



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

Programa de Pós-graduação Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

**Envolvimento do inflamassoma e citocinas na resposta
imunológica em infecção induzida pelo fungo
*Sporothrix schenckii***

Amanda Costa Gonçalves

Araraquara
2013



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

Programa de Pós-graduação Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

Amanda Costa Gonçalves

**Envolvimento do inflamassoma e citocinas na resposta
imunológica em infecção induzida pelo fungo**

Sporothrix schenckii

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área de concentração Imunologia Clínica.

Orientadora: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

Co-orientadora: Prof. Dra. Danielle Cardoso Geraldo Maia

Araraquara
2013

Ficha Catalográfica

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

G635e Gonçalves, Amanda Costa
 Envolvimento do inflamassoma e citocinas na resposta imunológica em
 infecção induzida pelo fungo *Sporothrix schenckii* / Amanda Costa
 Gonçalves. – Araraquara, 2013
 121 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
 Coorientador: Danielle Cardoso Geraldo Maia

 1. Citocinas. 2. Esporotricose. 3. Inflamassoma. 4. Óxido nítrico. 5.
 Resposta imune. I. Carlos, Iracilda Zeppone, orient. II. Maia, Danielle
 Cardoso Geraldo, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida:

*Aos meus pais **Mara Irida e José Roberto**
que não mediram esforços para a realização de mais esta etapa.*

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

Agradecimentos

A **Deus**, por sempre estar sempre presente em minha vida, iluminando e guiando meus caminhos e pela certeza que tudo daria certo.

À **Profa Dra Iracilda Zeppone Carlos**, pela orientação durante estes anos, oportunidade, confiança, e por tornar possível essa conquista acadêmica. A sua experiência e seu conhecimento sempre serão, para mim, referências de profissionalismo. Obrigada!

À minha amiga e co-orientadora, **Prof Dra Danielle Cardoso Geraldo Maia**, pela ajuda durante todas as etapas, companhia diária, paciência, apoio, amizade, conversas noite a fora e diversos conselhos. Adoro você!

À **Marisa Campos Polesi Placeres** por toda ajuda e atenção, que teve importante colaboração para o desenvolvimento desse trabalho. Má, muito obrigada!

A grande amiga com quem tive o prazer de conviver durante grande parte deste trabalho, **Marcela Bassi Quiles**. Vêio, você é firmeza demais!

Ao companheiro de trabalho **Lucas Souza Ferreira** pela ajuda nas infinitas inoculações com tioglicolato e coleta de sobrenadantes. Valeu, Lucas!

À equipe do **Laboratório de Imunologia Clínica**: Marcela, Lívia, Carol, Camila, Aline, Djamilé, Pámela, Taís, Débora, Deyves, Mauro, José Carlos e Adam pelos momentos que compartilhamos. Vocês são jóias!

Ao **Prof. Dr. Luis Gustavo Silva Monnazzi**, que me ajudou muito em meus experimentos de citometria e estava sempre pronto a ajudar.

Aos meus pais, **Mara Izilda e José Roberto**, por todo incentivo nesta etapa. Obrigada por mais esta oportunidade!

Ao meu namorado, **Ricardo**, sempre me apoiando e me aturando nos momentos mais difíceis. Você me faz feliz!

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela concessão da bolsa.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, cujos nomes não foram citados, mas sabem da sua importância para que este dia chegasse.

Muito obrigada a todos!

*Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas,
eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de
caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito*

(Chico Xavier)

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas	8
Lista de Figuras.....	10
Lista de Tabelas	12
Resumo	14
Abstract	15
Capítulo I	
1. Introdução	17
2. Revisão Bibliográfica	20
2.1. <i>Sporothrix schenckii</i> e esporotricose	20
2.2. Sistema imunológico	24
2.3. Inflamassoma	29
3. Objetivos Gerais	32
3.1 Objetivos específicos	32
4. Materiais e Métodos	33
4.1. Delineamento experimental	33
4.2. Microrganismo e condições de cultura	35
4.3. Animais	35
4.4. Grupos experimentais	35
4.5. Obtenção dos antígenos de <i>S. schenckii</i>	35
4.5.1. Extrato lipídico	36
4.5.2. Fração álcali-insolúvel	36
4.6. Obtenção das células do exsudato peritoneal	36
4.7. Obtenção dos esplenócitos totais	37
4.8. Obtenção do sobrenadante da cocultura celular	37

4.9. Avaliação da viabilidade das células do exsudato peritoneal	38
4.10. Avaliação da viabilidade dos esplenócitos totais	38
4.11. Determinação da produção de óxido nítrico	39
4.12. Ativação de caspase-1 mediada por inflamassoma	40
4.13. Determinação da liberação de citocinas	41
4.14. Análise estatística	41
5. Resultados	43
5.1. Determinação da viabilidade das células do exsudato peritoneal	43
5.2. Determinação da viabilidade dos esplenócitos totais	45
5.3. Determinação da produção de óxido nítrico	47
5.4. Determinação da caspase-1 ativa mediada pelo inflamassoma	49
5.5. Determinação da produção de IL-1 β	52
5.6. Determinação da produção de IL-18	54
5.7. Determinação da produção de IFN- γ	56
5.8. Determinação da produção de IL-17	58
5.9. Determinação da produção de IL-23	60
5.10. Determinação da produção de TGF- β	62
6. Discussão	64
7. Conclusões	75
8. Referências Bibliográficas	76
Anexo I. Tabelas.....	88
Anexo II. Comitê de ética	92
Capítulo II	
Artigo Científico	94

Lista de Abreviaturas e Siglas

µg - Micrograma

µL - Microlitro

µmols – Micromols

°C – Graus Celsius

APC – Células apresentadoras de antígenos

ASC – Proteína associada à apoptose

ATP – Adenosina trifosfato

BHI – “Brain heart infusion”

Con-A – Concanavalina A

CO₂ – Dióxido de Carbono

CLC – “Lectina-C receptors”

DC – Células dendríticas

EL – Extrato lipídico obtido a partir de leveduras do fungo *S. schenckii*

ELISA – “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”

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

Flica - Reagente “carboxyfluorescein”

g - Força gravitacional

g – Grama

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

h - horas

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

IFN-γ - Interferon gama

IL – Interleucina

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

kDa – Quilodaltons

LPS – Lipopolissacarídeo

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

mL - Mililitro

mM – Milimolar

min – Minutos

mg – Miligrama

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
nm - Nanômetro
NaCl - Cloreto de sódio
NaNO₂ – Nitrito de sódio
NaOH - Hidróxido de sódio
NK - “Natural Killer”
NO - Óxido Nítrico
NLR – “NOD-like receptors”
PAMPs – “Pathogen-associated molecular patterns”
PBS - Solução salina tamponada de fosfatos
PEC - Células do exsudato peritoneal
pg – Picogramas
pmol – Picomol
PRR – “Pattern recognition receptor”
q.s.p – Quantidade suficiente para
RLR – “Rig-like receptors”
Rpm – Rotações por minutos
ROI – Intermediários reativos do oxigênio
RNI – Intermediários reativos do nitrogênio
SD - Desvio padrão
TGF-β - “Transforming Growth Factor ”
Th – Linfócito T helper
TLR – “Toll-like receptor”
TNF-α - Fator de necrose tumoral alfa
Treg – Linfócitos T reguladores
UV - Ultra-violeta

Lista de Figuras

Figura 1 – Delineamento experimental	34
Figura 2 – Viabilidade das células do exsudato peritoneal após aderência de camundongos Balb/c infectados e não infectados com o fungo <i>S. schenckii</i> durante oito semanas	44
Figura 3 – Viabilidade dos esplenócitos totais de camundongos Balb/c infectados e não infectados com o fungo <i>S. schenckii</i> durante oito semanas	46
Figura 4 – Produção de NO em cultura de células do exsudato peritoneal (PEC), após aderência, de camundongos Balb/c infectados e não infectados com o fungo <i>S. schenckii</i> durante oito semanas	48
Figura 5 – Determinação de caspase-1 ativa mediada pelo inflamassoma nas células do exsudato epritoneal, após aderência, de camundongos Balb/c infectados e não infectados com o fungo <i>S. schenckii</i> durante oito semanas	50
Figura 6 – Histogramas e gráficos “dot plots” representativos dos controles de calibração do citometro de fluxo nas células do exsudato peritoneal, após a aderência, obtidas de camundongos Balb/c infectados pelo fungo <i>S. schenckii</i>	51
Figura 7 – Histogramas e gráficos “dot plots” representativos dos controles de calibração do citometro de fluxo nas células do exsudato peritoneal, após a aderência, obtidas de camundongos Balb/c não infectados pelo fungo <i>S. schenckii</i>	51
Figura 8 – Concentração de IL-1 β liberada no sobrenadante da cocultura de células do exsudato peritoneal, após aderência, e esplenócitos totais de camundongos Balb/c infectados e não infectados com o fungo <i>S. schenckii</i> durante oito semanas	53
Figura 9 – Concentração de IL-18 liberada no sobrenadante da cocultura de células do exsudato peritoneal, após aderência, e esplenócitos totais de camundongos Balb/c infectados e não infectados com o fungo <i>S. schenckii</i> durante oito semanas	55
Figura 10 – Concentração de IFN- γ liberado no sobrenadante da cocultura de células do exsudato peritoneal, após aderência, e esplenócitos totais de camundongos Balb/c infectados e não infectados com o fungo <i>S. schenckii</i> durante oito semanas	57
Figura 11 – Concentração de IL-17 liberada no sobrenadante da cocultura de células do exsudato peritoneal, após aderência, e esplenócitos totais de camundongos Balb/c infectados e não infectados com o fungo <i>S. schenckii</i> durante oito semanas	59

Figura 12 – Concentração de IL-23 liberada no sobrenadante da cocultura de células do exsudato peritoneal, após aderência, e esplenócitos totais de camundongos Balb/c infectados e não infectados com o fungo <i>S. schenckii</i> durante oito semanas	61
Figura 13 - Concentração de TGF- β liberado no sobrenadante da cocultura de células do exsudato peritoneal, após aderência, e esplenócitos totais de camundongos Balb/c infectados e não infectados com o fungo <i>S. schenckii</i> durante oito semanas	63

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Médias e desvio padrão dos valores da viabilidade das PECs dos animais infectados	88
Tabela 2 – Médias e desvio padrão dos valores da viabilidade das PECs dos animais normais	88
Tabela 3 – Médias e desvio padrão dos valores da viabilidade dos esplenócitos totais dos animais infectados	88
Tabela 4 – Médias e desvio padrão dos valores da viabilidade dos esplenócitos totais dos animais normais	88
Tabela 5 – Médias e desvio padrão dos valores da produção de NO pelas PECs dos animais infectados	88
Tabela 6 – Médias e desvio padrão dos valores da produção de NO pelas PECs dos animais normais	89
Tabela 7 – Médias e desvio padrão dos valores percentuais de capase-1 ativa nos animais infectados	89
Tabela 8 – Médias e desvio padrão dos valores percentuais de capase-1 ativa nos animais normais	89
Tabela 9 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de IL-1 β pelos animais infectados	89
Tabela 10 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de IL-1 β pelos animais normais	89
Tabela 11 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de IL-18 pelos animais infectados	90
Tabela 12 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de IL-18 pelos animais normais	90
Tabela 13 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de INF- γ pelos animais infectados	90
Tabela 14 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de INF- γ pelos animais normais	90
Tabela 15 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de IL-17 pelos animais infectados	90
Tabela 16 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de IL-17 pelos animais normais	91

Tabela 17 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de IL-23 pelos animais infectados	91
Tabela 18 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de IL-23 pelos animais normais	91
Tabela 19 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de TGF- β pelos animais infectados	91
Tabela 20 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de TGF- β pelos animais normais	91

Resumo

A esporotricose é uma doença micótica causada pelo fungo termodimórfico *Sporothrix schenckii*. A resposta imune inata permite o reconhecimento de um amplo espectro de agentes patogênicos através dos PRRs, como os NLRs. Esses receptores, moléculas adaptadoras ASC e proteases caspase-1 formam os inflamassomas, complexo multiprotéico responsável pela maturação da IL-1 β e IL-18. Evidências experimentais mostram que o inflamassoma tem importante papel na defesa antifúngica do hospedeiro, entretanto não há informações disponíveis sobre seu envolvimento em infecções causadas pelo *S. schenckii*. A indução da imunidade celular depende da interação entre antígenos, macrófagos e linfócitos, pois quando ativadas essas populações celulares liberam mediadores imunológicos, estabelecendo uma ligação entre as respostas imunológicas inata e a adaptativa. O objetivo deste trabalho foi avaliar o envolvimento do inflamassoma, por meio da determinação de caspase-1, e citocinas na resposta imunológica induzida pelo fungo *S. schenckii* em modelo experimental de esporotricose sistêmica utilizando camundongos Balb/c infectados e não infectados durante oito semanas. Os resultados encontrados mostraram que entre a 4^a e 6^a semanas de infecção ocorre imunossupressão do hospedeiro, com conseqüente agravamento da doença, pois a produção de NO permaneceu elevada neste período, assim como houve diminuição da liberação da IL-1 β , IL-17, IL-23, citocinas pró-inflamatórias que agem protegendo o hospedeiro. Neste mesmo período, a diminuição do percentual de caspase-1 ativa, seguido pela menor liberação de IL-1 β e IL-18, demonstrou que o inflamassoma estava com sua ativação inibida, colaborando para uma maior disseminação do patógeno, já que estão diretamente relacionada com a resposta inata e com a otimização de uma resposta adaptativa. A produção de IFN- γ permaneceu aumentada durante todas as semanas de infecção, com níveis mais elevados durante as semanas intermediárias, coincidindo com o período de maior produção de NO. Em relação às concentrações de TGF- β , estas estavam diminuídas nas semanas intermediárias, tendo menor efeito supressor sobre os macrófagos, que estão atuando na tentativa de eliminar o patógeno, juntamente com o aumento de IFN- γ e NO. De forma geral, os resultados apresentados apontam para uma imunossupressão do hospedeiro entre a quarta e sexta semanas de infecção e salienta a importância do inflamassoma na proteção do hospedeiro em infecção fúngica induzida pelo *S. schenckii*.

Palavras-chave: Citocinas, esporotricose, inflamassoma, óxido nítrico, resposta imune

Abstract

Sporotrichosis is a fungal disease caused by the thermo-dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*. The innate immune response enables the recognition of a broad spectrum of pathogens through PRRs, such as NLRs. These receptor, ASC and caspase-1 form inflammasomes, complex multiprotein responsible for maturation of IL-1 β and IL-18. Experimental evidence shows that inflammasome plays an important role in antifungal host defense, however there is no information available about his involvement in infections caused by *S. schenckii*. The induction of cellular immunity depends on the interactions between antigens, macrophages and lymphocytes because when activated, these cell populations release immune mediators to establishing a link between the innate and adaptive immune responses. The aim of this study was to evaluate the involvement of inflammasome, through the determination of caspase-1, and cytokines in the immune response induced by the fungus *S. schenckii* in an experimental model of systemic sporotrichosis using Balb/c mice infected and uninfected for eight weeks. The results showed that between the fourth and sixth weeks of infection occurs immunosuppression of the host, with consequent worsening of the disease, because NO production encountered high during this period, as well as decreased release of IL-1 β , IL-17, IL-23, pro-inflammatory cytokines that act to protect the host. In this same period, the decrease in the percentage of active caspase-1, followed by lower release of IL-1 β and IL-18, showed that inflammasome was inhibited its activation, contributing to further spread of the pathogen, since it is directly related with the innate response and optimization of an adaptive response. The production of IFN- γ remained increased during all weeks of infection, with higher levels during these weeks, coinciding with the period of increased NO production. Regarding the concentrations of TGF- β , these were decreased in the intermediate weeks, having less suppressive effect on macrophages that are acting in an attempt to eliminate the pathogen, along with the increase of IFN- γ and NO. Overall, the results point to a host immunosuppression between the fourth and sixth weeks of infection and emphasizes the importance of inflammasome in host protection in fungal infection induced by *S. schenckii*.

Keywords: Cytokines, sporotrichosis, inflammasome, nitric oxide, immune response

Capítulo I

1. Introdução

A esporotricose é uma doença micótica de caráter subagudo ou crônico, causada pelo fungo termodimórfico *Sporothrix schenckii*, com distribuição cosmopolita, ocorrendo com maior frequência em regiões tropicais e subtropicais, como na África e nas Américas Central e do Sul (La Hoz e Baddley, 2012). A infecção com *S. schenckii* geralmente ocorre pela inoculação pós-traumática do fungo presente em solos, plantas e materiais orgânicos contaminados, sendo sua principal via de contaminação. A doença também pode ser adquirida por inalação de esporos, embora esta seja uma forma de transmissão mais rara (Barros *et al.*, 2011).

A esporotricose pode apresentar diversas manifestações clínicas e ser classificada como cutânea, linfocutânea, fixa, mucosa ou extracutâneas (Vasquez-del-Mercado *et al.*, 2012). Estudos indicam que as respostas imunológicas do hospedeiro participam do progresso e da regressão espontânea da esporotricose, indicando que a patogenia desta infecção está intimamente ligada aos mecanismos de defesa do hospedeiro (Carlos *et al.*, 2009). Os mecanismos imunológicos envolvidos na prevenção e controle de infecções por *S. schenckii* ainda não são muito bem compreendidos, no entanto é provável que incluam a resposta inata, celular e humoral e estas parecem ser desencadeadas por diferentes antígenos obtidos deste fungo (Maia *et al.*, 2006; Sassá *et al.*, 2009, 2012).

A resposta imune inata contra os fungos faz uso de vários mecanismos para impedir a invasão dos agentes nocivos. Um dos mecanismos inclui a presença dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs - “Pattern recognition receptor”) presentes em macrófagos, células dendríticas e outros tipos celulares, que detectam e respondem à presença de padrões moleculares associados a agentes patogênicos (PAMPs - “Pathogen-associated molecular patterns”) (Kanneganti *et al.*, 2007). Os NLRs (“NOD-like receptors”) são PRRs citosólicos que formam complexos multiprotéicos chamados inflamassomas, os quais compreendem uma grande família de proteínas intracelulares (Lamkanfi e Dixit, 2009; Kumar *et al.*, 2011).

Além da proteína NLR, o inflamassoma é composto por uma molécula adaptadora associada à apoptose (ASC) e à enzima caspase-1. A ativação de NLR leva ao recrutamento da ASC e da caspase-1, formando complexos protéicos pentamérico ou heptamérico (Davis *et al.*, 2011). O inflamassoma é um importante regulador da inflamação e possui a função de agrupar e ativar a caspase-1, culminando com a maturação da pró-IL-1 β e pró-IL-18 nas suas formas ativas, IL-1 β e IL-18

respectivamente. Estas interleucinas contribuem na defesa do hospedeiro contra as infecções por aumentar as propriedades antimicrobianas dos fagócitos e iniciar as respostas imunes adaptativas Th1 e Th17 (Veerdonk *et al.*, 2011). Entender como funciona o inflamassoma é fundamental para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas adequadas focadas na resolução de diversas doenças (Paiva-Oliveira *et al.*, 2012).

Os macrófagos quando ativados são responsáveis pela fagocitose de partículas estranhas, apresentação de antígenos, produção de citocinas e de agentes microbicidas, como os compostos intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio, como o óxido nítrico (Mlambo e Sigola, 2003; Carlos *et al.*, 2009), sendo que estas espécies reativas estão envolvidas com respostas fungistática e fungicida (Kajiwara *et al.*, 2004). O NO apresenta alto efeito citotóxico contra o *S. schenckii*, sendo um potente mediador das respostas imune e inflamatória, levando à destruição do microrganismo (Fernandes *et al.*, 2000; 2008).

Além destas respostas de primeira linha, as APCs capturam e apresentam fragmentos imunogênicos, presentes na superfície dos patógenos, às células que participam da resposta imune adaptativa (Guermonprez *et al.*, 2002). As células Th podem apresentar diferentes fenótipos e a função efetora de cada linhagem das células T CD4 é diferencialmente mediada pelos efeitos das citocinas produzidas por cada um dos diferentes subconjuntos celulares. Essas subclasses são divididas em: Th1, Th2, Th17 e Treg (Zhu *et al.*, 2010).

As células Th1 produzem IFN- γ , IL-2, IL-12 e são eficientes na eliminação de patógenos intracelulares, via ativação de macrófagos. Enquanto as células Th2 liberam IL-4 e IL5 que ativam a imunidade humoral e são secretadas de maneira acentuada na presença de determinados antígenos (Rengarajan *et al.*, 2000). Já as células Th17 produzem, caracteristicamente, a IL-17, que atua como uma citocinas pró-inflamatória e tem a IL-23 como fator de crescimento e diferenciação (McGeachy e Cua, 2008). As células Treg são responsáveis pela produção de elevados níveis de TGF- β , uma citocina imunossupressora que atua sobre células apresentadoras de antígenos e outras células T (Roncarolo e Levings, 2000).

A atuação do sistema imunológico em doenças fúngicas depende de uma sequência complexa de interação entre antígenos, macrófagos e linfócitos. Quando ativadas, populações específicas de células T e macrófagos interagem para dar proteção imunológica a infecções por *S. schenckii*, formando a base do entendimento para a

resposta do hospedeiro a este agente infeccioso (Carlos *et al.*, 2009; Romani, 2011). Assim, a interação entre as respostas inata e adaptativa permite respostas eficazes do hospedeiro contra uma grande variedade de infecções e agentes patogênicos.

Portanto, como pouco se sabe sobre a participação da resposta imune no combate ao fungo *S. schenckii* e considerando o crescente número de casos de esporotricose, assim como a importância em definir os aspectos relacionados à patogenicidade do fungo, novas pesquisas são necessárias para complementar a elaboração de estratégias mais eficazes no combate e tratamento à esporotricose.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. *Sporothrix schenckii* e esporotricose

A esporotricose é uma micose subaguda ou crônica causada pelo fungo termodimórfico *Sporothrix schenckii*. Esta doença tem distribuição mundial, ocorrendo com maior frequência em regiões tropicais e subtropicais, como na África e nas Américas Central e do Sul (La Hoz e Baddley, 2012). A infecção geralmente ocorre pela inoculação pós-traumática do fungo presente em solos, plantas e materiais orgânicos contaminados, sendo sua principal via de contaminação. A doença também pode ser adquirida por inalação de esporos, embora esta seja uma forma de transmissão mais rara (Barros *et al.*, 2011).

O primeiro caso de esporotricose foi relatado nos Estados Unidos por Benjamim Schenk em 1898. Em 1990, Hektoen and Perkins relataram um segundo caso da doença e, após isolamento do microrganismo, verificaram que se tratava do mesmo agente identificado por Schenk e deram-no o nome de *Sporothrix schenckii* (Schenk, 1898; Hektoen e Perkins, 1900). No Brasil, Adolpho Lutz e Splendore, em 1907, foram os primeiros a relatarem o aparecimento da esporotricose em animais ao isolarem o patógeno da mucosa oral de ratos (Lacaz *et al.*, 2002).

Em 1988, ocorreu uma epidemia nos Estados Unidos envolvendo 84 pacientes em 15 diferentes estados (Burns *et al.*, 2009). Na África do Sul, a estimativa de incidência anual encontra-se entre 48 e 60 casos por cada cem mil habitantes (Neyra *et al.*, 2005). Já no Brasil, casos epidêmicos se deram entre 1998 e 2004, com mais de 750 casos reportados em humanos, sendo que a transmissão ocorreu através de picadas, mordidas e arranhões de animais contaminados. (Schubach *et al.*, 2008). No estado do Rio de Janeiro, entre 1998 e 2008, foram encontrados 246 casos de pacientes contaminados com *S. schenckii*, enquanto 103 casos em animais, entre cães e gatos, foram encontrados no sul do país durante os últimos dez anos (Oliveira *et al.* 2011; Madrid *et al.* 2012).

O fungo *S. schenckii* pertence ao reino Fungi e é um organismo eucariótico heterotrófico, imóvel, com presença de quitina em sua parede celular. Durante vários anos, foi incluído na divisão Eumycota, subdivisão Deuteromycotina, classe Hyphomycetes, ordem Moniliales e família Moniliaceae (Lacaz *et al.*, 1998). Depois de uma revisão substancial taxonômica dos fungos por Guarro *et al.* (1999), foi

caracterizada na divisão Ascomycota, classe Pyrenomycetes, ordem Ophiostomatales e família Ophiostomataceae.

