J.H. The role of immunoreconstitution in the management of refractory opportunistic fungal infections. *Medical Mycology*, v.36, supplement 1, p. 12-25, 1998.

ROMAGNANI, S., MAGGI, E., LIOTTA, F., COSMI, L., ANNUNZIATO, F. Properties and origin of human Th17 cells. *Molecular Immunology*. 47:3-7, 2009.

ROMANI L. Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* v.11, p.275-288, 2011.

ROMANI L. Cell mediated immunity to fungi: a reassessment. *Med Mycol* 2008; 12:1-15

ROMEO, O.; CRISEO, G. What lies beyond genetic diversity in *Sporothrix schenckii* species complex? *Virulence*, 4:3, 1-4, 2013.

ROMERO-MARTINEZ, R.; WHEELER, M.; GUERRERO-PLATA, A.; RICO, G.; TORRES-GUERRERO, H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infection and Immunity*; v.68, n.6, p.3696-3703, 2000.

SASSÁ MF, SATURI AE, SOUZA LF, RIBEIRO LC, SGARBI DB, CARLOS IZ. Response of macrophage toll-like receptor 4 to a *Sporothrix schenckii* lipid extract during experimental sporotrichosis. *Immunology*. 2009;128(2):301-9.

SASSÁ, M. F., FERREIRA, L. S., DE ABREU RIBEIRO, L. C., CARLOS, I. Z. Immune response against *Sporothrix schenckii* in TLR-4-deficient mice. *Mycopathologia* 2012, 174(1), 21-30.

- SEVERIN S, POLLITT AY, NAVARRO-NUNEZ L, NASH CA, MOURAO-SA D, EBLE JA, SENIS YA, WATSON SP: Syk-dependent phosphorylation of CLEC-2: a novel mechanism of HEM-immunoreceptor tyrosine-based activation motif signaling. *J Biol Chem* 2011, 286:4107-4116.
- SCHUBACH, A.; BARROS, M.B.; WANKE, B. Epidemic sporotrichosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, v.21, n.2, p.129-133, 2008.
- SCHUBACH, T. M.; SCHUBACH, A. O. Esporotricose em cães e gatos-revisão. *Rev Clín Vet.* 29(5):21-24. 2000.
- SCHUBACH, T. M. et al. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998–2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 224: 1623–1629. 2004.
- SHAW D. R; FRIFFIN F. M. Antibody-independent phagocytosis. In ADAMS D. O.; ELSON P. J.; KOREN H. (eds). *Methods for studying mononuclear phagocytes*. London; Academic Press, 1981.
- SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. *Micologia Médica a Luz de Autores Contemporâneos*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004. 388 p.
- SONCK, E.; STUYVEN, E.; GODDEERIS, B.; COX, E. The effect of β -glucans on porcine leukocyte. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Amsterdam, v. 135, p. 199-207, 2010.
- STEELE C, RAPAKA RR, METZ A, POP SM, WILLIAMS DL, GORDON S, KOLLS JK, BROWN GD. The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* 2005 Dec;1(4):e42.
- TAYLOR P. R; BROWN G. D; REID D. M; WILLMENT J. A; MARTINEZ-POMARES L; GORDON S; WONG S. Y. The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol.* 2002; 169(7):3876-82.
- TAYLOR P. R., TSONI S. V., WILLMENT J. A., DENNEHY K. M., ROSAS M., FINDOM H., HAYNES K., STEELE C., BOTTO M., GORDON S., BROWN G. D. Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol.*, 8(1), 31-8, Jan, 2007.
- TRAVASSOS L. R; GORIN P. A. J, LLOYD K.O. Comparison of the Rhamnomannans from the Human Pathogen *Sporothrix schenckii* with Those from the *Ceratocystis* Species. *Infect. Immun.* 1973, 8(5):685.
- UNDERHILL DM; OZINSKY A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:825-52. Epub 2001 Dec 7.
- 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. The macrophage mannose receptor induces il-17 in response to *Candida albicans*. *Cell Host & Microbe* v.5, p.329–340, 2009.
- VÁSQUEZ-del-MERCADO, E.; ARENAS, R.; PaADILLA-DESGARENES, C. Sporotrichosis. *Clinics in Dermatology*. v.30, p. 443-447, 2012.
- 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: 788794.
- VEERDONK, F. L.; JOOSTEN, L. A.; NETEA, M. G. The interplay between inflammasome activation and antifungal host defense. *Immunological Reviews* v.265, p.172–180, 2015.

- XIAO,Z.; TRINCADO, C.A.; MURTAUGH, M. P. β -glucan enhancement of T cell IFN γ response in swine. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Amsterdam, v.102, p.315-320, 2004.
- WALRAND, S., VALEIX, S., RODRIGUEZ, C., LIGOT, P., CHASSAGNE, J., VASSON, M.P., 2003. Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. *Clin. Chim. Acta* 331 (1–2), 103–110.
- WANG, Z., WANG, Y., ZHU, K., GUO, L., YANG, Y. Mechanism of three inhibitors of TACE in blocking the converting of pro-TNF alpha into sTNF alpha. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.*; 23(2):116-120,2003.
- WEAVER, C.T., HATTON, R.D., MANGAN, P.R., HARRINGTON, L.E. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol.*;25:821-852,2007.
- WELSH, R.D.; DOLAN, C.T. *Sporothrix* whole yeast agglutination test: low-titer reaction of sera of subjects not know to have sporothrichosis. *Am. J. Clin. Pathol.*, v.59, n.1, p.82-85, 1973.
- WERNER J, GESSNER , LILLY L, NELSON M, METZ A, HORN D, DESHANE J, CHAPLIN , BROWN G, WEAVER C, STEELE CH. Mechanisms of Dectin-1 dependent IL-17A production during invasive fungal infection. *The Journal of Immunology*, 2011, 186, 56.14.
- WILLMENT J.A.;MARSHALL A. S; REID D. M; WILLIAMS D. L; WONG S. Y; GORDON S; BROWN G. D. The human beta-glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine dectin-1 on primary cells. *Eur J Immunol.* 2005;35(5):1539-47.
- WINK D.A; MITCHELL, J.B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free. Rad. Biol. Med.*, v. 25, p. 434-456, 1998.
- YOSHIIKE,T.; LEI, P.; KOMATSUZAKI,H.; OGAWA, H. Antibody raised against extracellular proteinases of *Sporothrix schenckii* in *S. schenckii* inoculated hairless mice. *Mycophatologia*, v. 123, n.2, p. 69-73, 1993.
- ZAITZ, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S.A.; RUIZ, L.R.B.; FRAMIL, V.M.S. *Compêndio de Micologia Médica*. 2^a Ed.. Rio de Janeiro: Editora Guanabara – Koogan, 2010. 432 p.
- ZHANG X, ZHANG J, HUANG H, XUE R, HU X, LI M, ZHONG Y, YUAN L. *Taenia taeniaeformis* in rat favors protracted skin lesions caused by *Sporothrix schenckii* infection: Dectin-1 and IL-17 are dispensable for clearance of this fungus. [PLoS One](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172514). 2012;7(12):e52514
- ZHAO M.D., XUN ZHOU, LIU T.T., YANG Z. B. Morphological and physiological comparison of taxa comprising the *Sporothrix schenckii* complex. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*, 2015 16(11):940-947.