A forma miceliar do *S. schenckii* se desenvolve em temperaturas variando de 25°C a 30°C e é caracterizada por hifas delgadas, hialinas, septadas e ramificadas, com conídios organizados em grupos, cujo ápice forma uma pequena vesícula, lembrando pétalas de uma flor (Lopes-Bezerra *et al.*, 2006). Macroscopicamente, as colônias filamentosas se apresentam, muitas vezes, com coloração primária de branco a creme, que se tornam escuras a negras e subsequêntemente enrugadas com o passar das semanas (Morris-Jones, 2002), todavia, algumas cepas, têm a capacidade de formar colônias escuras desde o início do crescimento (Almeida-Paes *et al.*, 2009). A coloração escura nas colônias do fungo se dá pela presença de melanina, que distinguem *S. schenckii* de outras espécies *Sporothrix* não patogênicas (Meyer *et al.*, 2008).

A forma saprofítica é convertida à levedura, *in vitro*, por meio de meios suplementados, como o caldo infusão de cérebro e coração ou ágar sangue suplementado com glicose e cisteína a 37°C (Kauffman, 1999). Nos tecidos humanos, este fungo se apresenta na forma de levedura, que se reproduz por brotamento, tem de 4 a 6 µm de diâmetro, não forma conídios e é oval semelhante à forma de charuto. As colônias das leveduras são lisas com coloração acastanhada a creme e alguns aspectos moleculares implicam na proliferação e manutenção desta forma celular (Larone, 2002; Valentin-Berrios *et al.*, 2009). Apesar de fatores como aeração, tensão de CO₂, pH, fonte de carbono e presença de cátions divalentes influenciarem a transição morfológica, a temperatura é o fator determinante para o dimorfismo, sendo que a inibição do crescimento deste microrganismo ocorre entre 39°C e 40°C (Lopes-Bezerra *et al.*, 2006)

O potencial zoonótico da esporotricose foi considerado, primeiramente, nos anos 80 e a maioria desses casos foi relatada em áreas de condições socioeconômicas desfavoráveis das grandes cidades. Os felinos domésticos, em particular, carregam grande número de parasitas em suas unhas e na cavidade oral, transmitindo a esporotricose para humanos, contudo outros animais, como cães, cavalos, camelos, macacos e ratos, podem ser vetores para esta doença (Reis *et al.*, 2009; Barros *et al.*, 2011).

A prevalência da esporotricose, em sua maioria, era descrita em homens, porém no decorrer dos últimos anos, a incidência de mulheres contaminadas com o *S. schenckii* tem aumentado, nivelando a portabilidade da doença em ambos os sexos (Bonifaz *et al.*,

2010). Ainda assim, há grande relação entre esta doença e a atividade profissional e recreacional do hospedeiro, pois ao analisar os fatores envolvidos na contaminação com este fungo, verificou-se que a maioria dos acometidos exercia atividades diretamente ligadas ao solo e à vegetação, tais como floricultura, agricultura, mineração, pesca e exploração da madeira (Morris-Jones, 2002). No entanto, atualmente, os veterinários, cuidadores de animais, proprietários de gatos e manipuladores deste patógeno em laboratórios são considerados uma nova categoria de risco para o desenvolvimento desta infecção (Barros *et al.*, 2011).

A esporotricose pode apresentar diversas manifestações clínicas e ser classificada como forma cutânea, linfocutânea, fixa, mucosa ou extracutâneas (Vasquez-del-Mercado *et al.*, 2012). Diversos fatores, como a virulência e a profundidade da cepa inoculada, a carga do inóculo e o estado imunológico do hospedeiro, podem influenciar nas diferentes formas clínicas desta micose (Barros *et al.*, 2011). A imunossupressão, independente da causa, provoca pré-disposição para as formas mais grave da doença fúngica, portando o alcoolismo e a diabetes também têm sido descritos como fatores de suscetibilidade para a contaminação com *S. schenckii* (Vasquez-del-Mercado *et al.*, 2012).

Na forma cutânea, a lesão limita-se ao local da inoculação do patógeno e pode se apresentar como lesões verrucosas ou pápulas, sendo a face e membros superiores e inferiores as regiões mais comprometidas. A linfocutânea é caracterizada por nódulos eritematosos que podem ser ulcerativos ou necróticos, com posterior aparecimento de nódulos linfáticos, resultando em linfodema (Bonifaz *et al.*; 2010). Já a forma fixa é caracterizada por ser indolor, com presença de infiltrados, eritemas e placas violáceas que podem se tornarem verrucosas ou ulcerativas (Roldán-Marín *et al.*, 2009).

A esporotricose de mucosa é rara e aparece em forma de lesões verrucosas, granulomatosas ou ulcerativas no palato, faringe, traquéia ou nariz (Fontes *et al.*, 2007), enquanto as formas extracutâneas incluem esporotricose osteoarticular, pulmonar e sistêmica, sendo estas caracterizadas como os casos mais graves da doença (Orofino-Costa, 2010). A forma sistêmica possui difícil diagnóstico, pois se assemelha com outras doenças infecciosas, como tuberculose, leishmaniose e paracoccidioidomicose, ressaltando que a demora no tratamento da esporotricose pode ser fatal (Almeida-Paes *et al.*, 2007).

As formas mais graves da esporotricose, geralmente, ocorrem em pacientes imunocomprometidos, sugerindo que *S. schenckii* é um patógeno oportunista (Freitas *et*

al., 2011). Quando sistêmica, a esporotricose pode afetar o sistema nervoso central, (Villela *et al.*, 2007), e nervos periféricos, causando meningites e neuropatias significativas (Mauermann *et al.*, 2007). Em pacientes HIV positivos, a forma sistêmica pode ser manifestada como uma síndrome imune inflamatória depois de iniciada a terapia com antiretrovirais (Gutierrez-Galhardo *et al.*, 2010; López-Romero *et al.*, 2011).

Pose-se definir fatores de virulência como uma característica presente em um determinado microrganismo que permite ou favorece o crescimento deste patógeno em um hospedeiro. O fungo *S. schenckii* apresenta vários destes fatores: a termotolerância, a síntese de peróxido de ergosterol, a produção de melanina, a presença de adesinas e algumas proteínas. Os isolados capazes de crescer a 35°C, mas não a 37°C são incapazes de causar a esporotricose linfática e produzem lesões cutâneas fixas instantaneamente (Kwon-Chung e Bennet, 1992). Sgarbi *et al* (1997) analisaram os lipídeos deste fungo e identificaram o peróxido de ergosterol a partir de leveduras, o qual pode ser convertido a ergosterol. O peróxido de ergosterol tem como função proteger o fungo de espécies reativas de oxigênio durante a fagocitose, sendo um importante fator de virulência (Carlos *et al.*, 2003).

Outro fator de virulência relacionado ao *S. schenckii* é melanização de conídios, pois estudos demonstraram que estas estruturas quando produzem melanina são mais resistentes à fagocitose por macrófagos e aos compostos oxidativos que atuam como microbicidas, permitindo os primeiros passos da infecção, já que estas estruturas são geralmente as partículas fúngicas infectantes (Romero-Martinez *et al.*, 2000). Ambos os estágios morfológicos tem a capacidade de sintetizar melanina, uma vez que sua produção nas leveduras foi demonstrada *in vitro* durante a infecção, porém apenas a fase miceliar do fungo apresenta a produção de melanina macroscopicamente (Morris-Jones *et al.*, 2003).

A aderência primária dos patógenos às células endoteliais e epiteliais, bem como em componentes da matriz extracelular, é essencial para uma invasão eficaz do microrganismo. As adesinas, localizadas na superfície da célula, favorecem a adesão do patógeno aos tecidos do hospedeiro e, conseqüentemente, facilitam a disseminação do fungo (Teixeira *et al.*, 2009, 2010). Estudos recentes têm mostrado que componentes da parede celular de *S. schenckii* estão envolvidos na aderência deste fungo às células hospedeiras e na tentativa de desenvolver uma vacina contra este patógeno, imunizações

com anticorpos monoclonais contra adesinas deste microrganismo têm obtido sucesso em modelo experimental murino (Figueiredo *et al.* 2004; Nascimento *et al.*, 2008).

A presença de proteínas e glicoproteínas na parede fúngica desempenha um papel central na interação patógeno-hospedeiro. A parede celular de ambas as fases morfológicas de *S. schenckii* contém glucanas álcali-solúveis e insolúveis (Lopes-Bezerra, 2006). A fracção glicoproteica, chamada de peptidoramnomanana, contém 33,5% de L-ramnose, 57% de D-manose, 14,2% de proteína e pequenas quantidades de galactose, e é isolada a partir da parede celular de leveduras deste fungo (Lloyd e Bitoon, 1971). Este isolado causa depressão na resposta imune na sexta semana de infecção e pode atuar como um fator de virulência (Carlos *et al.*, 1999).

Outro composto presente na parede celular de formas leveduriformes do fungo é o ácido siálico, que diminui a ação dos anticorpos e são tóxicos para os macrófagos, além de impedirem a fagocitose de leveduras não opsonizadas (Oda *et al.*, 1983). A glicoproteína de 70 kDa isolada a partir da parede celular de células leveduriformes do *S. schenckii* tem uma distribuição uniforme sobre a superfície da célula fúngica e participa na adesão do fungo às proteínas da matriz extracelular do hospedeiro (Nascimento *et al.*, 2008; Ruiz-Baca *et al.*, 2009). Entretanto, a função de diferentes proteínas de *S. schenckii*, em relação à virulência, ainda não foi esclarecida.

2.2. Sistema imunológico

A resposta efetiva contra organismos fúngicos requer a contribuição coordenada da imunidade inata e adaptativa. A imunidade inata consiste de um mecanismo protetor desenvolvido inicialmente e que coordena a ativação das células da imunidade adaptativa por meio da apresentação de antígenos e produção de diversos mediadores. Este é um mecanismo inicial não específico, mas muito importante para ativação da imunidade celular e humoral com especificidade para antígenos do patógeno (Green *et al.*, 2000; Charalampos e Roilides, 2005).

A resposta imune inata contra os fungos faz uso de vários mecanismos para impedir a invasão dos agentes nocivos. Estes incluem barreiras anatômicas, como a pele e as membranas mucosas, que evitam, mecanicamente, a introdução do patógeno no organismo; o sistema complemento; a ativação de fagócitos e a presença dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (Kanneganti *et al.*, 2007).

Os macrófagos quando ativados são responsáveis pela fagocitose de partículas estranhas, apresentação de antígenos, produção de citocinas e de agentes microbicidas,

como os compostos intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio, como o óxido nítrico (Mlambo e Sigola, 2003; Carlos *et al.*, 2009), sendo que estas espécies reativas estão envolvidas com propriedades fungistática e fungicida (Kajiwara *et al.*, 2004). O NO apresenta alto efeito citotóxico contra o *S. schenckii*, sendo um potente mediador das respostas imune e inflamatória, levando à destruição do microrganismo (Fernandes *et al.*, 2000; 2008).

As citocinas são mediadores solúveis essenciais na comunicação intercelular e em processos fisiopatológicos que modulam a inflamação e a resposta imune, regulando o crescimento e a diferenciação de diversos tipos celulares. Evidências sugerem que a resposta do hospedeiro contra fungo patogênico pode ser influenciada pelo tipo celular envolvido e pelo perfil de produção de citocinas (Balloy *et al.*, 2005; Charalampos e Roilides, 2005). Assim, torna-se claro que as citocinas desempenham papel fundamental na regulação dos processos biológicos (Becker *et al.*, 2003).

Além destas respostas de primeira linha, as células apresentadoras de antígenos capturam e apresentam fragmentos imunogênicos, presentes na superfície dos patógenos, às células que participam da resposta imune adaptativa (Guernonprez *et al.*, 2002). Os macrófagos podem ser ativados durante a esporotricose por linfócitos T CD4⁺, que liberam IFN- γ , um potente ativador macrófago (Tachibana *et al.*, 1999), e por outras APCs, estabelecendo uma ligação entre as respostas imunológicas inata e a adaptativa, permitindo alternativas eficazes do hospedeiro contra uma variedade de infecções e agentes patogênicos (Carlos *et al.*, 2009).

O sistema imune adaptativo exerce papel crucial na resposta imunológica através da participação das células T e B. As células T possuem funções efetoras, enquanto as B atuam como células de memória. Os linfócitos são as únicas células do organismo com capacidade de reconhecer e distinguir, especificamente, diferentes determinantes antigênicos. Há a possibilidade do desenvolvimento de subclasses dessas células, com função de regular a resposta imune frente a determinados antígenos e atuarem como células efetoras para eliminar microrganismos extracelulares e células neoplásicas (Jankovic *et al.*, 2001).

As células T podem exercer sua função através da citotoxicidade, mediada por linfócitos citotóxicos (T CD8⁺) ou através da secreção de citocinas por linfócitos T “helper” (T CD4⁺), que ativam macrófagos para destruir os agentes intracelulares (Delves e Roitt, 2000; Barbeiro, 2009). As células Th podem apresentar diferentes fenótipos e a função efetora de cada linhagem das células T CD4 é diferencialmente

mediada pelos efeitos das citocinas produzidas por cada um dos diferentes subconjuntos celulares (Zhu *et al.*, 2010).

Os clones Th se diferenciam em quatro categorias distintas. As células Th1 produzem IFN- γ , IL-2, IL-12 e são eficientes na eliminação de patógenos intracelulares, via ativação de macrófagos. Enquanto as células Th2 liberam IL-4 e IL5 que ativam a imunidade humoral e são secretadas de maneira acentuada na presença de determinados antígenos (Rengarajan *et al.*, 2000). Já as células Th17 produzem, caracteristicamente, a IL-17, uma citocina pró-inflamatória, e tem a IL-23 como fator de crescimento e diferenciação (McGeachy e Cua, 2008). As células Treg são responsáveis pela produção de elevados níveis de TGF- β , uma citocina imunossupressora que atua sobre células apresentadoras de antígenos e outras células T (Roncarolo e Levings, 2000).

A diferenciação destas subpopulações celulares ocorre de forma oposta, uma vez que a produção de IFN- γ promove a diferenciação de células Th1 e suprime o desenvolvimento das Th2 e Th17. Já a IL-4 promove a diferenciação das Th2 e suprime a diferenciação das células Th1 e Th17. Enquanto isso, o TGF- β promove a diferenciação das células Th17 e suprime a diferenciação de células Th1 e Th2 (Zhu *et al.*, 2010). Assim, as citocinas são importantes não apenas como mediadores de células T CD4 efectoras mas também em função da instrução da aquisição destas diferentes linhagens celulares (Espinosa e Riveira, 2012).

Embora algumas citocinas apresentem características marcantes de um perfil Th1 ou Th2, muitas delas, apresentam efeitos pleiotrópicos dependentes de sua dose e tempo de secreção para o desenvolvimento da resposta imune (Romani, 2004; Charalampos e Roilides, 2005). Isso evidencia a importância do balanço entre as citocinas Th1 e Th2 para o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva. Este equilíbrio se deve, em parte, pela atuação das células Treg, importantes reguladoras da resposta imune indesejada *in vivo* durante uma patologia severa (Carrier *et al.*, 2007).

A função primária das células Th17 parece ser a eliminação de patógenos com os quais as células Th1 e Th2 não conseguem lidar adequadamente. Estas células são potentes indutoras de inflamação tecidual e têm sido implicadas na patogênese de muitas doenças auto-imunes e condições inflamatórias (Korn *et al.*, 2009). Além da IL-17, as células Th17 produzem IL-21, IL-22, IL-26, GM-CSF, TNF- α e IL-6 (Romagnani *et al.*, 2009). A IL-23 tem sido reportada como responsável pela manutenção e amplificação de células Th17 já diferenciadas (Van Verdoonk *et al.*, 2009).

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória liberada por muitos tipos de células com propriedades de ativar células T, monócitos e macrófagos, osteoclastos, fibroblastos, células musculares, endoteliais e epiteliais. Atua como um importante mediador durante infecções e inflamação e tem papel protetor em vários modelos de infecções bacterianas, virais e fúngicas. (Dinarello, 2002; 2005). Esta citocina, especialmente em sinergia com IL-23, tem um papel essencial na indução da expansão de células de murinos e humanos Th17 (Lee *et al.* 2010).

A IL-18 foi descrita como fator indutor da produção de IFN- γ produzido por macrófagos estimulados por microorganismos e produtos bacterianos (Martinon *et al.*, 2009), porém recentemente é considerada a citocina de ligação entre a imunidade natural e adaptativa. Ainda assim, esta citocina parece estar envolvida no desenvolvimento de células Th1, o que sugere o envolvimento considerável na resposta imunitária protetora contra a infecção (Kawakami, 2002).

O IFN- γ é uma citocina pleiotrópica que confere proteção ao hospedeiro contra uma variedade de infecções fúngicas (Duplessis *et al.*, 2011). Esta citocina possui múltiplas atividades biológicas, incluindo a ativação da atividade antimicrobiana de fagócitos, processamento de antígenos, ativação de iNOS e diferenciação das células Th1. O papel importante de IFN- γ na defesa contra fungos é realçado pela susceptibilidade dos camundongos deficientes em IFN- γ em infecção com *Histoplasma*, *Cryptococcus*, *Blastomyces* e *Candida* e pelo benéfico efeito da administração de IFN- γ exógena a pacientes com doenças fúngicas invasivas (Shao *et al.*, 2005; Armstrong-James *et al.*, 2010).

O mecanismo pelo qual o TGF- β suprime a resposta imune *in vitro* é pouco conhecido. Estudos recentes demonstram múltiplos efeitos imunomodulatórios de isoformas do TGF- β em vários tecidos e células alvo. As propriedades imunorregulatórias do TGF- β incluem inibição da proliferação de células T e B, assim como estimula adesão de neutrófilos a células endoteliais, o que limita a migração e o recrutamento de células inflamatórias ao órgão alvo (Carrier *et al.*, 2007).

A reação de hipersensibilidade tardia (*in vivo*) e o teste de transformação linfocitária (*in vitro*), em modelo experimental de esporotricose murina, em camundongos Swiss, mostraram que a resposta imune celular desses animais está deprimida entre a 4^a e a 6^a semanas de infecção, quando as células do baço destes animais foram estimuladas com um antígeno solúvel obtido a partir do fungo em sua forma leveduriforme (Carlos *et al.*, 1994). Essa depressão na imunidade indica um

agravamento da infecção, com maior comprometimento do hospedeiro (Carlos *et al.*, 1992; 1999).

De fato, a produção do IL-1 β e TNF- α diminuiu drasticamente entre a 4^a e 6^a semanas após a infecção experimental, permitindo a multiplicação do fungo e infectando tecidos do hospedeiro. Esta deficiência na imunidade celular em camundongos infectados pelo *S. schenckii* pode ocorrer ser devido à geração anormal IL-1 β e TNF- α pelos macrófagos ativados, prejudicando assim a amplificação da resposta imune. A situação oposta ocorre dois meses pós-infecção, quando os níveis deste mediador aumentam, favorecendo a eliminação do fungo (Carlos *et al.*, 1994).

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório têm demonstrado o envolvimento do NO e de citocinas Th1/Th2 na infecção sistêmica utilizando exoantígeno de *S. schenckii*. Maia *et al.* (2006) avaliaram o perfil de diferenciação de linfócitos T durante a esporotricose e verificaram que células Th1 produzem IFN- γ que ativam macrófagos e promovem a imunidade mediada por células. Neste trabalho foram encontrados baixos níveis de produção de NO na fase inicial (1^a e 2^a semanas) e tardia (9^a e 10^a semanas) da infecção, ao contrário da 4^a e 7^a semana em que os níveis destes mediadores foram elevados. A produção de IL-4 mostrou um aumento nos níveis de concentração após a 5^a e 6^a semanas, o que sugere uma participação de resposta Th2 neste período. O estudo demonstrou que, na infecção experimental, a resposta imune celular participou como um mecanismo dependente de NO, enquanto a presença da resposta Th2, a partir da 5^a semana, sugere a participação da resposta imune humoral em estágios avançados da esporotricose.

Em nosso laboratório, Sassá *et al.* (2009) avaliaram a participação dos TLR4 no reconhecimento do fungo *S. schenckii* e observaram camundongos deficientes de TLR4 comparados aos não deficientes. Os resultados encontrados demonstraram que tanto mediadores pró-inflamatórios (NO e TNF- α) quanto anti-inflamatórios (IL-10) estavam reduzidos nos camundongos deficientes do receptor TLR4, assim como os níveis de apoptose durante a infecção experimental com *S. schenckii*. Em 2012, Sassá *et al.* apontaram a necessidade de TLR-4 para ativação de macrófagos em uma resposta inflamatória, o que é gravemente prejudicada na ausência deste receptor de sinalização, pois camundongos deficientes em TLR4 produziram baixos níveis de IL-1 β , IL-6 e H₂O₂ quando as células foram expostas a antígenos do fungo e ao LPS. Estes dados sugerem um envolvimento do TLR4 no reconhecimento do agente infeccioso.

Estudos indicam que as respostas imunológicas do hospedeiro participam do progresso e da regressão espontânea da esporotricose, indicando que a patogenia desta infecção está intimamente ligada aos mecanismos de defesa do hospedeiro (Carlos *et al.*, 2009). Os mecanismos imunológicos envolvidos na prevenção e controle de infecções por *S. schenckii* ainda não são muito bem compreendidos. No entanto, é provável que incluam a resposta inata, celular e humoral e estas parecem ser desencadeadas por distintos antígenos (Carlos *et al.*, 1992, 2003, 2009; Maia *et al.*, 2006). Os antígenos de superfície celular, especialmente o componente lipídico da parede celular, parecem desempenhar importante papel na patogênese desta doença ao inibir o processo de fagocitose através da elevada liberação de óxido nítrico em culturas de macrófagos, sugerindo um possível mecanismo de escape do patógeno durante a infecção fúngica (Carlos *et al.*, 2003).

2.3. Inflamassoma

O sistema imune inato possui PRRs, presentes em macrófagos, células dendríticas e outros tipos celulares, que detectam e respondem à presença de PAMPs. Há pelo menos quatro grandes famílias de PRRs, que operam de forma cooperativa para reconhecer patógenos e sinais de stress produzidos pelas células durante infecção ou injúria celular: Toll-like (TLRs), RIG-I-like (RLRs), lectina-C (CLRs) e mais recentemente, os NOD-like (NLRs) (Levitz, 2010; Romani, 2011).

Os NLRs são receptores citosólicos expressos que formam complexos multiprotéicos chamados inflamassomas, os quais compreendem uma grande família de proteínas intracelulares (Kumar *et al.*, 2011). A descoberta destes PRRs citosólicos sugeriu que os microrganismos que evadissem da detecção de receptores extracelulares encontrariam uma segunda linha de reconhecimento dentro do citosol do hospedeiro (Philpott *et al.*, 2000). Em geral, os PAMPs, são vitais para a sobrevivência microbiana, podendo ser, por exemplo, estruturas de ácidos nucléicos únicas aos patógenos ou componentes da parede celular diferente de células do hospedeiro (Lamkanfi e Dixit, 2009).

Além da proteína NLR, o inflamassoma é composto pela molécula adaptadora ASC e pela enzima caspase-1. O adaptador ASC corresponde a proteínas associadas a apoptose com domínios de recrutamento e ativação de caspases facilitando a montagem do inflamassoma (Paiva-Oliveira *et al.*, 2012). A ativação de NLR leva ao recrutamento da ASC e da caspase-1, formando complexos protéicos pentamérico ou heptamérico. A

formação dessa plataforma molecular é mediada por inúmeros ligantes endógenos e exógenos induzindo a produção de citocinas pro-inflamatórias e recrutamento de populações celulares associadas com a resposta imunológica e reparo tecidual (Davis *et al.*, 2011; Strowig *et al.*, 2012).

O inflamassoma é um importante regulador da inflamação e possui a função de agrupar e ativar a caspase-1, culminando com a maturação da pró-IL-1 β e pró-IL-18 em suas formas ativas, IL-1 β e IL-18 respectivamente. Estas interleucinas contribuem na defesa do hospedeiro contra as infecções por aumentar as propriedades antimicrobianas dos fagócitos e iniciar as respostas imunes adaptativas Th1 e Th17 (Veerdonk *et al.*, 2011).

Eventualmente a ativação do inflamassoma induz um tipo de morte celular denominada piroptose, que tem como principais características a ruptura da membrana plasmática e a liberação do conteúdo intracelular pró-inflamatório. Ao contrário da morte celular por apoptose, a piroptose é dependente da ativação do complexo da caspase-1 estando geralmente associado a um estado altamente inflamatório, frequentemente devido à infecção por patógeno facultativo intracelular como *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria monocytogenes* (Bergsbaken *et al.*, 2009; Galluzzi e Kroemer, 2009).

Atualmente, o inflamassoma tem sido implicado em respostas a um largo espectro de agentes infecciosos, incluindo a agentes patogénicos bacterianos como *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Citrobacter rodentium* (He *et al.*, 2010, Toma *et al.*, 2010; Kayagaki *et al.*, 2011; Shimada *et al.*, 2011), fungos como *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus* (Gross *et al.*, 2009; Said-Sadier *et al.*, 2010); vírus como a gripe A encefalomiocardite e o da estomatite vesicular (Ito *et al.*, 2012; Rajan *et al.*, 2011), e os parasitas *Schistosoma mansoni* e *Dermatophagoides pteronyssinus* (Ritter *et al.*, 2010; Dai *et al.*, 2011).

Acredita-se que múltiplos inflamassomas distintos podem existir, cada um contendo uma proteína chave da superfamília dos NLRs que confere especificidade de reconhecimento para um produto microbiano particular. A proteína NLRP1 parece ativar o inflamassoma em resposta à toxina letal do antrax (Boyden e Dietrich, 2006) e ao muramildipeptídeo bacteriano (Faustin *et al.*, 2007). Em contraste, a proteína NLRP3 tem sido relacionada ao reconhecimento de uma vasta gama de estímulos incluindo

RNA bacteriano (Kanneganti *et al.*, 2006), DNA viral (Muruve *et al.*, 2008), cristais de ácido úrico (Martinon *et al.*, 2006), proteína β -amilóide e sílica (Halle *et al.*, 2008).

Embora a montagem do inflamassoma ocorra a partir da ativação de seus receptores, a sua atuação é regulada por diversos fatores influenciados pelo microambiente. Isto explica porque um mesmo tipo de estímulo pode determinar alterações fisiopatológicas e manifestações clínicas diversas. De fato, a regulação do inflamassoma pode ser positiva (estimulação) ou negativa (inibição) interferindo na ativação do complexo da caspase-1 (Martinon *et al.*, 2009).

O inflamassoma estabelece relações importantes com diversas doenças. Em modelo experimental de candidíase oral, testou-se o papel do inflamassoma e verificou-se que a caspase-1 teve um papel importante no controle da carga fúngica (Hise *et al.*, 2009). No entanto, pouco foi feito para avaliar o papel do inflamassoma na defesa antifúngica, portanto, mais estudos são necessários para caracterizar a contribuição destas proteínas intracelulares durante infecções com fungos, vírus, bactérias e parasitas. Por apresentar um envolvimento estreito com diversas patógenias, pela ativação de vias intracelulares e provocar um tipo de morte celular alternativo, o inflamassoma vem sendo um alvo potencial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para diferentes doenças.

3. Objetivo

Avaliar o envolvimento do inflamassoma e citocinas na resposta imunológica induzida pelo fungo *S. schenckii* em modelo experimental utilizando camundongos Balb/c infectados e não infectados.

3.1. Objetivos específicos

- Verificar a citotoxicidade dos antígenos fúngicos frente às células do exsudato peritoneal, após aderência, e células esplênicas totais;
- Analisar a estimulação de macrófagos através da liberação de óxido nítrico frente aos diferentes antígenos fúngicos estudados;
- Verificar o envolvimento do inflamassoma presente nos macrófagos na resposta imunológica inata por meio da atuação da caspase-1;
- Analisar a interação entre macrófagos e linfócitos T em uma população mista, por meio da produção das citocinas: IL-1 β , IL-18, IFN- γ , IL-17, IL-23 e TGF- β .

4. Materiais e Métodos

4.1. Delineamento experimental

O fungo *S. schenckii* foi mantido na sua forma miceliar em ágar Mycosel® e este tapete fúngico, posteriormente, foi transferido para meio BHI para a reversão em sua fase leveduriforme. A partir desta massa de leveduras foram extraídos os antígenos fúngicos, o extrato lipídico (EL) e a fração álcali-insolúvel (F1), que foram utilizados em todos os experimentos realizados neste trabalho. Os animais utilizados foram camundongos Balb/c machos e estes foram divididos em dois grupos, o grupo infectado e o grupo não infectado. O primeiro grupo recebeu a inoculação intraperitoneal de 10^7 leveduras do fungo *S. schenckii*, enquanto o segundo recebeu a inoculação, pela mesma via, de 100 µL de PBS. Os animais foram eutanasiados na 2^a, 4^a, 6^a e 8^a semanas pós-infecção e tiveram as células do exsudato peritoneal e as células esplênicas totais utilizadas nos experimentos.

Os macrófagos peritoneais foram obtidos a partir das células do exsudato peritoneal por meio de aderência em placa de cultura estéril. A cultura de macrófagos assim estabelecida foi pulsada frente aos estímulos fúngicos (EL e F1), lipopolissacarídeo (LPS) como controle positivo ou apenas meio de cultura (RPMI-C) como controle negativo. Desta cultura, o sobrenadante foi utilizado para a dosagem da produção de NO pela reação de Griess, enquanto que as células aderentes foram utilizadas para o teste de viabilidade celular pelo método do MTT. Além disso, os macrófagos peritoneais foram utilizados para verificar o envolvimento do inflamassoma na esporotricose por meio da caspase-1 ativa.

Com as células esplênicas totais, majoritariamente linfócitos, foi realizada uma cultura celular frente aos antígenos do fungo (EL e F1), concanavalina A (Con-A) utilizada como controle positivo e apenas meio de cultura (RPMI-C) como controle negativo. Estas células foram utilizadas para o teste de viabilidade celular através do método do MTT. Com ambos os tipos celulares, células do exsudato peritoneal e esplênócitos totais, foi realizada uma cocultura celular e esta foi exposta aos estímulos fúngicos EL e F1, LPS e Con-A como controles positivos ou apenas meio de cultura como controle negativo. Após este período, o sobrenadante da cocultura foi coletado e utilizado para determinar a produção das seguintes citocinas: IL-1 β , IL-18, IFN- γ , IL-17, IL-23 e TGF- β .

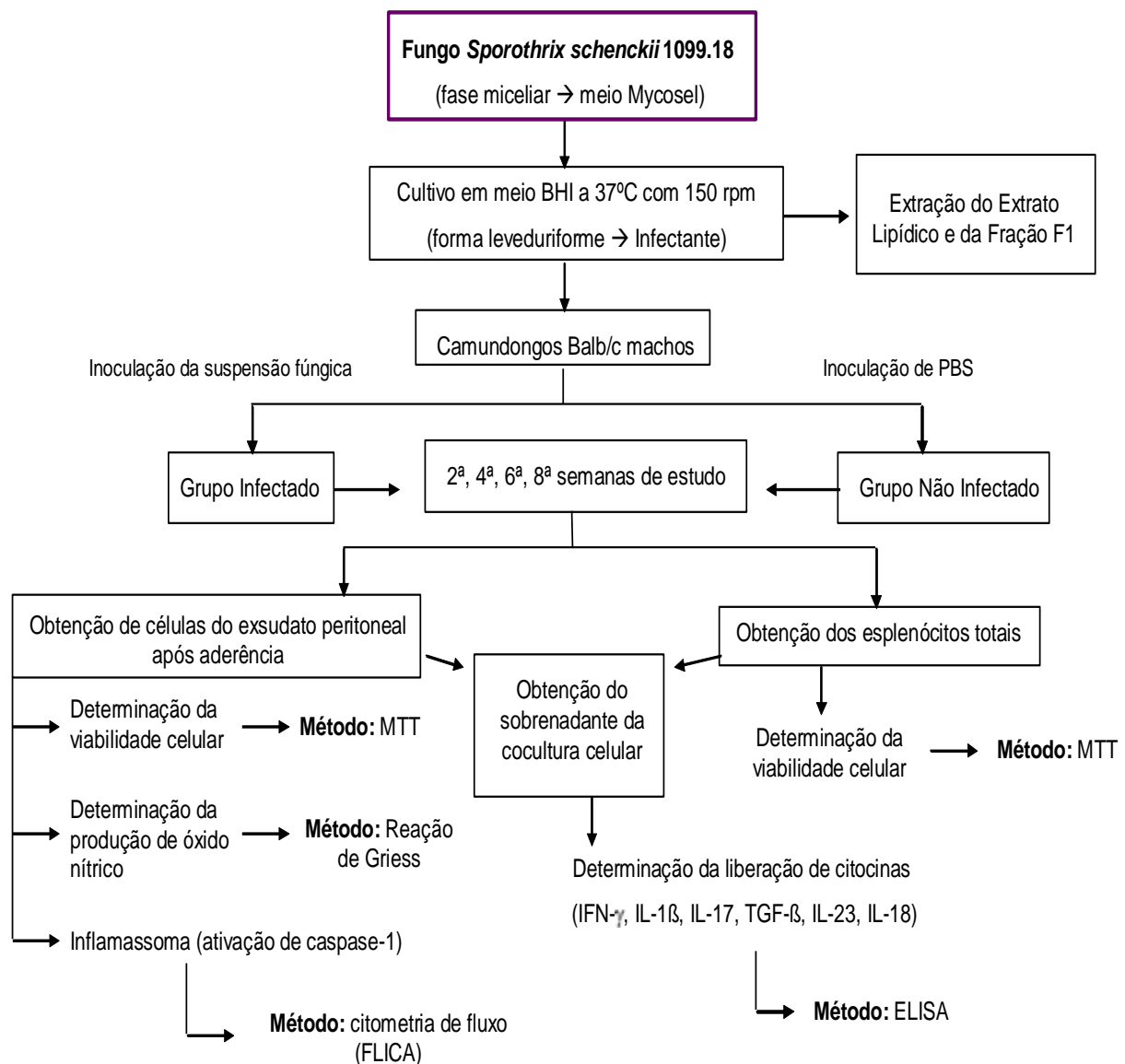


Figura 1 - Delineamento experimental

4.2. Microrganismo e condições de cultura

O fungo *S. schenckii* 1099-18 foi isolado de um caso humano de esporotricose na seção de Micologia do Departamento de Dermatologia da Columbia University, New York, USA; e cedidas pela Dra. Celuta Sales Alviano do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil; ao laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP - Araraquara. A forma miceliar deste micro-organismo foi cultivada em meio ágar Mycosel® em temperatura ambiente, enquanto a forma leveduriforme foi mantida em meio BHI (Brain Heart Infusion, Difco) líquido a 37°C sob agitação constante de 150 rpm.

4.3. Animais

Camundongos Balb/c, machos, pesando entre 18 e 25 g, com aproximadamente quatro semanas de idade, procedentes do CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica), UNICAMP, Campinas, São Paulo, foram utilizados em todos os experimentos. Estes animais foram mantidos em gaiolas com condições ambientais de temperatura e umidade estáveis ($23 \pm 2^\circ\text{C}$ e $56 \pm 2\%$ de umidade relativa do ar) e ciclos de claro/escuro de 12 horas. Os animais receberam água esterilizada e ração (Purina), *ad libitum*. Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, sendo todos os procedimentos 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 n° 16/2012.

4.4. Grupos experimentais

Foram utilizados dois grupos experimentais: o grupo não infectado e o grupo infectado pelo fungo *S. schenckii*. Os animais do grupo infectado foram inoculados, intraperitonealmente, com 100 µL da suspensão fúngica em solução salina tamponada de fosfatos (PBS), pH 7,4 estéril; contendo 10^7 células leveduriformes de *S. schenckii*. Os animais do grupo não infectado receberam a inoculação intraperitoneal de 100 µL de PBS. Os animais infectados e não infectados foram eutanasiados na 2^a, 4^a, 6^a e 8^a semanas pós-infecção para a coleta das células do exsudato peritoneal e esplenócitos totais para análise da resposta imunológica.

4.5. Obtenção dos antígenos de *S. schenckii*

4.5.1. Extrato lipídico

O extrato lipídico (EL) foi extraído a partir da massa de células leveduriformes de *S. schenckii*, obtidas por centrifugação da cultura do fungo em BHI (37°C), por extrações sucessivas em “Waring Blendor” com 10 volumes (mL/g de peso úmido) dos seguintes sistemas solventes: clorofórmio:metanol (C:M) (2:1, v/v) e (1:1, v/v) e clorofórmio:metanol:água (C:M:H) (4:8:3, v/v) e concentrados, em rotaevaporador, até a secura (Carlos *et al.*, 1999). O resíduo lipídico foi ressuspenso em meio RPMI e sonificado até obtenção de uma solução homogênea. A concentração final de uso do EL foi acertada para 5 µg/mL (Kanetsuna *et al.*, 1969; Carlos *et al.*, 1999).

4.5.2. Fração álcali insolúvel

Para a extração da fração álcali-insolúvel (F1), as leveduras do fungo *S. schenckii* foram maceradas para a obtenção da massa celular que foi pesada e tratada com clorofórmio:metanol (C:M) (2:1, v/v) e (1:1, v/v), e clorofórmio:metanol:água (C:M:H) (4:8:3, v/v) para retirada dos lipídeos da parede celular e após centrifugação a 405 xg por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado. Este processo foi repetido por três vezes. O resíduo foi tratado com NaOH 1N sob leve agitação durante 2 horas e posteriormente centrifugado à 405 xg durante 5 minutos, este processo foi repetido por quatro vezes. Os resíduos álcali-insolúveis de cada centrifugação foram unidos e lavados com água destilada até neutralização do pH (7.0). Em seguida, o resíduo total foi lavado com etanol absoluto, acetona e éter etílico e em seguida foi seco à temperatura ambiente. Este resíduo é composto principalmente por quitina e β-glucanas e é denominado de fração álcali-insolúvel (F1). Esse resíduo foi ressuspenso em PBS e sonificado até obtenção de uma solução homogênea. A concentração final de uso do F1 foi acertada para 20 µg/mL. (Kanetsuna *et al.*, 1969; Carlos *et al.*, 1999).

4.6. Obtenção das células do exsudato peritoneal

Os animais infectados e controle, na 2^a, 4^a, 6^a e 8^a semanas de estudo, foram previamente inoculados, via intraperitoneal, com 3 mL de tioglicolato de sódio 3% (Difco Lab. LTDA), três dias antes de serem eutanasiados em câmara de CO₂. Após eutanásia, estes animais tiveram a pele da região abdominal retirada assepticamente em câmara de fluxo laminar Classe 100 (Veco) e o peritônio exposto. Posteriormente, foram inoculados 5,0 mL de PBS estéril, pH 7,4; gelado, na cavidade abdominal, aplicando-se leve massagem para estimular a liberação das células peritoneais. A

suspensão celular resultante foi coletada com auxílio de agulha e seringa, transferida para tubo cônico estéril de 15 mL (Corning, Inc.) e centrifugada a 700 xg durante 5 min (Centrífuga Fanem, Ind. Bras.). O sedimento celular foi lavado 3 vezes com 3 mL de PBS estéril. Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma) contendo 2β-mercaptoetanol (Sigma) a 2×10^{-5} M, penicilina 100U/mL (Sigma), estreptomicina 100 U/mL (Sigma), L-glutamina 2 mM (Sigma) e 5% de soro fetal bovino (Cultilab), sendo o meio assim composto designado de RPMI-1640 completo (RPMI-1640C) para a contagem de células em câmara hemocitométrica tipo Neubauer (Boeco, Germany). A concentração celular foi ajustada para 5×10^6 células/mL em RPMI-C para a realização dos testes propostos.

4.7. Obtenção dos esplenócitos totais

Os animais, infectados e controle, na 2^a, 4^a, 6^a e 8^a semanas de estudo, foram eutanasiados em câmara de CO₂. Após a eutanásia, o peritônio foi exposto e aberto para a extração do baço de forma asséptica em câmara de fluxo laminar Classe 100 (Veco). Os baços foram retirados e macerados em 2 mL de RPMI-1640C, com auxílio de pinça em placa de Petri estéril (Corning, Inc.), para a liberação das células. Após a maceração, a suspensão celular foi homogeneizada e então transferida para tubos Falcon de 15 mL (Corning, Inc.) estéreis e centrifugada por 5 min a 400 xg. As células foram lavadas com solução hipotônica de cloreto de amônio (0,83%) para lisar as hemácias. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com meio de cultura RPMI-1640C nas mesmas condições anteriores. Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio de cultura RPMI-1640C, contadas em câmara de Neubauer (Boeco, Germany) e ajustadas à concentração de 1×10^7 células/mL para a realização dos testes propostos.

4.8. Obtenção do sobrenadante da cocultura

Após a obtenção das células do exsudato peritoneal (item 4.6) e dos esplenócitos totais (item 4.7) dos animais infectados e controle, nas 2^a, 4^a, 6^a e 8^a semanas de estudo, foram cultivados 500 µL das células do exsudato peritoneal, na concentração de 5×10^6 células/mL em RPMI-1640C, em placas de cultura de tecidos de 48 cavidades (Corning, Inc.) por 2 horas a 37 °C com 5 % de CO₂. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados e às células aderentes foram acrescentados 500 µL do EL (2,5 µg/mL), F1 (10 µg/mL), LPS (5 µg/mL - controle positivo), Con-A (0,5 µg/mL – controle positivo)

ou somente meio de cultura RPMI-C (controle negativo), juntamente com 500 µL dos esplenócitos totais, na concentração de 1×10^7 células/mL em RPMI-C, obtidos de animais infectados e controle, respectivamente. As placas foram então incubadas por 24 horas a 37°C em estufa com tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific). Após este período, os sobrenadantes das coculturas foram transferidos para tubos Eppendorf® e centrifugados a 4°C durante 10 min a 35060 xg, aliquotados e estocados em freezer a - 80°C para dosagem das citocinas.

4.9. Avaliação da viabilidade das células do exsudato peritoneal

A viabilidade celular das células do exsudato peritoneal após aderência foi verificada pela metodologia do MTT (Mosmann, 1983), que consiste na capacidade que as células viáveis tem de clivar o anel tetrazólico presente no sal de MTT (brometo de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa, formando cristais de formazana. Em placa de cultura de tecido de 96 cavidades de fundo plano (Corning, Inc.) foram distribuídos 100 µL por cavidade das suspensões de células exsudato peritoneal de animais infectados e controle, ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL em meio de cultura RPMI-1640C, em presença de 100 µL do EL (2,5 µg/mL), F1 (10 µg/mL), LPS (5 µg/mL - controle positivo) ou somente meio de cultura RPMI-1640C (controle negativo). As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific). Após esta incubação, 50 µL dos sobrenadantes foram separados para posterior dosagem de NO, sendo o restante descartado. Às células aderentes expostas aos diferentes estímulos foram adicionados 100 µL de uma solução de MTT a 1 mg/mL diluída em PBS e RPMI-C na proporção de 1:5. A placa foi então incubada por mais 3 horas nas mesmas condições anteriores. Após esta incubação, os sobrenadantes foram descartados e as células aderentes do exsudato peritoneal foram tratadas com 100 µL de isopropanol (Mallinckrodt Chemical) para solubilizar os cristais de formazana formados. A leitura da densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro (Multiskan Ascent, Labsystems) em UV/visível para microplacas em 540 nm, com filtro de referência em 620 nm.

4.10. Avaliação da viabilidade dos esplenócitos totais

Em placa de cultura de tecidos de 96 cavidades de fundo plano (Corning, Inc.) foram distribuídas 100 µL por cavidade das suspensões de células do baço de animais

infectados e controle, ajustadas à concentração de 1×10^7 células/mL em meio de cultura RPMI-C e em presença de 100 μ L do EL (2,5 μ g/mL), F1 (10 μ g/mL), Con-A (0,5 μ g/mL – controle positivo) ou somente meio de cultura RPMI-1640C. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C em estufa com tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific). Após este período, foram acrescentados 20 μ L por cavidade de uma solução de MTT a 5 mg/mL diluída em RPMI-C. A placa foi então incubada por mais 3 h nas mesmas condições anteriores. Ao término desta incubação, as placas foram centrifugadas a 800 xg por 10 min a 10 °C em centrífuga refrigerada (Hettich, Inc.). Os sobrenadantes foram descartados com auxílio de micropipeta, e foram então adicionados 100 μ L de isopropanol (Mallinckrodt Chemical) para solubilizar os cristais de formazana. A leitura da absorvância foi feita em espectrofotômetro UV/visível para microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems) em 540 nm com filtro de referência de 620 nm.

4.11. Determinação da produção de óxido nítrico

O óxido nítrico foi quantificado espectrofotometricamente através do acúmulo de nitrito no sobrenadante da cultura de células do exsudato peritoneal após aderência pela reação de diazotação com o reagente de Griess (1% de sulfanilamida (Merck), 0,1% de dicloro N(1-naftil-1-etilenodiamina) (Merck), 2,5% ácido orto-fosfórico (Mallinckrodt Chemical) e água deionizada q.s.p 100 mL) (Green *et al.*, 1982). As células do exsudato peritoneal, obtidas conforme descrito no item 4.6, de animais infectados e controle, foram cultivadas a 5×10^6 células/mL em RPMI-C, por 24 horas, na presença do EL (2,5 μ g/mL), F1 (10 μ g/mL), LPS (5 μ g/mL - controle positivo) ou somente meio de cultura RPMI-C, a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após esta incubação, alíquotas de 50 μ L do sobrenadante da cultura destas células foram transferidas para outra placa de cultura de células estéril contendo 96 poços de fundo plano (Corning, Inc.) e acrescentou-se 50 μ L da solução de Griess. Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foi feita a leitura da absorvância em espectrofotômetro UV/visível para microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems) em 540 nm. As concentrações de óxido nítrico liberadas nos sobrenadantes das culturas celulares foram calculadas a partir de uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações molares de nitrito de sódio conhecidas e os valores foram expressos em μ mols de nitrito/ 5×10^5 células.

4.12. Ativação de caspase-1 mediada por inflamassoma

Após a obtenção e aderência das células do exsudato peritoneal (item 4.6) dos animais infectados e não infectados, nas 2^a, 4^a, 6^a e 8^a semanas de estudo, foram cultivados 500 µL das células do exsudato peritoneal, na concentração de 2×10^6 células/mL em RPMI-C, em placas de cultura de tecidos de 48 cavidades (Corning, Inc.) por 2 horas a 37 °C com 5 % de CO₂. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados e às células aderentes foram acrescentados 500 µL do EL (2,5 µg/mL), F1 (10 µg/mL), LPS (5 µg/mL - controle positivo) ou somente meio de cultura RPMI-C (controle negativo). As placas foram então incubadas por 2 horas a 37°C em estufa com tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific). Decorrido este período, para visualizar o percentual de células com caspase-1 ativa por meio de citometria de fluxo, o sobrenadante de cada poço foi transferido para tubos de citometria. Em seguida, as células foram lavadas com 1 mL de PBS estéril gelado e acrescentou-se 80 µL de tripsina por poço e incubou-se em estufa a 37° C com 5 % CO₂ durante 10 minutos. Após esta incubação, foram acrescentados 500 µL de meio RPMI, as células foram homogeneizadas e estas foram transferidas para os respectivos tubos de citometria. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 300 xg e os sobrenadantes descartados. Às células foram acrescentados 300 µL de meio RPMI e então adicionados 10 µL do reagente Flica (FAM-YVAD-fmk caspase-1 FLICA™ Kit, Immunochemistry Technologies), pois as células com caspase-1 ativa se ligam covalentemente a este reagente. As suspensões celulares foram homogeneizadas e incubadas por 1 hora em estufa a 37°C com tensão constante de 5 % CO₂. Em seguida, as células foram lavadas com 2 mL Wash Buffer 1X e centrifugadas por 5 minutos a 300 xg, descartou-se o sobrenadante e procedeu-se nova lavagem com 1 mL Wash Buffer 1X. Após a última lavagem, repetiu-se a centrifugação e novamente o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 400 µL de Wash Buffer 1X, homogeneizadas e mantidas em gelo e ao abrigo da luz. A leitura dos resultados foi realizada por citometria de fluxo (FACSCanto BD) e para análise dos dados foi utilizado o programa FACSDiva (BD).

4.13. Determinação da liberação de citocinas

As citocinas IL-1β, IL-18, IFN-γ, IL-17, IL-23, TGF-β foram quantificadas nos sobrenadantes da cocultura de células do exsudato peritoneal após aderência e esplenócitos totais, obtidos conforme descrito no item 4.8, ajustados à concentração de 5×10^6 células/mL e 1×10^7 células/mL, respectivamente, em RPMI-C após 24h de

cultura em presença dos estímulos já citados. Para quantificar a produção de cada citocina, foram utilizados testes imunoenzimático ELISA sandwich (eBioscience®), de acordo com as instruções do fabricante. As placas de 96 orifícios (Corning Inc.) foram adsorvidas com 100 µl/cavidade de anticorpo de captura, monoclonal, obtidos de rato, anti-citocina de camundongo, na concentração adequada para cada citocina, diluído em tampão fosfato de sódio (pH 6,5) ou carbonato de sódio (pH 9,6), conforme indicado pelo fabricante, e incubadas *overnight* à 4 °C. No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS contendo 0,05% de Tween-20 (tampão de lavagem) e bloqueadas com 200 µL/cavidade com diluente de ensaio (tampão PBS acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado, Sigma-Aldrich, pH 7,2 a 7,4) à temperatura ambiente por 60 min. Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem e em seguida foram adicionados 100 µL/cavidade do padrão de citocinas ou dos sobrenadantes das coculturas celulares a serem testados. As placas foram então incubadas à temperatura ambiente por 120 min e então foram lavadas 5 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 diluente de ensaio. As placas foram incubadas por mais 60 min à temperatura ambiente e posteriormente lavadas mais 5 vezes com tampão de lavagem, sendo então adicionados 100 µL/cavidade do conjugado peroxidase-estreptavidina e incubadas novamente à temperatura ambiente por 60 min. Após este período de incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com tampão de lavagem e em seguida foram adicionados 100 µL por cavidade do substrato [10 mM de tampão citrato-fosfato, contendo 0,4 mM de tetrametilbenzidina (Sigma) e 1,2 mM de H₂O₂ (Mallinckrodt Chemical)] e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação foi interrompida adicionando-se 50 µL de H₂SO₄ 2N por cavidade. Nestas reações há formação de cromóforos, que tiveram sua absorvância lida em espectrofotômetro UV/visível para microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems) em 450 nm. As concentrações de cada citocina foram quantificadas com base em uma curva padrão previamente estabelecida e os resultados foram expressos em pg/mL.

4.14. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada por intermédio do programa estatístico GraphPad InStat, aplicando-se análise de variância com determinação do nível de significância para $p < 0,05$, através de comparações múltiplas (teste de Tukey).

5. Resultados

5.1. Determinação da viabilidade das células do exsudato peritoneal

A determinação da viabilidade das células do exsudato peritoneal, após aderência, obtidas de camundongos Balb/c, foi realizada em diferentes períodos da infecção com o fungo *S. schenckii* e do grupo não infectado. As células foram mantidas em cultura por 24 horas em presença dos antígenos do fungo EL e F1, do LPS como controle positivo ou somente meio RPMI-C como controle negativo. Os resultados obtidos foram expressos em percentual de viabilidade como média \pm desvio padrão de cinco animais por grupo por semana estudada na Figura 2. Considerando-se como a maior viabilidade celular (100%) aquelas culturas celulares realizadas somente em presença de meio RPMI-C, foram calculados os demais percentuais das substâncias testadas no presente estudo.

As células dos animais infectados, quando tratadas com o EL, foram suscetíveis à presença deste estímulo na cultura celular, com menor viabilidade observada durante todas as semanas (exceto na sexta), principalmente na segunda ($p < 0,001$) e quarta semanas ($p < 0,05$) quando comparadas ao controle negativo. Quando comparado às células dos animais infectados expostas ao mesmo antígeno durante as outras semanas, a maior citotoxicidade ocorreu na segunda ($p < 0,001$ entre a segunda e demais semanas). Em relação à exposição das células dos animais infectadas ao F1, pode-se observar viabilidade diminuída na segunda e quarta semanas de infecção, porém esta redução não foi estatisticamente significativa.

As células dos animais não infectados não apresentaram diferenças significativas na viabilidade quando expostas aos estímulos citados. Apenas as células não infectadas tratadas com o EL apresentaram pequena variação na viabilidade, sendo os menores valores encontrados na segunda e quarta semanas do estudo, sem diferenças significativas em relação às demais semanas. Quando expostas ao F1, apresentaram 100% de viabilidade durante todas as semanas estudadas, indicando que, nas concentrações estudadas, estes compostos não apresentaram toxicidade para estas células. Tanto as células dos animais infectados quanto dos não infectados, quando estimuladas com LPS, mostraram-se totalmente viáveis durante todas as semanas estudadas.

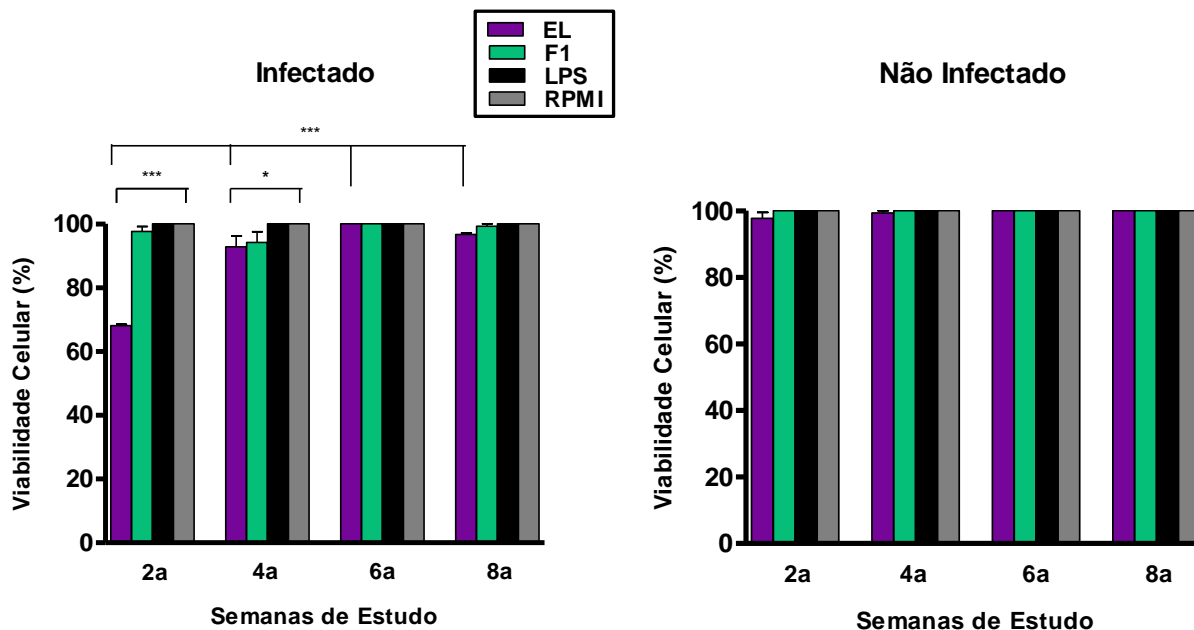


Figura 2 – Viabilidade das células do exsudato peritoneal, após aderência, de camundongos Balb/c infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii* durante oito semanas. As PECs, após aderência, dos animais infectados e não infectados foram cultivados em presença do EL, F1, LPS ou somente em presença do meio RPMI-1640C. Cada animal estudado foi avaliado em triplicata no momento de execução do teste e esses resultados apresentam valores de três experimentos independentes Os resultados foram expressos em percentual (%) como média \pm desvio padrão de cinco animais por semana (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

5.2. Determinação da viabilidade dos esplenócitos totais

A determinação da viabilidade das células esplênicas totais, obtidas de camundongos Balb/c, foi realizada em diferentes períodos da infecção com o fungo *S. schenckii* e do grupo não infectado. As células foram mantidas em cultura por 24 horas em presença dos antígenos do fungo EL e F1, Con-A como controle positivo ou somente meio RPMI-C como controle negativo. Os resultados obtidos foram expressos em percentual de viabilidade como média \pm desvio padrão de cinco animais por grupo por semana estudada na Figura 3. Considerando-se como a maior viabilidade celular (100%) aquelas culturas celulares realizadas somente em presença de meio RPMI-C, foram calculados os demais percentuais das substâncias testadas no presente estudo.

Quando as células dos animais infectados foram expostas aos antígenos fúngicos, observou-se menor viabilidade em todas as semanas quando comparadas aos controles negativos, porém sem diferenças significativas. Observou-se que a citotoxicidade foi mais pronunciada quando as células dos animais infectadas foram expostas ao EL do que à F1 em todas as semanas de estudo, sem diferenças significativas.

As células dos animais não infectados apresentaram menor viabilidade quando expostas aos antígenos do fungo, com exceção da segunda semana. Na oitava semana, quando expostas ao EL, observou-se redução da viabilidade destas células quando comparada ao controle negativo ($p < 0,001$) e às células expostas ao mesmo estímulo na segunda ($p < 0,001$), quarta ($p < 0,05$) e sexta semanas ($p < 0,05$). Em relação ao F1, as células não infectadas apresentaram menor viabilidade na quarta e oitava semanas quando comparada aos controles negativos ($p < 0,01$).

Com a exposição das células dos animais infectados à Con-A, verificou-se que apresentaram diminuição da viabilidade celular quando comparada ao controle negativo em todas as semanas, no entanto sem diferenças significativas. As células obtidas dos animais não infectados expostas a este mesmo estímulo, na oitava semana, apresentaram menor viabilidade quando comparada ao controle negativo ($p < 0,01$) e às células expostas ao mesmo estímulo na quarta e sexta semanas ($p > 0,01$).

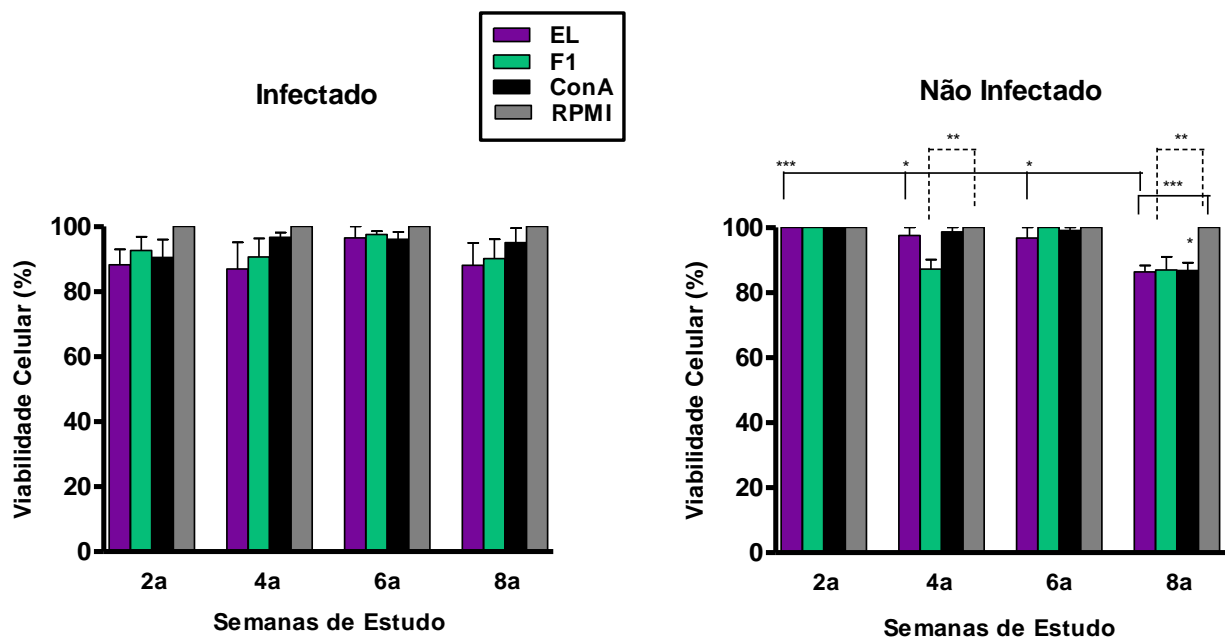


Figura 3 – Viabilidade dos esplenócitos totais de camundongos Balb/c infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii* durante oito semanas. Os esplenócitos dos animais infectados e não infectados foram cultivados em presença do EL, F1, Con-A ou somente em presença do meio RPMI-1640C. Cada animal estudado foi avaliado em triplicata no momento de execução do teste e esses resultados apresentam valores de três experimentos independentes. Os resultados foram expressos em percentual (%) como média \pm desvio padrão de cinco animais por semana (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5.3. Determinação da produção de óxido nítrico

A determinação da liberação do NO foi realizada nos sobrenadantes de culturas das células do exsudato peritoneal, após aderência, obtidas de camundongos Balb/c em diferentes períodos da infecção com o fungo *S. schenckii* e do grupo não infectado. As células foram mantidas em cultura por 24 horas em presença dos antígenos do fungo, EL e F1, do LPS como controle positivo ou somente meio RPMI-C como controle negativo. As concentrações de nitrito foram obtidas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio (NaNO₂) e os resultados obtidos foram expressos em percentual de viabilidade como média ± desvio padrão de cinco animais por grupo por semana estudada na Figura 4.

No grupo dos animais infectados verificou-se que a produção de NO foi elevada quando as células foram expostas aos antígenos fúngicos, principalmente entre a quarta e sexta semanas. Quando expostas ao EL ocorreu maior produção de NO entre a quarta e sexta semanas, com diferença significativa em relação à produção desta molécula pelas células expostas ao mesmo estímulo durante as outras semanas ($p < 0,001$ entre a segunda e quarta e $p < 0,05$ entre a sexta e oitava semana) e aos respectivos controles negativos de cada semana ($p < 0,001$). Quando estimuladas com F1 houve pequena produção de NO na segunda semana seguida níveis elevados nas outras semanas, com pico de concentração na sexta semana ($p < 0,001$ entre a quarta e sexta semanas) e com diferenças significativas ($p < 0,001$) entre a sexta e oitava semanas quando comparadas aos controles negativos.

Nos camundongos não infectados a produção de óxido nítrico foi baixa durante todas as semanas. Quando as células não infectadas foram expostas ao EL, não foi possível detectar a produção de NO durante toda a cinética. O F1 foi o único antígeno a induzir a produção desta molécula pelas células não infectadas, principalmente na sexta semana, mas sem diferenças significativas.

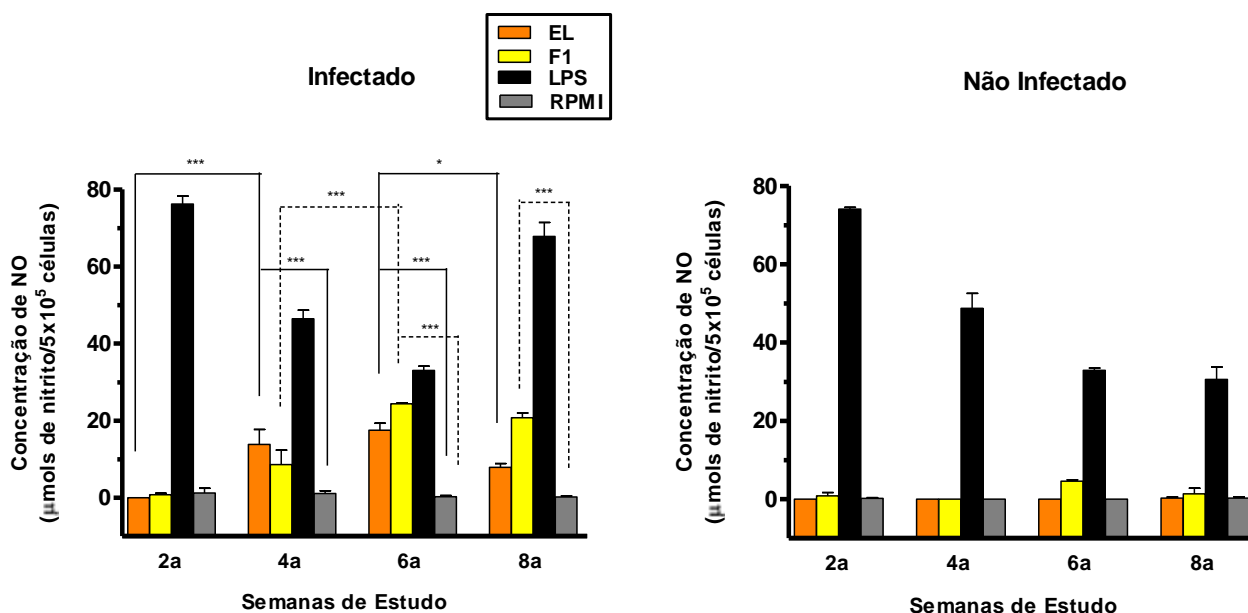


Figura 4 – Produção de NO em cultura de células do exsudato peritoneal, após aderência, de camundongos Balb/c infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii* durante oito semanas. As PECs, após aderência, dos animais infectados e não infectados foram cultivados em presença do EL, F1, LPS ou somente em presença do meio RPMI- 1640. Cada animal estudado foi avaliado em triplicata no momento da execução do teste e esses resultados apresentam valores de três experimentos independentes. As concentrações de nitrito foram obtidas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de NaNO₂ e os resultados expressos em µmols de nitrito/5x10⁵ células, como média ± desvio padrão de cinco animais por semana (*p<0,05; *** p<0,001).

5.4. Determinação de caspase-1 ativa mediada pelo inflamassoma

A determinação da caspase-1 ativa foi realizada nas células do exsudato peritoneal, após aderência, obtidas de camundongos Balb/c em diferentes períodos da infecção com o fungo *S. schenckii* e do grupo não infectado. As células foram mantidas em cultura por 2 horas em presença dos antígenos fúngicos, EL e F1, do LPS (controle positivo) ou somente meio RPMI-C (controle negativo). A presença de caspase-1 ativa nas PECs foi avaliada empregando-se a técnica de citometria de fluxo, através da ligação covalente do reagente FLICA, substância célula permeável, às caspase-1 ativas, proporcionando coloração esverdeada. Os resultados obtidos estão representados na Figura 5 e foram expressos como média \pm desvio padrão do percentual de células com caspase-1 ativa.

Nas células dos animais infectadas, quando expostas ao EL e à F1, o percentual de caspase-1 ativa foi mais elevado na segunda semana, com menores níveis na quarta ($p < 0,001$ entre segunda e quarta semanas) e sexta semanas, atingindo maiores percentuais na oitava semana ($p < 0,001$ entre sexta e oitava semanas). Ainda nestes animais, verificou-se que houve maior percentual de células com caspase-1 ativa quando expostas ao EL na segunda ($p < 0,001$), quarta ($p < 0,05$) e sexta semanas ($p < 0,001$) quando comparadas aos controles negativos. Quando expostas ao F1, o maior percentual de caspase-1 ativa, quando comparadas ao controle negativo, ocorreu na segunda e quarta semanas ($p < 0,001$).

O percentual de células dos animais infectados com caspase-1 ativa quando expostas aos antígenos do fungo foi semelhante entre as semanas estudadas, com exceção da quarta semana, em que houve maior quantidade de caspase-1 ativa frente às células expostas ao F1 do que ao EL. Do mesmo modo, o percentual de células dos animais infectados com caspase-1 ativa quando expostas aos antígenos do fungo foi maior que nas células expostas ao LPS durante todas as semanas estudadas. Observou-se que nas células dos camundongos infectados houve um percentual maior de caspase-1 ativa quando expostas somente ao RPMI durante todas as semanas de estudo pelo fato de serem originadas de animais acometidos pela esporotricose.

Entre os camundongos não infectados foram observados baixos percentuais de células com caspase-1 ativa durante as oito semanas de estudo. Quando expostas ao EL apresentaram maior percentual celular com caspase-1 ativa, quando comparadas ao controle negativo, na quarta ($p < 0,01$) e sexta ($p < 0,05$) semanas. Já quando foram expostas ao F1 apresentaram diferenças significativas durante todas as semanas quando

comparadas com os respectivos controles negativos ($p < 0,001$). Quando expostas ao EL, houve baixo percentual de células com caspase-1 ativa na segunda semana, seguida de maiores porcentagens nas outras semanas ($p < 0,001$). Em relação ao F1, houve maior percentual de células com caspase-1 ativa na quarta (p < 0,001 entre a segunda e quarta semana) e oitava semanas (p < 0,001 entre a sexta e oitava semana). De forma geral, houve maior percentual de células com caspase-1 ativa nas células expostas ao F1 do que ao EL durante todas as semanas estudadas (p < 0,01 na segunda semana).

As Figuras 6 e 7 representam histogramas e gráficos “dot plots” representativos dos controles de calibração do citômetro de fluxo nas células do exsudato peritoneal, após aderência, em camundongos Balb/c infectados e não infectados pelo fungo *S. schenckii*. Os valores apresentados nos quadrantes correspondem ao controle de células e ao reagente Flica.

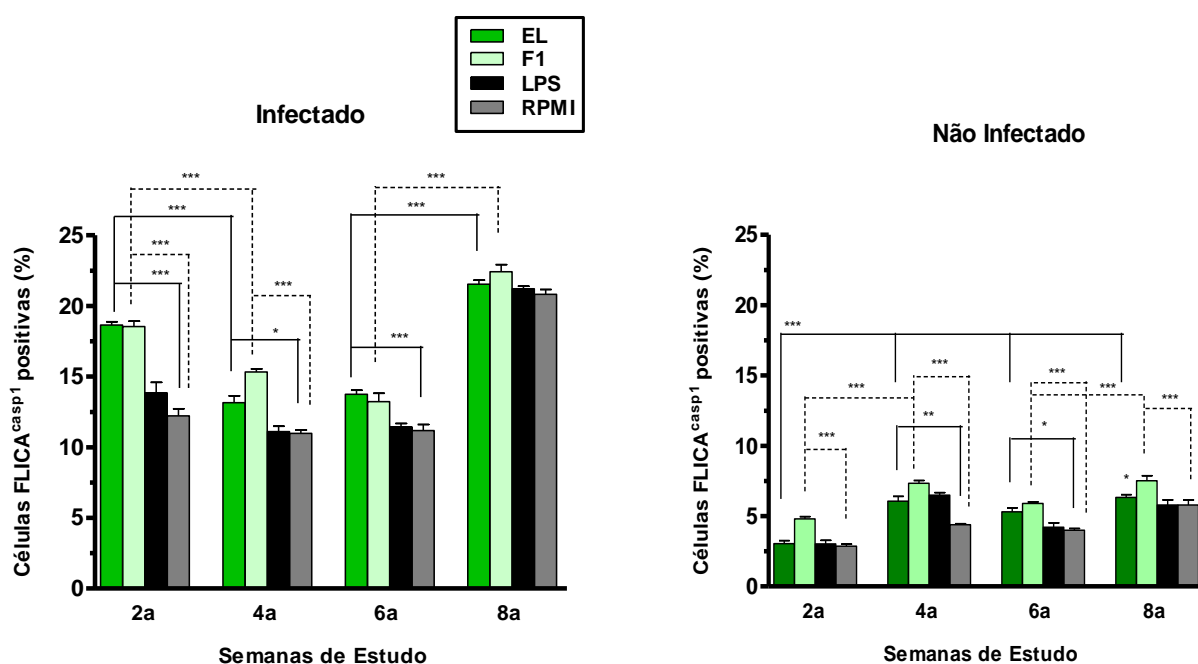


Figura 5 – Determinação de caspase-1 ativa mediada pelo inflamassoma nas células do exsudato epritoneal, após aderência, de camundongos Balb/c infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii* durante oito semanas. As PECs, após aderência, de camundongos infectados e não infectados foram cultivados em presença de EL, F1, LPS ou somente em meio RPMI-C durante 2 horas. A caspase-1 ativa foi quantificada pela técnica de citometria de fluxo através da determinação de FLICA. Esses resultados apresentam valores de três experimentos independentes. Os resultados foram expressos em percentual de células com caspase-1 ativa como média \pm desvio padrão de cinco animais por semana (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

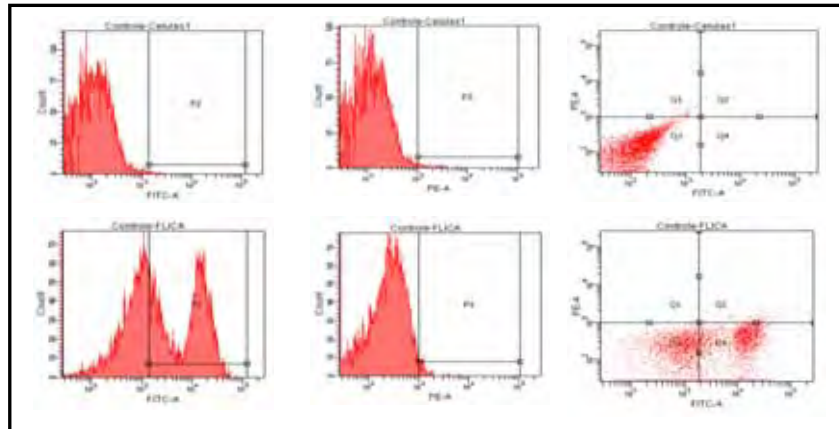


Figura 6 – Histogramas e gráficos “dot plots” representativos dos controles de calibração do citometro de fluxo nas células do exsudato peritoneal, após a aderência, obtidas de camundongos Balb/c infectados pelo fungo *S. schenckii*. Os valores apresentados nos quadrantes correspondem ao controle de células e ao reagente FLICA na primeira e segunda linhas, respectivamente.

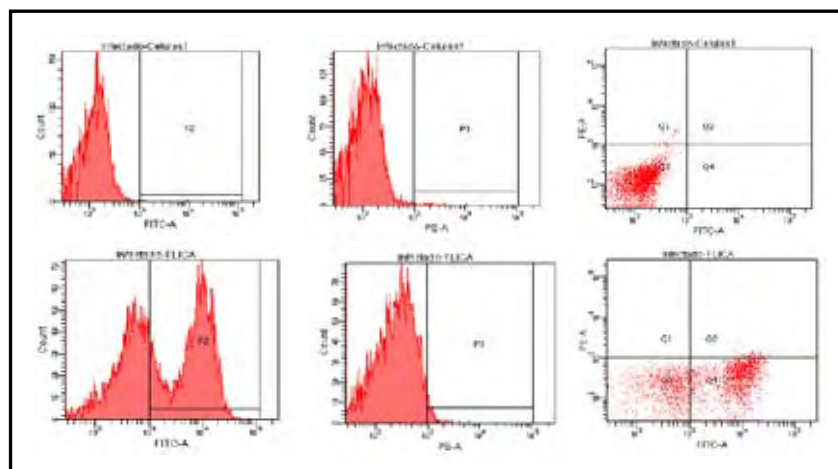


Figura 7 – Histogramas e gráficos “dot plots” representativos dos controles de calibração do citometro de fluxo nas células do exsudato peritoneal, após a aderência, obtidas de camundongos Balb/c não infectados pelo fungo *S. schenckii*. Os valores apresentados nos quadrantes correspondem ao controle de células e reagente FLICA na primeira e segunda linhas, respectivamente.

5.5. Determinação da produção de IL-1 β

A determinação da produção de IL-1 β foi realizada no sobrenadante da cocultura de células do exsudato peritoneal, após aderência, e esplenócitos totais de camundongos Balb/c em diferentes períodos da infecção com o fungo *S. schenckii* e do grupo não infectado, em presença dos antígenos do fungo, EL e F1, do LPS e Con-A como controles positivos ou somente meio RPMI-C como controle negativo. Os resultados obtidos foram calculados através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IL-1 β e estão representados como média \pm desvio padrão de cinco animais por grupo por semana estudada na Figura 8.

As células dos animais infectados quando estimuladas com os antígenos fúngicos apresentaram uma menor produção de IL-1 β no período entre a quarta e sexta semanas de infecção, sendo estatisticamente significativo ($p < 0,001$) em relação às outras semanas. A resposta das células infectadas ao EL e à F1 foi elevada na segunda semana seguida por uma menor produção da IL-1 β na quarta e sexta semanas ($p < 0,001$ em relação às demais semanas) e novo aumento na oitava semana. A produção de IL-1 β pelas células dos animais infectados teve maiores concentrações na segunda semana quando expostas ao EL e na oitava semana em relação à F1, com $p < 0,001$ quando comparados com os respectivos controles negativos. Além disso, pode-se observar que a produção desta citocina na oitava semana entre os antígenos foi maior pelas células expostas à F1 ($p < 0,001$) quando comparada àquelas expostas ao EL.

A avaliação da liberação de IL-1 β no sobrenadante da cocultura de células de camundongos não infectados mostrou que os antígenos fúngicos testados induziram níveis baixos desta citocina durante todas as semanas. Quando expostas ao EL na segunda semana, apresentaram diferenças significativas ($p < 0,001$) em relação ao controle negativo assim como em relação às células expostas ao mesmo antígeno durante as outras semanas.

Quando a cocultura celular dos animais infectados e não infectados foram tratadas com o LPS, perfis diferentes na produção de IL-1 β nos grupos estudados foram observados, com níveis menores na produção desta citocina pelas células de camundongos normais. Quando as células dos animais não infectados foram estimuladas com os controles positivos, produziram mais este mediador frente ao LPS do que ao Con-A ($p < 0,001$). As células dos animais infectadas apresentaram o mesmo perfil, mas com diferença estatística ($p < 0,001$) na segunda e oitava semanas.

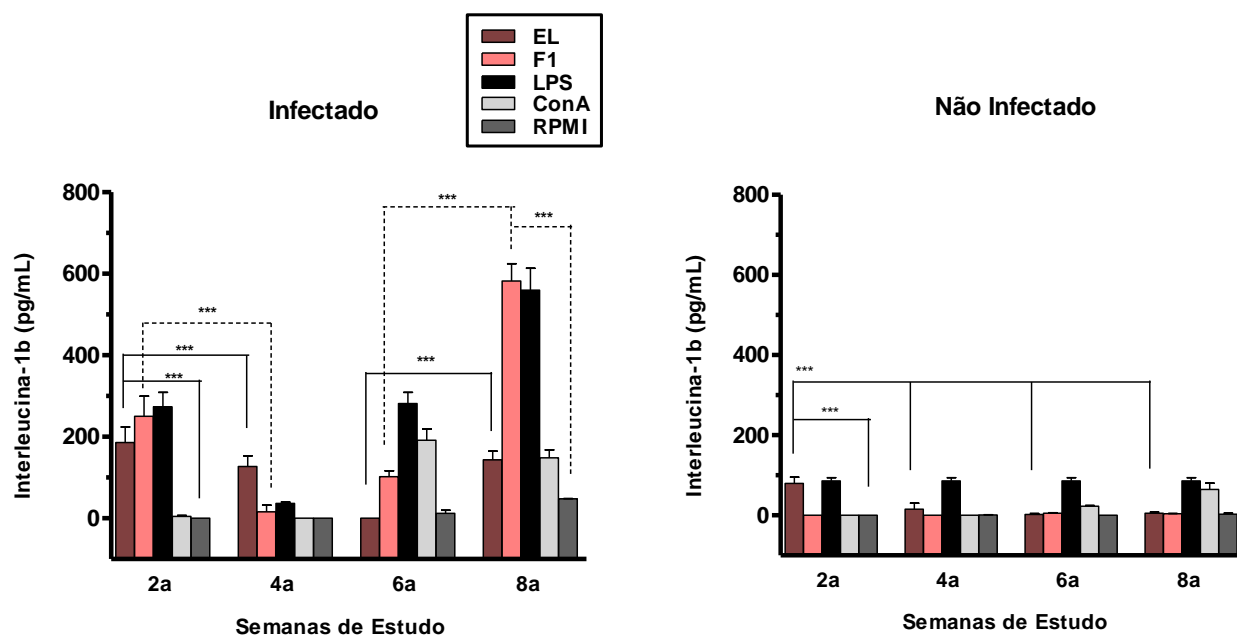


Figura 8 – Concentração de IL-1 β liberada no sobrenadante da cocultura de células do exsudato peritoneal, após aderência, e esplenócitos totais de camundongos Balb/c infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii* durante oito semanas. As PECs, após aderência, e os esplenócitos totais de camundongos infectados e não infectados foram cultivados em presença de EL, F1, LPS, Con-A ou somente em meio RPMI-C. As concentrações de IL-1 β foram determinadas através de teste ELISA e calculadas utilizando uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas. Esses resultados apresentam valores de três experimentos independentes. Os resultados foram expressos em pg/mL como média \pm desvio padrão de cinco animais por semana (***) $p < 0,001$.

5.6. Determinação da produção da IL-18

A determinação da produção da IL-18 foi realizada no sobrenadante da cocultura de células do exsudato peritoneal, após aderência, e esplenócitos totais de camundongos Balb/c em diferentes períodos da infecção com o fungo *S. schenckii* e do grupo não infectado, em presença dos antígenos fúngicos, EL e F1, do LPS e Con-A como controles positivos ou somente meio RPMI-C como controle negativo. Os resultados obtidos foram calculados através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IL-18 e estão representados como média \pm desvio padrão de cinco animais por grupo por semana estudada na Figura 9.

Entre os animais infectados observou-se elevada produção de IL-18 quando as células foram expostas aos antígenos do fungo na segunda semana, com diminuição progressiva da concentração durante as outras semanas. As células dos animais infectados expostas ao EL e ao F1 produziram IL-18 de forma semelhante, com pico de concentração da segunda semana e menor produção na oitava semana. A produção de IL-18 pelas células infectadas expostas aos antígenos do fungo foi significativamente maior durante todas as semanas quando comparadas ao controle negativo, com $p < 0,001$ na segunda, quarta e sexta semanas e $p < 0,05$ na oitava semana. A produção desta citocina frente ao EL e ao F1 na segunda semana foi maior ($p < 0,001$) quando comparado às outras semanas quando as células foram expostas ao mesmo estímulo.

Em relação às células dos camundongos não infectados houve baixa produção de IL-18 em todas as semanas quando expostas aos antígenos fúngicos. Houve pequena produção desta citocina quando as células foram expostas ao EL e ao F1 na sexta e oitava semanas com diferenças significativas em relação às outras semanas ($p < 0,001$) quando expostas aos mesmos estímulos. Não houve diferenças significativas em relação ao controle negativo.

As células infectadas expostas aos controles positivos produziram mais IL-18 quando expostas ao LPS, com diferenças significativas em relação ao Con-A durante todas as semanas ($p < 0,001$), exceto na oitava semana ($p < 0,05$). As células não infectadas expostas aos controles positivos não apresentaram diferenças significativas em relação a produção de IL-18, com exceção da oitava semana ($p < 0,001$).

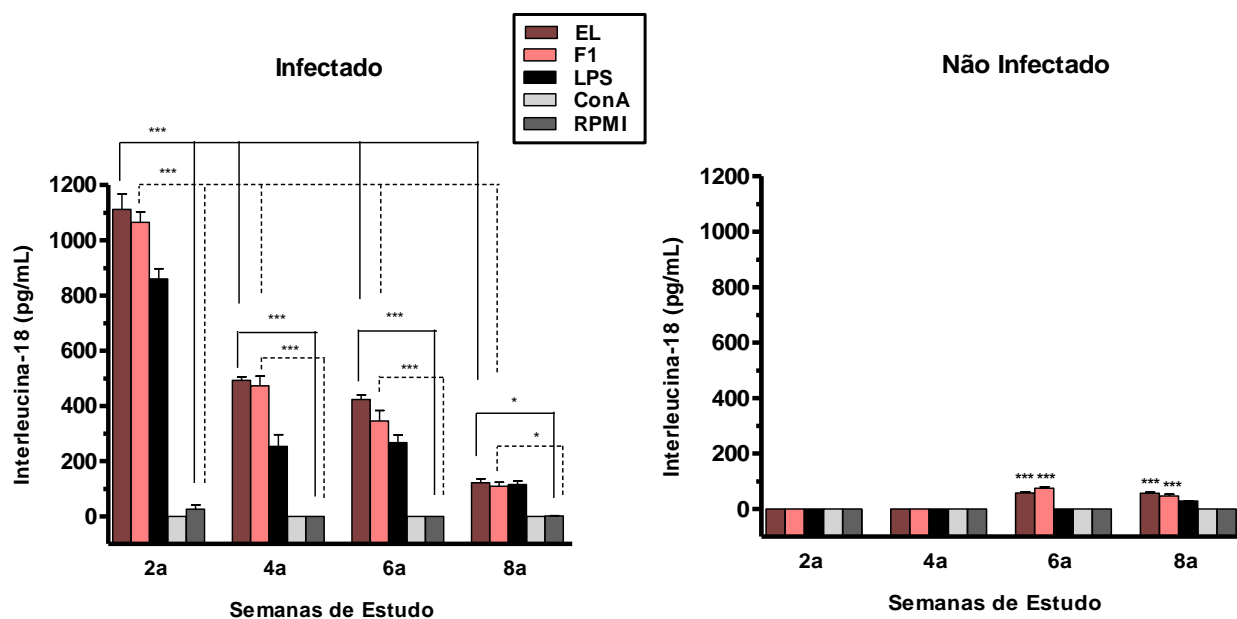


Figura 9 – Concentração de IL-18 liberada no sobrenadante da cocultura de células do exudato peritoneal, após aderência, e esplenócitos totais de camundongos Balb/c infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii* durante oito semanas. As PECs, após aderência, e os esplenócitos totais de camundongos infectados e não infectados foram cultivados em presença de EL, F1, LPS, Con-A ou somente em meio RPMI-C. As concentrações de IL-18 foram determinadas através de teste ELISA e calculadas utilizando uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas. Esses resultados apresentam valores de três experimentos independentes. Os resultados foram expressos em pg/mL como média \pm desvio padrão de cinco animais por semana (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

5.7. Determinação da produção de IFN- γ

A determinação da produção de IFN- γ foi realizada no sobrenadante da cocultura de células do exsudato peritoneal, após a aderência, e esplenócitos totais de camundongos Balb/c em diferentes períodos da infecção com o fungo *S. schenckii* e do grupo não infectado, em presença dos antígenos do fungo, EL e F1, do LPS e Con-A como controles positivos ou somente meio RPMI-C como controle negativo. Os resultados obtidos foram calculados através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IFN- γ e estão representados como média \pm desvio padrão de cinco animais por grupo por semana estudada na Figura 10.

As células dos animais infectados expostas ao EL e ao F1 apresentaram elevadas concentrações de IFN- γ em todas as semanas, com diferenças significativas ($p < 0,001$) quando comparadas com os controles negativos. Quando expostas ao EL verificou-se elevada produção de IFN- γ durante toda a cinética, com pico de produção na sexta semana ($p < 0,05$ entre sexta e quarta semana e $p < 0,001$ entre a sexta e oitava semanas). Em resposta ao F1, as células dos camundongos infectados produziram quantidades elevadas de IFN- γ na segunda e quarta semanas, com pico de concentração na oitava semana de infecção ($p < 0,001$ entre oitava e sexta semana), sendo observada menor produção de IFN- γ na sexta semana ($p < 0,001$ entre a quarta e sexta semana). Considerando-se os diferentes antígenos, a produção de IFN- γ foi maior pelas células infectadas expostas ao F1 do que àquelas expostas ao EL em todas as semanas ($p < 0,001$ na segunda, quarta e oitava semanas), exceto na sexta semana.

As células dos animais não infectados expostas ao EL apresentaram maior produção de IFN- γ do que o controle negativo durante todas as semanas, com $p < 0,01$ na quarta semana. Quando estimuladas com F1 apresentaram maior produção de IFN- γ quando comparadas com o controle negativo na segunda ($p < 0,01$), quarta ($p < 0,001$), sexta ($p < 0,001$) e oitava semanas ($p < 0,001$). Quando as células dos animais não infectados foram estimuladas com F1, verificou-se maior produção de IFN- γ durante a quarta ($p < 0,01$ entre a quarta e segunda) e sexta semanas ($p < 0,001$ entre sexta e oitava). Outra diferença verificada foi a produção deste mediador comparando as células não infectadas expostas ao EL e ao F1 durante a sexta e oitava semanas, sendo maior a produção pelo estímulo F1 ($p < 0,001$) em ambas as semanas.

Quando a cocultura de células dos animais infectados e não infectados foram tratadas com o LPS, foi observado um perfil semelhante de produção de IFN- γ em

ambos os grupos estudados, embora com níveis menores não significativos produzidos pelas células dos camundongos não infectados. Houve maior produção desta citocina pelas células dos animais infectados e não infectados quando estimuladas com LPS do que pela Con-A em todas as semanas ($p < 0,001$).

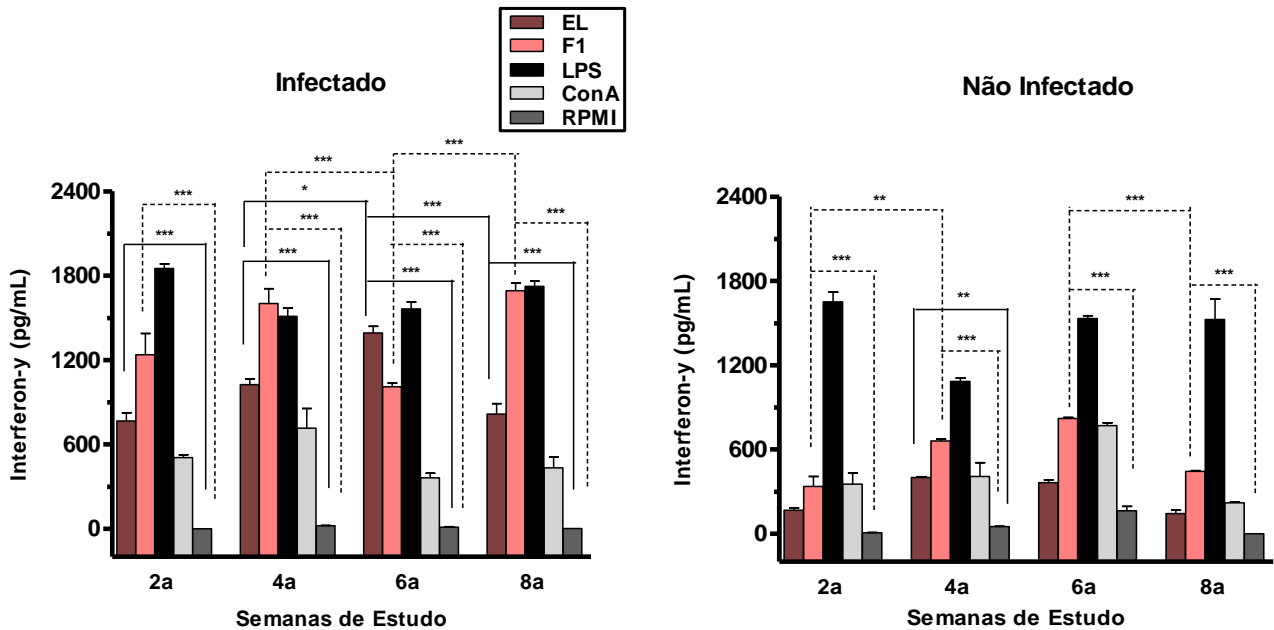


Figura 10 – Concentração de IFN- γ liberado no sobrenadante da cocultura de células do exsudato peritoneal, após aderência, e esplenócitos totais de camundongos Balb/c infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii* durante oito semanas. As PECs, após aderência, e os esplenócitos totais de camundongos infectados e não infectados foram cultivados em presença de EL, F1, LPS, Con-A ou somente em meio RPMI-C1640. As concentrações de IFN- γ foram determinadas através de teste ELISA e calculadas utilizando uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas. Esses resultados apresentam valores de três experimentos independentes. Os resultados foram expressos em pg/mL como média \pm desvio padrão de cinco animais por semana (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5.8. Determinação da produção de IL-17

A determinação da produção de IL-17 foi realizada no sobrenadante da cocultura de células do exsudato peritoneal, após aderência, e esplenócitos totais de camundongos Balb/c em diferentes períodos da infecção com o fungo *S. schenckii* e do grupo não infectado, em presença dos antígenos fúngicos, EL e F1, do LPS e Con-A como controles positivos ou somente meio RPMI-C como controle negativo. Os resultados obtidos foram calculados através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IL-17 e estão representados como média \pm desvio padrão de cinco animais por grupo por semana estudada na Figura 11.

Quando as células dos camundongos infectados foram tratadas com o EL foi observado menores níveis na produção desta citocina nas semanas iniciais, com pequeno aumento na sexta e oitava semanas, sem diferenças significativas. Além disso, não houve diferença significativa entre a produção de IL-17 frente a este antígeno quando comparado com o controle negativo durante todas as semanas. No entanto, quando estas células foram expostas ao F1 houve produção de IL-17 em todas as semanas, com diferença significativa ($p < 0,001$) quando comparada com os controles negativos na segunda, sexta e oitava semanas. A produção de IL-17 frente a este antígeno foi maior na segunda e oitava semanas ($p < 0,001$ em relação às demais semanas). Além disso, houve maior produção desta citocina pelas células obtidas dos animais infectados expostas ao F1 do que ao LPS em todas as semanas, exceto na quarta semana, com estatística significativa ($p < 0,001$) na segunda e oitava semanas. De forma geral, verificou-se maior produção deste mediador frente a F1 do que ao EL em todas as semanas de infecção, com $p < 0,001$ na segunda, sexta e oitava semanas.

Entre os camundongos do grupo não infectado, não houve diferenças significativas na produção de IL-17 quando as células foram expostas aos antígenos fúngicos, com exceção das células estimuladas com o F1 na sexta semana ($p < 0,05$ entre sexta e quarta semanas). Já quando o EL foi exposto a estas células, observou-se que não houve produção de IL-17 durante as oito semanas estudadas. Houve maior produção deste mediador frente à F1 do que em relação ao EL, em todas as semanas, com diferenças significativas ($p < 0,01$) apenas na sexta semana.

As células dos animais não infectados produziram maiores concentrações de IL-17 pelo estímulo com LPS do que com Con-A, com $p < 0,001$ na segunda, quarta e sexta semanas e $p < 0,05$ na oitava semana. No grupo infectado verificou-se o mesmo perfil, com $p < 0,001$ na segunda, sexta e oitava semanas.

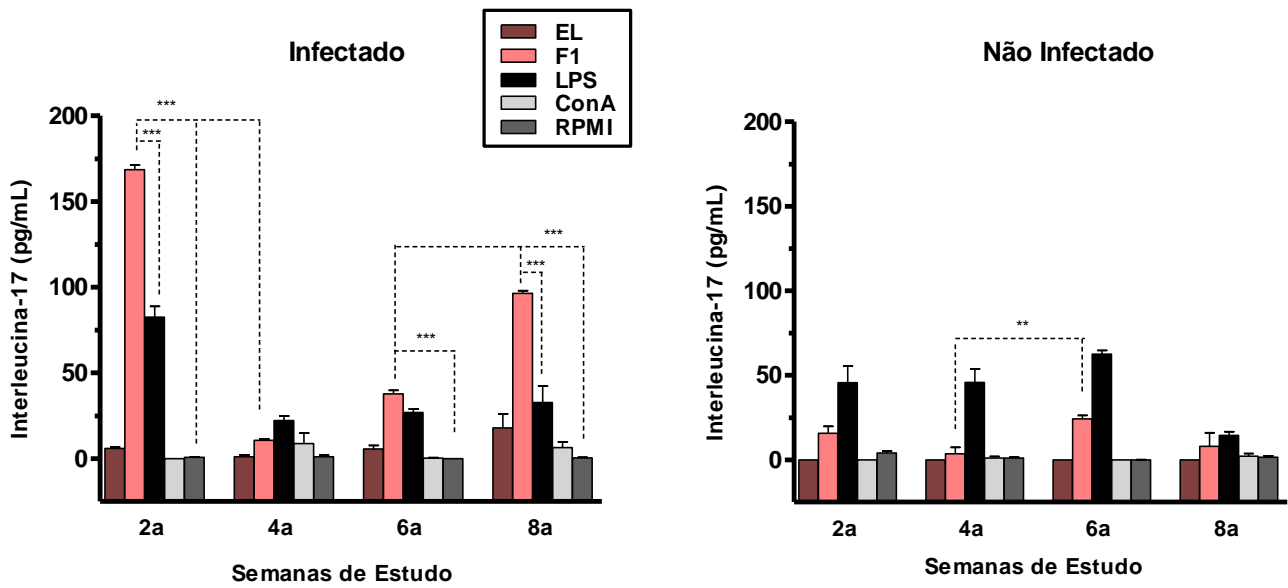


Figura 11 – Concentração de IL-17 liberada no sobrenadante da cocultura de células do exudato peritoneal, após aderência, e esplenócitos totais de camundongos Balb/c infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii* durante oito semanas. As PECs, após aderência, e os esplenócitos totais de camundongos infectados e não infectados foram cultivados em presença de EL, F1, LPS, Con-A ou somente em meio RPMI-C. As concentrações de IL-17 foram determinadas através de teste ELISA e calculadas utilizando uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas. Esses resultados apresentam valores de três experimentos independentes. Os resultados foram expressos em pg/mL como média \pm desvio padrão de cinco animais por semana (** $p < 0.01$; *** $p < 0,001$).

5.9. Determinação da produção de IL-23

A determinação da produção da IL-23 foi realizada no sobrenadante da cocultura de células do exsudato peritoneal, após aderência, e esplenócitos totais de camundongos Balb/c em diferentes períodos da infecção com o fungo *S. schenckii* e do grupo não infectado, em presença dos antígenos fúngicos, EL e F1, do LPS e Con-A como controles positivos ou somente meio RPMI-C como controle negativo. Os resultados obtidos foram calculados através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IL-23 e estão representados como média \pm desvio padrão de cinco animais por grupo por semana estudada na Figura 12.

A produção de IL-23 pelas células dos animais infectadas expostas ao EL foi elevada na segunda e sexta semanas, com menor concentração na quarta e oitava semanas ($p < 0,001$ entre a segunda e demais semanas), e quando comparadas ao controle negativo, observou-se uma diferença significativa ($p < 0,001$) apenas na segunda e sexta semanas. Já quando as células foram expostas ao F1 verificou-se que a produção da IL-23 foi elevada na segunda e oitava semanas, com menor produção nas semanas intermediárias ($p < 0,001$ entre a segunda e quarta semana), e a produção deste mediador foi significativamente maior na segunda, sexta e oitava semanas ($p < 0,001$) quando comparadas ao controle negativo. A produção de IL-23 pelas células infectadas foi maior quando expostas ao antígeno F1 do que ao EL durante todas as semanas de infecção ($p < 0,001$ na oitava semana), com exceção da sexta semana.

Entre as células dos camundongos do grupo não infectado, praticamente não houve produção de IL-23 durante todas as semanas, com exceção daquelas expostas ao EL na segunda semana, com diferenças significativas ($p < 0,01$) quando comparada com o controle negativo, assim como em relação à produção desta citocina pelas células expostas ao mesmo estímulo na sexta e oitava semanas ($p < 0,01$).

A produção de IL-23 pelas células infectadas foi maior quando expostas ao LPS do que ao Con-A na sexta ($p < 0,001$) e oitava ($p < 0,05$) semanas, não havendo concentrações detectáveis deste mediador por estas células durante as outras semanas. Durante as semanas de infecção verificou-se que a produção da IL-23 pelas células expostas aos antígenos fúngicos foi maior que quando estimuladas com os controles positivos, com exceção do EL na quarta e oitava semanas. As células não infectadas praticamente não produziram este mediador quando expostas a estes estímulos durante todas as semanas estudadas.

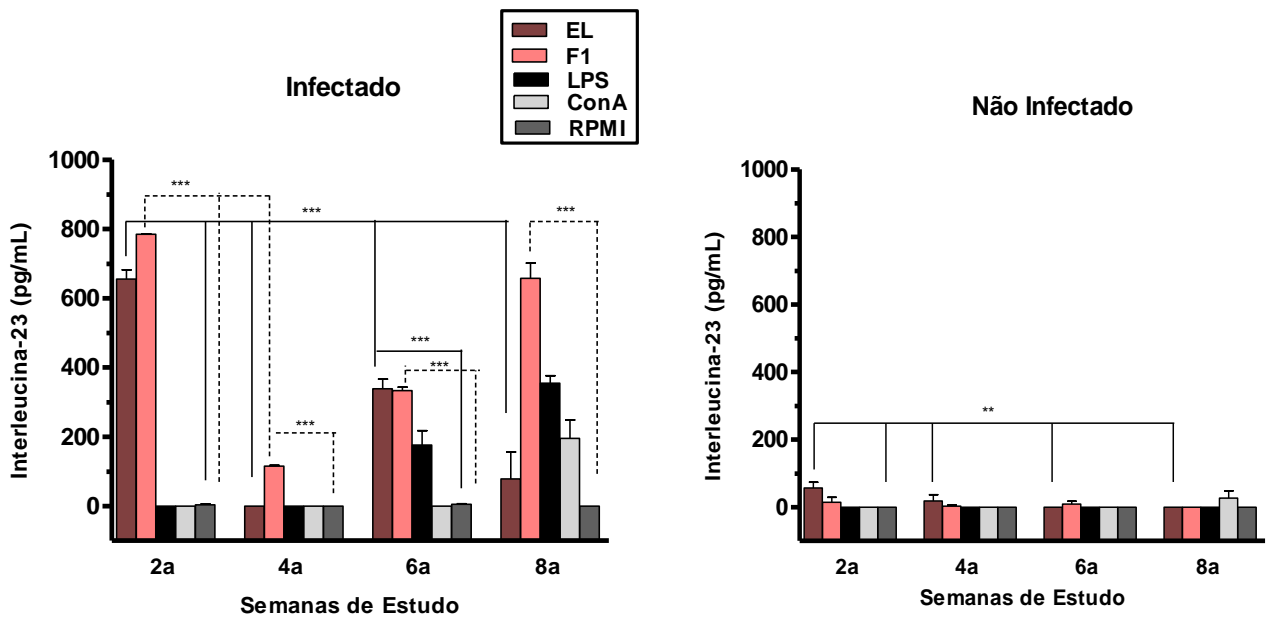


Figura 12 – Concentração de IL-23 liberada no sobrenadante da cocultura de células do exsudato peritoneal, após aderência, e esplenócitos totais de camundongos Balb/c infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii* durante oito semanas. As PECs, após aderência, e esplenócitos totais de camundongos infectados e não infectados foram cultivados em presença de EL, F1, LPS, Con-A ou somente em meio RPMI-C. As concentrações de IL-23 foram determinadas através de teste ELISA e calculadas utilizando uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas. Esses resultados apresentam valores de três experimentos independentes. Os resultados foram expressos em pg/mL como média \pm desvio padrão de cinco animais por semana de infecção (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5.10. Determinação da produção de TGF- β

A determinação da produção do TGF- β foi realizada no sobrenadante da cocultura de células do exsudato peritoneal, após aderência, e esplenócitos totais de camundongos Balb/c em diferentes períodos da infecção com o fungo *S. schenckii* e do grupo não infectado, em presença dos antígenos fúngicos, EL e F1, do LPS e Con-A como controles positivos ou somente meio RPMI-C como controle negativo. Os resultados obtidos foram calculados através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de TGF- β e estão representados como média \pm desvio padrão de cinco animais por grupo por semana estudada na Figura 13.

Entre os animais infectados observou-se elevada produção de TGF- β quando as células foram expostas aos antígenos fúngicos (EL e F1) durante toda a cinética, havendo diminuição na produção desta citocina na quarta semana frente a ambos os antígenos do fungo. As células dos animais infectados expostas ao EL produziram níveis mais elevados de TGF- β quando comparadas ao controle negativo durante as oito semanas ($p < 0,001$). Ainda assim, observou-se elevada concentração de TGF- β na segunda semana, com diminuição na quarta semana ($p < 0,001$ entre a quarta e as demais semanas) e aumento progressivo na sexta e oitava semanas.

A produção TGF- β , quando as células infectadas foram expostas aos antígenos do fungo, foi elevada na segunda semana, tendo baixos valores na quarta semana ($p < 0,001$ entre a quarta e demais semanas) e voltando a aumentar na sexta e oitava semanas. Estas mesmas células, quando expostas ao EL e à F1, apresentaram $p < 0,001$ em relação ao controle negativo na segunda, sexta e oitava semanas e $p < 0,01$ na quarta semana. O EL estimulou concentrações mais elevadas deste mediador que F1 em todas as semanas, mas sem diferenças significativas.

Em relação às células dos camundongos não infectados houve baixa produção de TGF- β em todas as semanas quando expostas aos antígenos fúngicos, com exceção da quarta semana quando houve produção tanto frente ao EL quanto ao F1, com $p < 0,001$ em relação ao controle negativo. A produção de TGF- β na quarta semana, frente ao EL, foi significativamente estatístico ($p < 0,01$) quando comparados com a sexta e oitava semanas; e frente ao F1, com maiores concentrações na quarta semana ($p < 0,05$ entre a segunda e quarta semana). As células dos animais infectados e não infectados apresentaram maior produção de TGF- β quando estimuladas com Con-A do que com LPS em todas as semanas, mas sem diferenças significativas.

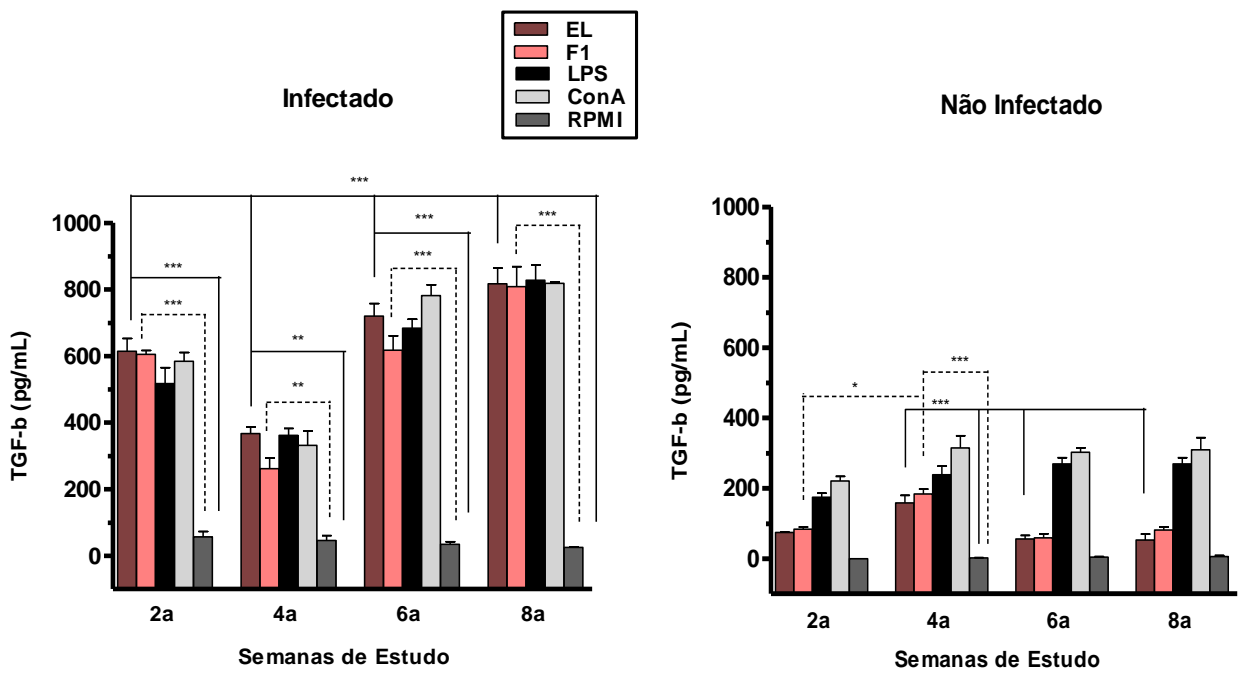


Figura 13 – Concentração de TGF-β liberado no sobrenadante da cocultura de células do exsudato peritoneal, após aderência, e esplenócitos totais de camundongos Balb/c infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii* durante oito semanas. As PECs, após aderência, e os esplenócitos totais de camundongos infectados e não infectados foram cultivados em presença de EL, F1, LPS, Con-A ou somente em meio RPMI-C. As concentrações de TGF-β foram determinadas através de teste ELISA e calculadas utilizando uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas. Esses resultados apresentam valores de três experimentos independentes. Os resultados foram expressos em pg/mL como média ± desvio padrão de cinco animais por semana de infecção (*p<0,05; p<0.01; ***p<0,001).

6. Discussão

A patogenicidade das infecções fúngicas aumentou significativamente nos últimos anos, provavelmente devido aos hábitos de trabalho e atividades recreacionais, tornando estes fatores foco de atenção das autoridades de saúde pública por causarem micoses endêmicas. Dessa maneira, o aumento das doenças fúngicas tem sido relacionado com as mudanças populacionais, como migração, turismo e crescimento da população, como também pela ampla utilização de terapias imunossupressoras (Sifuentes-Osornio *et al.*, 2012)

As infecções fúngicas disseminadas causadas por diferentes patógenos acometem, principalmente, indivíduos com alterações na imunidade. Nos últimos anos, tem havido um aumento na incidência dessas doenças devido à elevada contaminação de pacientes portadores de HIV com esses microrganismos (Galemberti *et al.*, 2012). Apesar de importantes achados clínicos, a compreensão atual de como o sistema imunológico reconhece e responde ao agente fúngico patogênico é muito restrita (Shaham e Levitz, 2005).

A esporotricose é a mais comum das micoses profundas sendo caracterizada pela evolução subaguda e crônica das lesões nodulares dos tecidos cutâneos ou subcutâneos, podendo evoluir para a forma sistêmica. É causada pela inoculação traumática do fungo *S.schenckii* através de ferimentos com material contaminado ou pela inalação de esporos via trato respiratório superior (Kauffman, 1999; La Hoz e Baddley, 2012). Por um longo período, a esporotricose teve baixa incidência no Brasil, no entanto estudos recentes demonstram que não só o número de casos relatados, mas também formas clínicas mais graves da doença estão aumentando (Madrid *et al.*, 2012).

Para tentar elucidar os efeitos da infecção causada por *S. schenckii* na resposta imunológica, nosso laboratório tem desenvolvido um modelo murino com a forma sistêmica da esporotricose. Deste modo, o presente estudo avaliou o desencadeamento da resposta imunológica analisando a liberação de mediadores imunológicos, como o óxido nítrico e a cascata de citocinas, além do envolvimento do inflamassoma por meio da determinação de caspase-1, protease diretamente relacionada com a ativação deste complexo protéico, em cultura de macrófagos peritoneais e linfócitos esplênicos obtidos de camundongos Balb/c, infectados ou não com este patógeno, frente a diferentes antígenos fúngicos ao longo de oito semanas.

O primeiro questionamento desta pesquisa foi avaliar a viabilidade das células do hospedeiro ao longo da infecção experimental. O teste de viabilidade celular foi

realizado na cultura de células obtidas do exsudato peritoneal, após aderência, e em esplenócitos totais a fim de 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. A Figura 2 mostra os resultados de viabilidade das células do exsudato peritoneal, após aderência, quando em contato com os diferentes antígenos do *S. schenckii* estudados. Nas células obtidas de animais não infectados tratadas com o EL e F1 a viabilidade foi mantida acima de 95%. Quando as PECs obtidas de camundongos infectados foram tratadas com os mesmos estímulos fúngicos, houve maior variação da viabilidade celular, de 65 a 100% frente ao EL e 95 a 100% frente ao F1, com menores viabilidades nas semanas iniciais da infecção. Os resultados apresentados demonstram que a infecção provoca uma pequena alteração na viabilidade das PECs obtidas da linhagem dos camundongos em estudo quando mantidas em cultura com os antígenos do fungo, porém esta citotoxicidade observada nas células de animais infectados não afeta os resultados dos testes propostos, já que o percentual de células viáveis está acima de 65% na concentração utilizada.

A Figura 3 mostra os resultados de viabilidade dos esplenócitos totais quando as células dos animais infectados e não infectados foram expostas aos antígenos fúngicos. Observou-se que a citotoxicidade variou entre 80 e 100%. Os resultados apresentados demonstram que a infecção e os antígenos do fungo reduziram a viabilidade dos esplenócitos totais dos camundongos em estudo, porém esta redução da viabilidade celular observada nas células de animais infectados e não infectados não afeta os resultados dos testes propostos, uma vez que a viabilidade das mesmas permaneceu superior a 80% frente a todos os estímulos durante as oito semanas de estudo. Portanto, os antígenos do *S. schenckii* utilizados durante todos os testes propostos demonstraram uma viabilidade satisfatória mediante cultivo de 24 horas em PECs e esplenócitos totais, indicando serem passíveis de uso na pesquisa nessa concentração testada proposta.

O reconhecimento da invasão fúngica pelo sistema imunológico ocorre, primeiramente, pelo sistema imune inato, uma resposta imunológica rápida que assegura a sobrevivência do hospedeiro após a infecção. A eliminação de microrganismos por macrófagos depende da fagocitose, da liberação de agentes tóxicos, como intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio, e da síntese de diversas citocinas (Carlos *et al.*, 1994; 2009). Os intermediários reativos do oxigênio (ROI) são representados pelo peróxido de hidrogênio que, além de mediadores microbicidas,

também podem promover danos ao tecido do hospedeiro, produzidos durante o “burst” oxidativo quando em altas concentrações (Ding *et al.*, 1988). Os intermediários reativos do nitrogênio (RNI), particularmente o óxido nítrico, molécula que desempenha importante papel na resposta inflamatória e imunológica, contribuem com a atividade citotóxica dos macrófagos em relação às bactérias, protozoários, fungos e vírus (Carlos *et al.*, 2003).

A resposta imunológica a diversas infecções fúngicas tem como fator determinante a participação do NO. Esta molécula está envolvida no controle de numerosas doenças infecciosas causadas por uma variedade de agentes patogênicos, incluindo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. Tuberculosis*), *Histoplasma capsulatum* (*H. capsulatum*), *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*), *Leishmania major* (*L. major*) e *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*). Por outro lado, o NO pode desempenhar um papel prejudicial ao hospedeiro exacerbando seu efeito citotóxico em infecções causadas por *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*), *S. schenckii*, *Candida albicans* (*C. albicans*) e *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) (Gonzalez *et al.*, 2011).

Nossos resultados quanto à produção de NO, demonstrados na Figura 4, mostraram elevada produção desta molécula durante as semanas de infecção estudadas. Quando as células dos animais infectados foram tratadas com o EL, houve maior produção de NO entre a quarta e sexta semanas. Quando estimuladas com F1 houve pequena produção de NO na segunda semana seguida de níveis elevados nas demais semanas, com pico de concentração na sexta semana. Por outro lado, os animais não infectados, quando expostos aos antígenos em estudo, apresentaram pequena liberação de NO durante todo o período estudado, todavia essas células são capazes de liberar esta molécula, como observado pela elevada produção de NO em resposta ao LPS, seu potente indutor.

Os resultados obtidos em relação à produção do NO coincidem com trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório. Carlos *et al.* (2003) encontraram maiores concentrações de NO nos animais infectados frente ao EL entre a quarta e sexta semanas de infecção em camundongos Swiss acometidos com infecção sistêmica provocada pelo fungo *S. schenckii*. Do mesmo modo, Maia *et al* (2006) demonstraram elevada produção de NO e iNOS entre a quarta e sétima semanas de infecção em camundongos Swiss frente ao exoantígeno do *S. schenckii*. Já estudos realizados por Sassá *et al* (2009) mostraram, em camundongos C3H/HePas infectados pelo fungo *S.*

schenckii, que a concentração de NO, frente ao EL deste patógeno, é maior entre a quarta e oitava semanas de infecção.

A elevada concentração de NO neste período da infecção, frente aos antígenos do fungo, pode estar relacionada com uma atividade imunossupressora, levando ao agravamento da doença e maior acometimento do hospedeiro, pois neste período também foram observados a multiplicação do fungo no baço e fígado desses animais (Carlos *et al.*, 1992; 1994; 1999). Portanto, apesar do NO ser importante na eliminação de fungos, a produção desta molécula durante a infecção contribuiu para um estado de imunodepressão observada no decorrer da infecção, podendo ser prejudicial, até mesmo letal ao hospedeiro. Assim, a elevada produção de NO está associada com a suscetibilidade do hospedeiro à infecção (Carlos *et al.*, 2003; Maia *et al.*, 2006).

Além das infecções por *S. schenckii*, o NO também está envolvido na indução da imunossupressão durante a infecção e na eliminação do *P. brasiliensis*. Gonzalez *et al.* (2000) mostraram que a produção de NO pelos macrófagos peritoneais induzida pelo IFN- γ é capaz de restringir o crescimento intracelular desse patógeno, indicando que este é um mecanismo efetor importante. Nascimento *et al.* (2002) mostraram, em culturas *in vitro*, que macrófagos de camundongos infectados com este fungo produziram altas concentrações de NO, sugerindo que esta molécula está associada com a suscetibilidade do hospedeiro a este microrganismo. Estudos realizados por Moreira *et al.* (2009) mostraram que a atividade fungicida *in vitro* contra o *P. brasiliensis* por macrófagos peritoneais murinos, pré-ativados com IFN- γ ou TNF- α , é elevada e está correlacionada com o aumento da produção de NO e do H₂O₂.

A resposta inata permite o reconhecimento de um amplo espectro de agentes patogênicos através dos PRRs, que reconhecem os PAMPs (Gil e Gozalbo, 2006). Os receptores NLRs, proteínas citosólicas, surgiram como uma importante família de defesa. Estes são expressos em macrófagos, células dendríticas e monócitos e desempenham um papel importante na imunidade microbiana, pois formam complexos multiproteicos denominados inflamassomas, que atuam na defesa do hospedeiro contra vários fungos (Chen e Pedra, 2010).

Além da proteína NLR, o inflamassoma é composto pela molécula adaptadora ASC (proteína associada a apoptose) e pela enzima caspase-1, atuando como importante regulador da inflamação e possui a função de agrupar e ativar a caspase-1, culminando com a maturação da pró-IL-1 β e pró-IL-18 em suas formas ativas, IL-1 β e IL-18 respectivamente. Estas citocinas, por sua vez, contribuem na defesa do hospedeiro

contra as infecções por aumentar as propriedades antimicrobianas dos fagócitos e iniciar as respostas imunes adaptativas Th1 e Th17 (Veerdonk *et al.*, 2011).

O envolvimento do inflamassoma na infecção fúngica frente ao *S. schenckii* foi verificado neste trabalho através da determinação de caspase-1 ativa por citometria de fluxo e está representado na Figura 5. Observou-se que nos animais infectados houve maior percentual de células com caspase-1 ativa do que nos animais normais. As células dos animais infectados, quando expostas aos antígenos do fungo, apresentaram maior percentual de caspase-1 ativa na segunda e oitava semanas, com menor porcentagem nas semanas intermediárias.

O inflamassoma tem desempenhado um importante papel na defesa antifúngica do hospedeiro. Hise *et al* (2009) mostraram a produção de IL-1 β em camundongos deficientes em ACS e NLRP3 e verificaram a importância do inflamassoma na defesa antifúngica *in vivo*, pois estes animais apresentaram menor sobrevivência com maior colonização na cavidade oral e nos rins após infecção com *C. albicans* do que os camundongos selvagens. Veerdonk *et al* (2011) demonstraram um papel essencial antifúngico dos componentes do inflamassoma, caspase-1 e ASC, na candidíase disseminada por meio da regulação das respostas Th1 e Th17, pois os camundongos com deficiência nestes componentes apresentaram essas respostas diminuídas, seguida por aumento da multiplicação fúngica e menor sobrevivência dos animais. Estas observações identificaram um papel crítico do inflamassoma no controle das respostas imunitárias e na defesa do hospedeiro durante infecção por *C. albicans*.

A presença de polimorfismos no gene que codifica o inflamassoma foi associada com a candidíase vulvovaginal recorrente, reforçando o papel do inflamassoma na homeostase da mucosa (Lev-Sagie *et al.*, 2009). Joly e Sutterwala (2010) mostraram que o receptor citosólico NLR é essencial na defesa do hospedeiro contra infecção por *C. albicans*, pois a infecção de macrófagos e células dendríticas por este patógeno resultou na ativação do inflamassoma, ativando a caspase-1 e o processamento e secreção de IL-1 β e IL-18. Portanto, o inflamassoma é de grande importância na compreensão da regulação imune que ocorre durante a relação hospedeiro-patógeno.

Sabe-se que as respostas imunológicas são controladas, em parte, por mediadores solúveis, como as citocinas. Estas proteínas reguladoras são liberadas pelas células do sistema fagocitário e resposta adaptativa sendo essenciais na comunicação intercelular em muitos processos fisiológicos e patofisiológicos. Além disso, modulam a

inflamação e a imunidade, tendo importante papel em inflamações agudas ou crônicas iniciadas por infecções ou traumas (Muller, 2002).

A indução da imunidade celular em doença micótica depende de uma sequência complexa com interação entre antígenos, macrófagos e linfócitos. Estudos com modelo animal tem sugerido que a ativação de macrófagos e células T são importantes na resistência à uma variedade de infecções fúngicas (Romani, 2011). Quando ativadas, populações específicas de células T e macrófagos interagem para dar proteção imunológica a infecções por *S. schenckii*, formando a base do entendimento para a resposta do hospedeiro a este agente infeccioso (Tachibana *et al*, 1999). Deste modo, avaliou-se a interação entre células do exsudato peritoneal, após aderência, e esplenócitos totais quando em cocultura com os antígenos do fungo *S. schenckii*, para determinar a produção de diversas citocinas.

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória liberada por muitos tipos de células com propriedades de ativar células T, monócitos e macrófagos, osteoclastos, fibroblastos, células musculares, endoteliais e epiteliais. Atua como importante mediador durante infecções e inflamação e tem papel protetor em vários modelos de infecções bacterianas, virais e fúngicas (Dinarello, 2002; 2005). Os resultados obtidos quanto à produção de IL-1 β , expostos na Figura 8, demonstram menor concentração desta citocina entre a quarta e sexta semanas de infecção, quando as células dos camundongos infectados foram estimuladas com EL e F1. Em trabalhos anteriores Carlos *et al.* (1992; 1994; 2009) já observaram essa menor produção de IL-1 β neste mesmo período em camundongos *Swiss*, juntamente com maior proliferação do fungo no baço dos animais infectados, mostrando que a ausência de IL-1 β pode estar relacionada com a depressão na resposta imune neste período.

A IL-18 tem sido considerada uma citocina envolvida em muitas infecções fúngicas e parasitárias (Kullberg *et al.*, 2003). Tem como principal função promover a produção de IFN- γ a partir de células T e NK, além de secretar outras citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , IL-8 e GM-CSF e, como consequência, aumentar a expansão, migração e ativação de neutrófilos durante a infecção. O papel protetor da IL-18 durante infecções está essencialmente relacionado com a sua capacidade de induzir IFN- γ , uma citocina que ativa a capacidade microbicida dos macrófagos através da indução da produção de óxido nítrico (Shaoo, 2011). Nossos resultados encontrados em relação à IL-18 (Figura 9) mostraram que as células dos animais infectados, quando expostas aos antígenos do fungo, apresentaram elevada produção de IL-18 na segunda

semana, com diminuição progressiva da concentração durante as outras semanas, com menor concentração na oitava semana.

Stuyt *et al* (2002, 2004) mostraram, em modelo animal, que a IL-18 protege o hospedeiro de infecções disseminadas por *C. albicans*, pois o tratamento profilático de camundongos infectados com IL-18 diminuiu a mortalidade e a quantidade de leveduras nos rins destes animais. Do mesmo modo, Netea *et al* (2003) investigaram se a IL-18 está envolvida na defesa do hospedeiro durante a candidíase disseminada e mostrou que camundongos knockout (KO) para IL-18 apresentaram aumento da mortalidade devido a infecção por *C. albicans*, acompanhada por uma diminuição na depuração das leveduras durante o curso da infecção. Além disso, a produção de IFN- γ , tal como um parâmetro da imunidade Th1 protetora, foi significativamente reduzida nestes animais. Em conclusão, a IL-18 é necessária para a defesa do hospedeiro contra infecções fúngicas e pode revelar-se como uma imunoterapia adjuvante nestas infecções.

Por outro lado, Panagio *et al* (2008) avaliaram a função da IL-18 por meio de um modelo de paracoccidiodomicose experimental e mostraram que camundongos IL-18 KO foram mais resistentes ao *P. brasiliensis* do que os animais selvagens (WT), pois a taxa de mortalidade e a colonização fúngica nos pulmões foram mais elevadas nesses últimos animais, demonstrando que a IL-18 tem um papel crítico na protecção de camundongos Balb/c nessa micose.

Embora a IL-1 β e a IL-18 estejam relacionadas diretamente com a resposta imune inata, efeitos importantes da IL-1 β e da IL-18 dependentes de caspase-1 tem sido exercidos sobre o início da resposta adaptativa Th1 e Th17. A produção da IL-18 é importante para induzir e otimizar uma resposta Th1, que é caracterizada pela produção de IFN- γ , que desempenha importante papel nas infecções fúngicas (Gozalbo e Gil, 2009). Já IL-1 β estimula a diferenciação das células Th17 e juntamente com a IL-23 amplifica a resposta das mesmas (Sutton *et al.*, 2009). A relação dependente entre a caspase-1 ativa e as respostas Th1 e Th17, durante a infecções fúngicas proporcionam uma nova visão sobre os mecanismos de defesa do hospedeiro contra fungos envolvendo o inflamassoma, sendo fundamental para a protecção do hospedeiro. Dessa maneira, ressalta a importância deste complexo protéico na regulação do desenvolvimento protetor de mediadores pró-inflamatórios e da resposta T *helper* durante a infecção indicando que o inflamassoma é uma conexão crítica entre as respostas inata e adaptativa durante a fase subaguda da candidíase disseminada (Veerdonk *et al.*, 2011).

Nossos resultados são condizentes com os dados da literatura, pois quando ocorre diminuição da quantidade de caspase-1 ativa, há também diminuição da produção da IL-1 β e IL-18, com exceção da produção de IL-18 na oitava semana. Estas menores produções ocorrem entre a 4^a e 6^a semanas de infecção com o fungo *S. schenckii*, mostrando que o envolvimento do inflamassoma está diminuído no período de maior agravamento da doença e maior acometimento do hospedeiro, com maior multiplicação fúngica nos baços dos animais infectados.

O desenvolvimento dos diferentes subtipos de células T CD4 *naive* depende da apresentação de antígenos pelas APCs, do envolvimento de moléculas co-estimulatórias e de citocinas específicas. As células Th1 são caracterizadas pela produção de IFN- γ , que é essencial para defesa contra patógenos intracelulares, enquanto as Th2 são caracterizadas pela produção de IL-4 que são importantes em doenças alérgicas e de na defesa contra infecções parasitárias. Recentemente, um novo subconjunto de células T helper foi descrito, as Th17, que produzem uma série de citocinas como IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22. Outro subtipo, não menos importante, são as T regulatórias que tem importante função na resposta do hospedeiro ao controlar a interação patógeno e as respostas imunológicas sendo responsáveis por suprimir a atividade dos macrófagos pela produção do TGF- β , uma citocina imunossupressora e imunoreguladora (Veerdonk e Netea, 2010).

O IFN- γ é uma citocina produzido pelas células Th1 que desempenha importante papel na diferenciação da célula T regulatórias, enquanto suprime a diferenciação das células Th2 e Th17. A ausência de IFN- γ leva a diferenciação limitada de Th1 e reforçada a de Th17. Assim, o IFN- γ é essencial para a promoção de células T CD4+ específicas para infecções fúngicas, enquanto inibe as células Th17 (Espinosa e Rivera, 2012). A produção de IFN- γ , demonstrada na Figura 10, pelas células dos animais infectados expostas ao EL e ao F1 apresentou elevadas concentrações em todas as semanas de infecção. Quando expostas ao EL verificou-se pico de produção de IFN- γ na sexta semana, já em resposta ao F1 às células dos camundongos infectados produziram pico desta citocina na oitava semana.

Tradicionalmente, a produção de IFN- γ pelas células Th1 confere imunidade protetora contra os fungos (Romani, 2011). A liberação deste mediador permaneceu aumentada praticamente durante todas as semanas de infecção quando as células foram estimuladas com EL ou F1. Deste modo, é possível que esta liberação de IFN- γ esteja sustentando a liberação aumentada de NO em resposta aos antígenos do fungo neste

mesmo período. Vale ressaltar que o pico de multiplicação fúngica no baço e fígado dos animais infectados ocorre no período entre a 4^a e 6^a semanas (Carlos *et al.*, 1999; Maia *et al.*, 2006) que representa um período de maior suscetibilidade do hospedeiro caracterizado por um padrão de depressão da resposta imunológica.

Em particular, o IFN- γ é tem um papel crítico na ativação de macrófagos através da indução de NO, um mediador que participa da atividade citotóxica de macrófagos em diversos modelos murinos, pois macrófagos peritoneais ativados, *in vitro*, com IFN- γ ou LPS foram capazes de produzir altos níveis de NO frente a infecção com *S. schenckii* (Maia *et al.*, 2006). O IFN- γ exerce efeito protetor na paracoccidiodomicose e parece ser o principal mediador da resistência contra a infecção fúngica em modelo murino promovendo ação antifúngica dos macrófagos através da produção de NO (Moreira *et al.*, 2010). Gonzalez *et al* (2000) observaram que a produção de NO pelos macrófagos peritoneais induzida pelo IFN- γ foi capaz de restringir o crescimento intracelular do *P. brasiliensis*, indicando um mecanismo efetor importante.

As células produtoras de IL-17 compreendem um subconjunto de células T recentemente reconhecido com papel emergente na imunidade adaptativa a uma variedade de fungos (Romani, 2011). A IL-17 é uma citocina importante para o recrutamento de neutrófilos e para a manutenção das respostas destes leucócitos no local da infecção (Chung *et al.*, 2009; Korn *et al.*, 2009). Esse dado é confirmado, uma vez que camundongos deficientes em IL-17 são altamente suscetíveis à candidíase disseminada (Huang *et al.*, 2004). Nossos resultados mostram que a produção de IL-17 (Figura 11) pelas células infectadas quando estimuladas com os antígenos do *S. schenckii* foi mais pronunciada frente a F1, com menor produção desta citocina entre a 4^a e 6^a semanas. Já com o EL houve níveis menores na produção desta citocina nas semanas iniciais, com pequeno aumento nas semanas finais.

A IL-23 é uma citocina heterodimérica que desempenha importante papel na produção da IL-17 e de proteção nas infecções fúngicas. Como a IL-23 está relacionada com a expansão e manutenção de células Th17 (Van de Veerdonk *et al.*, 2009), nesse estudo também foi determinada sua concentração. A produção da IL-23, demonstrada na Figura 12, foi semelhante à produção da IL-17 quando as células infectadas foram expostas ao F1, com elevadas concentrações na segunda e oitava semanas e concentrações menores no período entre a quarta e sexta semanas. Já quando expostas ao EL, a produção desta citocina não seguiu o perfil da produção de IL-17, com elevada concentração na segunda e quarta semanas.

A IL-23 e a IL-17 atuam na proteção do hospedeiro contra fungos e outros patógenos pela indução de uma resposta inflamatória (Romagnani *et al.*, 2009). Em nosso laboratório, Verdán *et al.* (2012), porém utilizando outro modelo murino, verificaram elevada produção de IL-17 frente a leveduras e ao exoantígeno de *S. schenckii*. Kagami *et al.* (2010) avaliaram as contribuições destas citocinas na defesa do hospedeiro contra *C. albicans* e mostraram que camundongos deficientes em IL-23 ou IL-17 apresentaram atraso na cicatrização de feridas e que os animais deficientes em IL-23 apresentaram elevada carga fúngica e não foram capazes de expressar IL-17, mas quando tratados com IL-17A recombinante verificou-se rápida cura da candidíase. Deepe e Gibbons (2009) exploraram a influência destas mesmas interleucinas na imunidade de camundongos infectados com *H. Capsulatum* e verificaram que a produção de IL-23 foi maior nos pulmões dos animais infectados e que esta produção se manifestou de forma IL-17 dependente. No geral, estes resultados demonstram que a IL-23 e IL-17 são necessárias para a defesa do hospedeiro, estabelecendo a existência de um eixo IL-17/IL-23 que regula infecções fúngicas.

Estudos demonstraram que camundongos deficientes em IL-23 exibiram maior carga fúngica após infecção com *H. capsulatum*, *C. neoformans* e *C. albicans* (Kagami *et al.*, 2010). No entanto, estudos de infecção pulmonar e gástrico com *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans* encontraram um papel prejudicial para o eixo IL-23/IL-17 promovendo inflamação excessiva de neutrófilos e destruição dos tecidos (Zelante *et al.*, 2007). Assim, IL-23 pode mediar a proteção contra a infecção por fungos, mas pode também ser prejudicial para promover a inflamação excessiva semelhante para o seu papel em doenças auto-imunes (Espinosa e Rivera, 2012).

Embora a inflamação seja um componente essencial na resposta protetora do hospedeiro contra os fungos, a sua desregulação pode piorar significativamente as doenças fúngicas. Assim, surgem as células T reguladoras que são responsáveis pela produção de elevados níveis de TGF- β , uma citocina imunossupressora que atua sobre células apresentadoras de antígenos e outras células T (Roncarolo e Levings, 2000). O TGF- β é uma citocina multifuncional e está relacionada com processos de regulação celular e forte efeito supressor sobre os macrófagos, inibindo a expressão de óxido nítrico e de IFN- γ , regula as respostas imunes contra vários patógenos, como vírus, bactérias, leveduras e protozoários (Blobe *et al.*, 2000).

Nossos resultados em relação à produção de TGF- β (Figura 13) verificaram que as células dos animais infectados, quando estimuladas com os antígenos do patógeno,

produziram maiores quantidades desta citocina nas segunda e oitava semanas, com menor produção nas semanas intermediárias. Os resultados encontrados estão de acordo com Sassá *et al* (2012) onde o EL estimulou menores concentrações de TGF- β no período entre a quarta e sexta semanas em camundongos com deficiência no receptor TLR4. Figueiredo *et al.* (2004) demonstraram que o TGF- β juntamente com IL-1 β auxilia na aderência das células leveduriformes do *S. schenckii* às células endoteliais, coincidindo com a presença de uma depressão na liberação desta citocina pró-inflamatória entre a quarta e sexta semanas de infecção acompanhada com o aumento do número de fungos no fígado e baço de camundongos infectados (Carlos *et al.*, 2003).

O TGF- β participa na desativação dos macrófagos, principalmente atuando sobre os mecanismos oxidativos, facilitando, assim, a sobrevivência do patógeno e promovendo uma infecção persistente (Tsunawaki *et al.*, 1988; Ding *et al.*, 1990). Figueiredo *et al.* (2007) sugeriram que o TGF- β atua auxiliando a disseminação do patógeno, por facilitar a interação do *S. schenckii* com a matriz subendotelial, permitindo que as células leveduriformes interajam com as células do hospedeiro.

Ferreira *et al* (2010) investigaram o envolvimento das Treg na imunossupressão provocada pelo *P. brasiliensis* no hospedeiro e verificaram que o aumento do número dessas células é compatível com uma forte atividade supressora, caracterizando o potencial imunossupressor da paracoccidiodomicose. Calich *et al* (1998) estudaram os diferentes fenômenos imunorreguladores associados à resistência e à suscetibilidade de camundongos à paracoccidiodomicose, e mostrou que os animais resistentes liberaram pequenas quantidades de TGF- β , enquanto os suscetíveis liberaram elevadas concentrações deste mediador, caracterizando a progressão da doença nestes animais sensíveis.

Este estudo é o primeiro a relacionar o envolvimento do inflamassoma com o *S. schenckii* e seus antígenos. Os resultados obtidos demonstram um período de imunossupressão e conseqüente progressão da doença, bem como a importância do inflamassoma na proteção do hospedeiro. Assim, os dados sugerem que as terapias emergentes para esta doença poderia ser alcançado através dos esforços de uma resposta imunológica controlada, que contribui para a eliminação de fungos sem maiores conseqüências para o hospedeiro.

7. Conclusões

- ✓ O modelo experimental de esporotricose em camundongos Balb/c é semelhante ao modelo encontrado em camundongos Swiss, apresentando depressão da resposta imunológica no período compreendido entre a quarta e sexta semanas de infecção;
- ✓ As células dos animais infectados estão mais suscetíveis às condições de cultura que as células dos animais não infectados. O EL e a F1 provocaram diminuição na viabilidade das PECs e dos esplenócitos totais dos animais infectados, com reduções mais pronunciadas na viabilidade destas células frente ao EL, sendo este mais citotóxico para estas células entre os antígenos fúngicos;
- ✓ Durante a 4ª e 6ª semanas de infecção observou-se elevada produção de NO e IFN- γ quando as células dos animais infectados foram desafiadas com os antígenos fúngicos. Esses resultados indicam uma atividade imunossupressora neste período levando ao agravamento da doença e maior acometimento do hospedeiro;
- ✓ Na 4ª e 6ª semanas de estudos ocorre uma diminuição da quantidade de caspase-1 ativa, importantes no processamento e secreção de IL-1 β e IL-18, além da ativação do inflamassoma. Isso demonstra que o inflamassoma está com sua ativação inibida neste período e que é um componente importante da resposta imunológica na defesa contra o *Sporothrix schenckii*;
- ✓ Nas semanas intermediárias quando ocorre a diminuição no percentual de células com a caspase-1 ativa, também menor liberação das citocinas IL-1 β e IL-18. Esses resultados sugerem que o perfil apresentado por essas citocinas estejam colaborando para uma maior disseminação do patógeno já que estão diretamente relacionadas com a resposta inata e com a otimização de uma resposta adaptativa;
- ✓ A produção de IL-17, citocina relacionada com a inflamação, mostrou-se reduzida no período crítico de acometimento da doença fúngica e a IL-23, responsável pela manutenção e expansão das células Th17, seguiu o mesmo perfil de produção. Esses resultados sugerem a existência de um eixo IL-17/IL-23 necessário para otimizar a resposta do hospedeiro em relação a infecção fúngica.
- ✓ Nas semanas intermediárias, em que o TGF- β está menos elevado, há maior produção de NO e IFN- γ , permitindo que diferentes subtipos de células T e fagócitos combatam o agente invasor;

8. Referências Bibliográficas

ALMEIDA-PAES, R.; PIMENTAM, A.; PIZZINI, C. V.; MONTEIRO, P. C. F.; PERALTA, J. M.; NOSANCHUK, J. D.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Use of Mycelial-Phase *Sporothrix schenckii* Exoantigens in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Sporotrichosis by Antibody Detection. *Clinical and Vaccine Immunology*, v.14, n.3, p.244-249, 2007.

ALMEIDA-PAES, R.; FRASES, S.; MONTEIRO, P. C. F.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; NOSANCHUK, J. D. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. *Microbes Infect.* v.5, p.554-562, 2009.

ARMSTRONG-JAMES, D.; TEO, I. A.; SHRIVASTAVA, S.; PETROU, M. A, TAUBE, D.; DORLING, A, et al. Exogenous interferon-gamma immunotherapy for invasive fungal infections in kidney transplant patients. *Am J Transplant*, v.10, p.1796–1803, 2010.

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

BARBEIRO, D. F. *Participação da célula B-1 na resposta inflamatória ao lipossacáride*. Tese de doutorado - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo. 75 f. 2009.

BARROS, M. B. L.; ALMEIDA-PAES, R.; SCHUBACH, O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clin. Microbiol. Rev.* v.24, n.4, p.633-654, 2011.

BERGSBAKEN, T.; FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol*, v.7, p.99-109, 2009.

BECKER, H. M. G.; GUIMARÃES, R. E. S.; NASCIMENTO, E.; BECKER, C. G.; GONÇALVES, D. U.; CROSARA, P. F. T. B. Cytokines profile and HLA typing in tolerant and non-tolerant patients to aspirin with nasossinus polyposis. *Rev. Bras. Otorrinolaringol*, v.69, n.3, 2003.

BLOBE, G. C.; SCHIEMANN, W. P.; LODISH, H. F. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med*, v.342, p.1350–1358, 2000.

BONIFAZ, A.; VÁSQUEZ-GONZÁLEZ, D.; PERUSQUIA-ORTIZ, A. M. Subcutaneous mycoses: chromoblastomycosis, sporotrichosis and mycetoma. *J Dtsch Dermatol.*, v. 48, p.619-627, 2010.

BOYDEN, E. D.; DIETRICH, W. F. Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet.*, v.38, p.240-244, 2006.

BURNS, M. J.; KAPADIA, N. N.; SILMAN, E. F. Sporotrichosis. *WestJEM*. v.X, n.3, p. 204-210, 2010.

CALISH, V. L.; KASHINO, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz J Med Biol Res.* v.31, n.5, p.615-623, 1998.

CARLOS, I. Z.; SGARBI, D. B.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C. S.; SILVA, C. L. Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the systemic form of the disease. *Mycopathologia*, v.117, n.3, p.139-144, 1992.

CARLOS, I. Z.; ZINI, M. M.; SGARBI, D. B.; 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, n.3, p.189-94, 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, p.9-14, 1999.

CARLOS, I. Z., SGARBI, D. B.; SANTOS, G. C.; PLACERES, M. C. *Sporothrix schenckii* lipid inhibits macrophage phagocytosis: involvement of nitric oxide and tumour necrosis factor-alpha. *Scand. J. Immunol.* v.57, p.214-220, 2003.

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

CARRIER, Y.; YUAN, J.; KUCHROO, V. K.; WEINER, H. L. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF- β T cell-transgenic mice. *Journal of Immunology*, v.178, p.179-185, 2007.

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

CHEN, G.; PEDRA, J. H. The inflammasome in host defense. *Sensors (Basel)*. v.10, n.1, p.97-111, 2010.

CHUNG, Y.; CHANG, S. H.; MARTINEZ, G. J.; YANG, X. O.; NURIEVA, R.; KANG, H. S.; MA, L. et al., Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity*, v.30, p.576-587, 2009.

DAI, X.; SAYAMA, K.; TOHYAMA, M.; SHIRAKATA, Y.; HANAKAWA, Y.; TOKUMARU, S.; YANG, L.; HIRAKAWA, S.; H\SHIMOTO, K. Mite allergen is a danger signal for the skin via activation of inflammasome in keratinocytes. *J Allergy Clin Immunol.* v.127, n.3, p.806-814, 2011.

DAVIS, B. K.; WEN, H.; TING, J. P. The Inflammasome NLRs in Immunity, Inflammation, and Associated Diseases. *An. rev. immunol.*, v.29, n.1, p.707-735, 2011.

DEEPE Jr, G. S.; GIBBONS, R. S. Interleukins 17 and 23 Influence the Host Response to *Histoplasma capsulatum*. *J Infect Dis.*, v.200, n.1, p.142-151, 2009.

- DELVES, P. J.; ROITT, I. M. The Immune System. Second of two parts. *N. Engl J Med*, v.343, n.2, p.17-108, 2000.
- DINARELLO, C. A. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol*. v.20, p.1-13, 2002
- DINARELLO, C. A. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med*. v.201, n.9, p.1355-1359, 2005.
- DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.*, v.141, p.2407-2412, 1988.
- DING, A.; NATHAN, C. F.; GRAYCAR, J.; DERYNCK, R.; STUEHR, D. J.; SRIMAL, S. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors 1, 2 and 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN-g. *J. Immunol.*, v.145, p.940-944, 1990.
- DUPLESSIS, C. A.; TILLEY, D.; BAVARO, M.; HALE, B.; HOLLAND, S. M. Two cases illustrating successful adjunctive interferon-gamma immunotherapy in refractory disseminated coccidioidomycosis. *J Infect*, 2011.
- ESPINOSA, V.; RIVERA, A. Cytokines and the regulation of fungus-specific CD4 T cell differentiation. *Cytokine*, v.58, p.100-106, 2012.
- FAUSTIN, B.; LARTIGUE, L.; BRUEY, J. M.; LUCIANO, F.; SERGIENKO, E. BAILLY-MAITRE, B. Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol. Cell.*, v.25, p.713-724, 2007.
- FERNANDES, K. S.; COELHO, A. L.; LOPES-BEZERRA, L. M.; BARJA-FIDALGO, C. Virulence of *Sporothrix schenckii* conidia and yeast cells, and their susceptibility to nitric oxide. *Immunology*, v.101, p.563-569, 2000.
- FERNANDES, K. S.; NETO, E. H.; BRITO, M. M.; SILVA, J. S.; CUNHA, F. Q.; BARJA-FIDALGO, C. Detrimental role of endogenous nitric oxide in host defence against *Sporothrix schenckii*. *Immunology*, v.123, p.469-479, 2008.
- FIGUEIREDO, C.; LIMA, O. C.; CARVALHO, L.; LOPES-BEZERRA, L. M.; MORANDI, V. The in vitro interaction of *Sporothrix schenckii* with human endothelial cells is modulated by cytokines and involves endothelial surface molecules. *Microb Pathog.*, v.36, p.177-188, 2004.
- FIGUEIREDO, C. C.; DECCACHE, P. M.; LOPES-BEZERRA, L. M.; MORANDI, V. TGF-beta 1 induces transendothelial migration of the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii* by a paracellular route involving extracellular matrix proteins. *Microbiol.*, v.153, n.Pt 9, p.2910-2921, 2007.
- FERREIRA, M. C.; OLIVEIRA, R. T.; SILVA, R. M.; BLOTTA, M. H.; MAMONI, R. L. Involvement of regulatory T cells in the immunosuppression characteristic of patients with paracoccidioidomycosis. *Infect Immun*. v.78, n.10, p.4392-4401, 2010.

- FONTES, P. C.; KITAKAWA, D.; CARVALHO, Y. R.; BRANDÃO, A. A.; CABRAL, L. A.; ALMEIDA, J. D. Sporotrichosis in an HIV-positive man with oral lesions: a case report. *Acta Cytol.*, v.51, n.4, p.648-650, 2007.
- 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.
- GALIMBERTI, R.; TORRE, A. C.; BAZTÁN, M. C.; RODRIGUEZ-CHIAPPETTA, F. Emerging systemic fungal infections. *Clinics in Dermatology*, v.30, p.633–650, 2012.
- GALLUZZI, L.; KROEMER, G. Shigella Targets the Mitochondrial Checkpoint of Programmed Necrosis. *Cell host microbe.*, v.5, n.2, p.107-109, 2009.
- GIL, M. L.; GOZALBO, D. TLR2, but not TLR4, triggers cytokine production by murine cells in response to *Candida albicans* yeasts and hyphae. *Microbes Infect*, v. 8, p. 2299–2304, 2006.
- GONZALEZ, A.; DE GREGORI, W.; VELEZ, D.; RESTREPO, A.; CANO, L. E. Nitric Oxide Participation in the Fungicidal Mechanism of Gamma Interferon-Activated Murine Macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* Conidia. *Infection Immun.*, v.68, n.5, p.2546–2552, 2000.
- GONZALES, A.; HUNG, C.; COLE, G. T. Nitric oxide synthase activity has limited influence on the control of *Coccidioides* infection in mice. *Microbial Pathogenesis*, v.51, p.161-168, 2011.
- GOZALBO, D.; GIL, M. L. IFN-gamma in *Candida albicans* infections. *Front. Biosci.*, v.14, p.1970–1978, 2009.
- GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, v.126, p.131-138, 1982.
- GREEN, J.T.; RICHARDSON, C.; MARSHALL, R.W.; RHODES, J.; McKIRDY, H.C.; THOMAS, G.A.; WILLIAMS, G. T. Nitric oxide mediates a therapeutic effect of nicotine in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.*, v.14, p.1429-1434, 2000.
- GROSS, O.; POECK, H.; BSCHIEDER, M.; DOSTERT, C.; HANNESSCHLAGER, N.; ENDRES, S.; HARTMANN, G.; TARDIVEL, A.; SCHWEIGHOFFER, E.; TYBULEWICZ, V.; MOCSAI, A.; TSCHOPP, J.; RULAND, J. Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature*, v.459, p.433–436, 2009.
- GUARRO, J.; GENE, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.* v.12, p,454–500, 1999.
- GUERMONPREZ, P.; VALLADEAU, J.; ZITVOGEL, L.; THERY, C.; AMIGORENA, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* v.20, p.621-667, 2002.

GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; DO VALLE, A. C.; FRAGA, B. L.; SCHUBACH, A. O.; HOAGLAND, B. R.; MONTEIRA, P. C.; BARROS, M. B. Disseminated sporotrichosis as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome. *Mycoses*, v.53, p.78–80, 2010

HALLE, A.; HORNING, V.; PETZOLD, G. C.; STEWART, C. R.; MONKS, B. G.; REINHECKEL, T. The Nalp3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol*, v.9, p.857-865, 2008.

HE, X.; MEKASHA, S.; MAVROGIORGOS, N.; FITZGERALD, K. A.; LIEN, E.; INGALLS, R. R. Inflammation and fibrosis during Chlamydia pneumoniae infection is regulated by IL-1 and the NLRP3/ASC inflammasome. *J Immunol*. v.184, n.10, p.5743-5754, 2010.

HEKTOEN, L.; PERKINS, C. F. Refractory Subcutaneous Abscesses caused by Sporothrix Schenkii, a new Pathogenic Fungus. *J Exp Med.*, v.5: p.77-89, 1900.

HISE, A. G.; TOMALKA, J.; GANESAN, S.; PATEL, K.; HALL, B. A.; BROWN, G. D.; FITZGERALD, K. A. An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen Candida albicans. *Cell Host Microbe*, v.5, p.487-497, 2009.

HUANG, W.; NA, L.; FIDEL, P. L.; SCHWARZENBERGER, P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice. *J. Infect. Dis.*, v.190, p.624–631, 2004.

ITO, M.; YANAGI, Y.; ICHINOHE, T. Encephalomyocarditis virus viroporin 2B activates NLRP3 inflammasome. *PLoS Pathog*, v.8, n.8, 2012.

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

JOLY, S.; SUTTERWALA, F. S. Fungal pathogen recognition by the NLRP3 inflammasome. *Virulence*, v.1, n.4, p.276-280; 2010.

KAGAMI, S.; RIZZO, H. L.; KURTZ, S. E.; MILLER, L. S.; BLAUVELT, A. IL-23 and IL-17A, but not IL-12 and IL-22, are required for optimal skin host defense against Candida albicans. *J Immunol*, v.185, p.5453–5462, 2010.

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

KAYAGAKI, N.; WARMING, S.; LAMKANFI, M.; VANDE WALLE, L.; LOUIE, S.; DONG, J.; NEWTON, K.; QU, Y.; LIU, J.; HELDENS, S.; ZHANG, J.; LEE, W. P.; ROOSE-GIRMA, M.; DIXIT, V. M. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature*, v.16, n.7371, p.117-121, 2011.

- KANNEGANTI, T. D.; OZOREN, N.; BODY-MALAPEL, M.; AMER, A.; PARK, J. H.; FRANCHI, L. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature*, v.440, p.223-236, 2006.
- KANNEGANTI, T. D.; LAMKANFI, M.; NÚÑEZ, G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity*. v.27, n.4, p.549-559, 2007.
- KANETSUNA, F.; CARBONELL, L. M.; MORENO, R. E.; RODRIGUES, J. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Bacteriol.*, v.97, p.1036-1041, 1969.
- KAUFFMAN, C. A. Sporotrichosis. *Clin Infect Dis*, v.29, p.231-236; 1999.
- KAWAKAMI, K. Interleukin-18 and host defense against infectious pathogens. *J Immunother*. v.1, p.9-12, 2002.
- KWON-CHUNG, K. J.; BENNET, J. E. Medical mycology. Lea & Febiger, Philadelphia, PA. 1992.
- KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M. IL-17 and Th17 cells. *Annu. Rev. Immunol.* v.27, p.485–517, 2009.
- KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol.*, v.30, n.1, p.16–34, 2011.
- LA HOZ, R. M.; BADDLEY, J. W. Subcutaneous Fungal Infections. *Curr Infect Dis Rep*, v.14, p.530–539, 2012.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. Guia para Identificação: fungos, actinomicetos, algas de interesse médico. São Paulo: *Sarvier*, p.344-353, 1998.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; DE MELO, N. T. Esporotricose e outras Micoses Gomadas. *Tratato de Micologia. São Paulo: Sarvier*. cap.20, p.479-497, 2002.
- LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. *Immunol Rev*, v.227, p.95-105, 2009.
- LARONE, D. H. Medically important fungi: a guide to identification, 4th ed. ASM Press, Washington, DC. 2002.
- LEE, W. W.; KANG, S. W.; CHOI, J., LEE, S. H.; SHAH, K.; EYNON, E. E.; FLAVELL, R. A.; KANG, I. Regulating human Th17 cells via differential expression of IL-1 receptor. *Blood*, v.115, p.530–540, 2010.
- LEV-SAGIE, A.; PRUS, D.; LINHARES, I. M.; LAVY, Y.; LEDGER, W. J.; WITKIN, S. S. Polymorphism in a gene coding for the inflammasome component NALP3 and recurrent vulvovaginal candidiasis in women with vulvar vestibulitis syndrome. *Am J Obstet Gynecol*, v.200, p.303-305, 2009.

- LEVITZ, S. M. Innate recognition of fungal cell walls. *PLoS Pathog.* v.6:e1000758. 2010.
- LLOYD, K. O.; BITOON, M. A. Isolation and purification of a peptido-rhamnomannan from the yeast form of *Sporothrix schenckii*. Structural and immunochemical studies. *J Immunol*, v.107, p.663– 671, 1971.
- LOPES-BEZERRA, L. M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R. O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Ann. Brazil. Acad. Sciences*, v. 78, p. 293-308, 2006.
- LÓPEZ-ROMERO, E.; REYES-MONTES, R.; PÉREZ-TORRES, A.; RUIZ-BACA, E.; VILLAGÓMEZ-CASTRO, J. C.; MORA-MONTES, H. M.; FLORES-CARREÓN, A.; TORIELLO, C. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. *Future Microbiol.* v.6, n.1, p.85-102, 2011.
- LUTZ, A.; SPLENDORE, A. Sobre uma mycose observada em homens e ratos. *Rev Med São Paulo*, v.21, p.433-450, 1997.
- MADRID, I. M.; MATTEI, A. S.; FERNANDES, C. G.; NOBRE, O.; MEIRELES, M. C. Epidemiological findings and laboratory evaluation of sporotrichosis: a description of 103 cases in cats and dogs in southern Brazil. *Mycopathologia*, v.173, n.4, p.265-273, 2012.
- MAIA, D. C., SASSA, M. F.; PLACERES, M. C.; 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.
- MARTINON, F.; PETRILLI, V.; MAYOR, A.; TARDIVEL, A.; TSCHOPP, J. Gout-associated uric acid crystals activate the Nalp3 inflammasome. *Nature*, v.440, p.237-241, 2006.
- MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. *An. rev. immunol.*, v.27, p.229-265, 2009.
- MAUERMANN, M. L.; KLEIN, C. J.; ORENSTEIN, R.; DYCK, P. J. Disseminated sporotrichosis presenting with granulomatous inflammatory multiple mononeuropathies. *Muscle Nerve*, v.36, p.866-72, 2007.
- McGEACHY, M.J; CUA, D.J. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity*, v.28, p.445-453, 2008.
- McGEACHY, M. J.; CHEN, Y.; TATO, C. M.; LAURENCE, A.; JOYCE-SHAIKH, B.; BLUMENSCHNIG, W. M.; McCLANAHAN, T. K.; O'SHEA, J. J.; CUA, D. J. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol*, v.10, p.314–24, 2010.
- MEYER, E. M.; de BEER, Z. W.; SUMMERBELL, R. C.; MOHARRAM, A. M.; de HOOG, G. S.; VISMER, H. F.; WINGFIELD, M. J. Taxonomy and phylogeny of new wood- and soil-inhabiting *Sporothrix* species in the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. *Mycologia*, v.100, p.647–661, 2008.

MLAMBO, G.; SIGOLA, L. B. Rifampicin and dexamethasone have similar effects on macrophage phagocytosis of zymosan, but differ in their effects on nitrite and TNF- α production. *Int Immunopharmacol*, v.3, p.513–522, 2003.

MOREIRA, A. P.; DIAS-MELICIO, L. A.; SOARES, A. M. V. C. Interleukin-10 but not Transforming Growth Factor beta inhibits murine activated macrophages *Paracoccidioides brasiliensis* killing: Effect on H₂O₂ and NO production. *Cellular Immunology*, v.263, p.196–203, 2010.

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

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

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, v.65, p.55, 1983.

MÜLLER, B. Cytokine imbalance in non-immunological chronic disease. *Cytokine*, v.18, n.6, p.334-339, 2002.

MURUVE, D. A.; PETRILLI, V.; ZAISS, A. K.; WHITE, L. R.; CLARK, S. A.; ROSS, P. J. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature*, v.452, p.103-107, 2008.

NASCIMENTO, F. R. F.; CALICH, V. L. G.; RODRÍGUEZ, D.; RUSSO, M. Dual Role for Nitric Oxide in *Paracoccidioidomycosis*: Essential for Resistance, but Overproduction Associated with Susceptibility. *J Immunol*, v.168, p.4593-4600, 2002.

NASCIMENTO, R. C.; ESPÍNDOLA, N. M.; CASTRO, R. A.; TEIXEIRA, P. A.; LOUREIRO y PENHA, C. V.; LOPES-BEZERRA, L. M.; ALMEIDA, S. R. Passive immunization with monoclonal antibody against a 70-kDa putative adhesin of *Sporothrix schenckii* induces protection in murine sporotrichosis. *Eur J Immunol*, v.38, n.11, p.3080-3089, 2008.

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

NETEA, M. G.; VONK, A. G.; van den HOVEN, M.; VERSCHUEREN, I.; JOOSTEN, L. A.; van KRIEKEN, J. H.; van den BERG, W. B.; van der MEER, J. W.; KULLBERG, B. J. Differential role of IL-18 and IL-12 in the host defense against disseminated *Candida albicans* infection. *Eur J Immunol.* v.33, n.12, p.3409-3417, 2003.

ODA, L. M.; KUBELKA, C. F.; ALVIANO, C. S.; TRAVASSOS, L. R. Ingestion of yeast form of *Sporothrix schenckii* by mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun*, v.39, p.407-504, 1983.

OLIVEIRA, M. M.; ALMEIDA-PAES, R.; MUNIZ, M. M.; GUTIERREZ GALHARDO, M. C., ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. *Mycopathologia*. v.172, n.4, p.257-267, 2011.

OROFINO-COSTA, R.; BÓIA, M. N.; MGALHAES, G. A.; DAMASCO, P. S.; BERNARDES-ENGEMANN, A. R.; BENVENUTO, F.; SILVA, I. C.; LOPES-BEZERRA, L. M. Arthritis as a hypersensitivity reaction in a case of sporotrichosis transmitted by a sick cat: clinical and serological follow up of 13 months. *Mycoses*, v.53, p.81-83, 2010.

PAIVA-OLIVEIRA, E. L.; SILVA, A. C.; SILVA, R. M.; SEVENINI, L. A.; MELO, H. A. LAGROTA-CANDIDO, J.; QUIRICO-SANTOS, T. Inflamassoma e sua repercussão clínica: revisão da literatura. *R. Ci. med. biol.*, v.11, n.1, p.96-102, 2012

PANAGIO, L. A.; TRISTAO, F. S. MOREIRA, A. P.; PEREIRA, A. P.; CAVASSANI, K. A.; MILANEZI, C. M.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. Role of interleukin (IL)-18 in experimental paracoccidiodomycosis. *Med Mycol*, v.46, n.5, p.435-442, 2008.

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.

RAJAN, J. V.; RODRIQUEZ, D.; MIAO, E. A.; ADEREM, A. The NLRP3 inflammasome detects encephalomyocarditis virus and vesicular stomatitis virus infection. *J Virol*, v.85, n.9, p.4167-4172, 2011.

REIS, R. S.; ALMEIDA-PAES, R.; MUNIZ, M. M.; TAVARES, P. M.; MONTEIRO, P. C.; SCHUBACH, T. M.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Molecular characterization of *Sporothrix schenckii* isolates from humans and cats involved in the sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, v.104, p.769-774, 2009.

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

RITTER, M.; GROSS, O.; KAYS, S.; RULAND, J.; NIMMERJAHN, F.; SAIJO, S.; TSCHOPP, J.; LAYLAND, L. E.; PRAZERES da COSTA, C. *Schistosoma mansoni* triggers Dectin-2, which activates the Nlrp3 inflammasome and alters adaptive immune responses. *Proc Natl Acad Sci*, v.23, n.47, p.20459-20464, 2010.

ROLDÁN-MARÍN, R.; CONTRERAS-RUIZ, J.; ARENAS, R.; VAZQUEZ-del-MERCADO, E.; TOUSSAINT-CAIRE, S.; VEGA-MEMIJE, M. E. Fixed sporotrichosis as a cause of a chronic ulcer on the knee. *Int Wound J*, v.6, p.63-66, 2009.

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

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

- ROMANI, L. Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* v.11, p.275– 288, 2011.
- ROMERO-MARTINEZ, R.; WHEELER, M.; GUERRERO-PLATA, A.; RICO, G.; TORRES-GUERRERO, H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect. Immun.* v.68, p.3696–3703, 2000
- RONCAROLO, M.G.; LEVINGS, M. K. The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. *Curr Opin Immunol*, v.12, n.6, p.676-683, 2000.
- RUIZ-BACA, E.; TORIELLO, C.; PEREZ-TORRES, A.; SABANERO-LOPEZ, M.; VILLAGOMEZ-CASTRO, J. C.; LOPEZ-ROMERO, E. Isolation and some properties of a glycoprotein of 70 kDa (Gp70) from the cell wall of *Sporothrix schenckii* involved in fungal adherence to dermal extracellular matrix. *Med.Mycol.* v.47, p.185–196, 2009.
- SAHOO, M.; CEBALLOS-OLVERA, I.; BARRIO, L.; RE, F. Role of the Inflammasome, IL-1 β , and IL-18 in Bacterial Infections. *TheScientificWorldJOURNAL*, v.11, p. 2037–2050, 2011.
- SAID-SADIER, N.; PADILLA, E.; LANGSLEY, G.; OJCIUS, D. M. *Aspergillus fumigatus* stimulates the NLRP3 inflammasome through a pathway requiring ROS production and the Syk tyrosine kinase. *PLoS One*, v.5, n.4, 2010.
- SASSÁ, M. F.; SATURI, A. E. T.; SOUZA, F. S.; RIBEIRO, L. C. A.; SGARBI, D. B. G.; CARLOS, I. Z. Response of macrophage Toll-like receptor 4 to a *Sporothrix schenckii* lipid extract during experimental sporotrichosis. *Immunology*, v.128, p.301-309, 2009.
- SASSÁ, M. F.; FERREIRA, L. S.; RIBEIRO, L. C. A.; CARLOS, I. Z. Immune response against *Sporothrix schenckii* in TLR-4-Deficient mice. *Mycopathologia*. v.174, p.21-30, 2012.
- SCHENK, B. On Refractory Subcutaneous Abscesses caused by a Fungus, possibly related to Sporotrichia. *Bull Johns Hosp.*, v.9. p.286-290, 1898.
- SCHUBACH, A.; BARROS, M. B.; WANKE, B. Epidemic sporotrichosis. *Curr.Opin.Infect.Di*, v.21, p.129–133, 2008.
- SGARBI, D. B., da SILVA, A. J.; CARLOS, I. Z.; SILVA, C. L.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C. S. Isolation of ergosterol peroxide and its reversion to ergosterol in the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*, v.139, p.9–14, 1997.
- SHAO, C.; QU, J.; HE, L.; ZHANG, Y.; WANG, J.; WANG, Y.; ZHOU, H.; LIU, X. Transient overexpression of gamma interferon promotes *Aspergillus* clearance in invasive pulmonary aspergillosis. *Clin Exp Immunol*, v.142, p.233–241, 2005.
- SHIMADA, K.; CROTHER, T. R.; KARLIN, J.; CHEN, S.; CHIBA, N.; RAMANUJAN, V. K.; VERGNES, L.; OJCIUS, D. M.; ARDITI, M. Caspase-1 dependent IL-1 β secretion is critical for host defense in a mouse model of *Chlamydia pneumoniae* lung infection. *PLoS One*, v.6, n.6, 2011.

SHOHAM, S.; LEVITZ, S. M. The immune response to fungal infections. *Br J Haematol*, v.129, p.569–582, 2012.

SIFUENTES-OSORNIO, J.; CORZO-LEÓN, D. E.; PONCE-de-LEÓN, L. A. Epidemiology of Invasive Fungal Infections in Latin America. *Curr Fungal Infect Rep*, v.6, p.23–34, 2012.

STROWIG, T.; HENAO-MEJIA, J.; ELINAV, E.; FLAVELL, R. Inflammasomes in health and disease. *Nature*, v.481, n.7381, p.278-286, 2012.

SUTTON, C. E.; LALOR, S. J.; SWEENEY, C. M.; BRERETON, C. F.; LAVELLE, E. C.; MILLS, K. H. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity*, v.31, p.331–341, 2009.

STUYT, R. J.; NETEA, M. G.; van KRIEKEN, J. H.; van der MEER, J. W.; KULLBERG, B. J. Recombinant interleukin-18 protects against disseminated *Candida albicans* infection in mice. *J Infect Dis*. v.189, n.8, p.1524-1527, 2004.

TACHIBANA, T., MaATSUYAMA, T.; MITSUYAMA, M. Involvement of CD4+ T cells and macrophages in acquired protection against infection with *Sporothrix schenckii* in mice. *Med Myc.*, v.37, n.6, p.397-404, 1999.

TEIXEIRA, P. A.; CASTRO, R. A.; NASCIMENTO, R. C.; TRONCHIN, G.; PEREZ-TORRES, A.; LAZÉRA, M.; ALMEIDA, S. R.; BOUCHARA, J. P.; LOUREIRO-PENHA, C. V.; LOPES-BEZERRA, L. M. Cell surface expression of adhesins for fibronectin correlates with virulence in *porothrix schenckii*. *Microbiolog*, v.155, p.3730–3738, 2009.

TEIXEIRA, P. A.; De CASTRO, R. A.; FERREIRA, F. R.; CUNHA, M. M.; TORRES, A. P.; PENHA, C. V.; ROZENTAL, S.; LOPES-BEZERRA, L. M. L-DOPA accessibility in culture medium increases melanin expression and virulence of *Sporothrix schenckii* yeast cells. *Med Mycol*, v.48, n.5, p. 687-95, 2010.

TOMA, C.; HIGA, N.; KOIZUMI, Y.; NAKASONE, N.; OGURA, Y.; McCOY, A. J.; FRANCHI, L.; UEMATSU, S.; SAGARA, J.; TANIGUCHI, S.; TSUTSUI, H.; AKIRA, S.; TSCHOPP, J.; NUNEZ, G.; SUZUKI, T. Pathogenic *Vibrio* activate NLRP3 inflammasome via cytotoxins and TLR/nucleotide-binding oligomerization domain-mediated NF-kappa B signaling. *J Immunol*. v.184, n.9, P.5287-5297, 2010.

TSUNAWAKI, S.; SPORN, M.; DING, A.; NATHAN, C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor- β . *Nature*, v.334, p.260–262, 1988.

VALENTIN-BERRIOS, S.; GONZALEZ-VELAZQUEZ, W.; PEREZ-SANCHES, L.; GONZALES-MENDEZ, R.; RODRIGUEZ-DEL VALLE, N. Cytosolic phospholipase A2: a member of the signalling pathway of a new G protein alpha subunit in *Sporothrix schenckii*. *BMC Microbiol*. v.9, p.100, 2009

VAN DE VEERDONK, F.L.; GRESNIGT, M.S.; KULLBERG, B.J.; VAN DER MEER, J.W.M.; JOOSTEN, L.A.B.; NETEA, M.G. Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. *BMB Reports*. v.42, n.12, p.776-787, 2009.

VÁSQUEZ-del-MERCADO, E.; ARENAS, R.; PADILLA-DESGARENES, C. Sporotrichosis. *Clinics in Dermatology*. v.30, p. 443-447, 2012.

VEERDONK, F. L.; NETEA, M. G. T-cell Subsets and Antifungal Host Defenses. *Curr Fungal Infect Rep*, v.4, p.238–243, 2010.

VEERDONK, F. L.; NETEA, M. G.; DINARELLO, C. A.; JOONSTEN, L. A. Inflamassome activation and IL-1b and IL-18 processing during infection. *Trends in Immunology*, v.32. p.110-116, 2011.

VERDAN, F. F.; FALEIROS, J. C.; FERREIRA, L. S.; MONNAZI, L. G. S.; MAIA, D. C. G.; TANSINE, A.; PLACERES, M. C. P.; CARLOS, I. Z.; SANTOS-JUNIOR, R. R. Dendritic cell are able to differentially recognize *Sporothrix schenckii* antigens and promote Th1/Th17 response in vitro. *Immunobiology*, v.217, p.788-794, 2012.

VILELA, R., SOUZA, G. F.; FERNANDES-COTA, G.; MENDOZA, L. Cutaneous and meningeal sporotrichosis in a HIV patient. *Rev Iberoam Micol.*, v.24, n.2, p.161–163, 2007.

ZELANTE, T.; De LUCA, A., BONIFAZI, P.; MONTAGNOLI, C.; BOZZA, S.; MORETTI, S.; BELLADONNA, M. L.; VACCA, C.; CONTE, C.; MOSCI, P.; BISTONI, F.; PUCCEII, P.; KASTELEIN, R. A.; KOPF, M.; ROMANI, L. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur. J. Immunol*, v.37, p.2695–2706, 2007.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. E. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol*, v.28, p.445–89, 2010.

Anexo I

Tabela 1 – Viabilidade das PECs dos animais infectados

Animais Infectados				
Semanas	EL	F1	LPS	RPMI
2a	68,08 ± 0,8063	97,60 ± 3,119	100,0 ± 0,0000	100,0 ± 0,0000
4a	92,81 ± 6,740	94,15 ± 6,797	100,0 ± 0,0000	100,0 ± 0,0000
6a	100,0 ± 0,0000	100,0 ± 0,0000	100,0 ± 0,0000	100,0 ± 0,0000
8a	96,67 ± 0,8911	99,23 ± 1,543	100,0 ± 0,0000	100,0 ± 0,0000

Tabela 2 – Viabilidade das PECs dos animais normais

Animais Normais				
Semanas	EL	F1	LPS	RPMI
2a	97,73 ± 3,089	100,0 ± 0,0000	100,0 ± 0,0000	100,0 ± 0,0000
4a	99,36 ± 1,102	100,0 ± 0,0000	100,0 ± 0,0000	100,0 ± 0,0000
6a	100,0 ± 0,0000	100,0 ± 0,0000	100,0 ± 0,0000	100,0 ± 0,0000
8a	100,0 ± 0,0000	100,0 ± 0,0000	100,0 ± 0,0000	100,0 ± 0,0000

Tabela 3 – Viabilidade dos esplenócitos totais dos animais infectados

Animais Infectdos				
Semanas	EL	F1	ConA	RPMI
2a	88,20 ± 9,624	92,61 ± 8,561	90,45 ± 11,17	100,0 ± 0,0000
4a	86,99 ± 16,29	90,63 ± 11,39	96,68 ± 3,013	100,0 ± 0,0000
6a	96,50 ± 7,003	97,59 ± 2,041	96,06 ± 4,577	100,0 ± 0,0000
8a	88,08 ± 13,69	90,15 ± 11,85	95,03 ± 8,949	100,0 ± 0,0000

Tabela 4 – Viabilidade dos esplenócitos totais dos animais normais

Animais Normais				
Semanas	EL	F1	ConA	RPMI
2a	100,0 ± 0,0000	100,0 ± 0,0000	100,0 ± 0,0000	100,0 ± 0,0000
4a	97,56 ± 4,227	87,23 ± 4,976	98,67 ± 2,309	100,0 ± 0,0000
6a	96,76 ± 5,604	100,0 ± 0,0000	99,11 ± 1,541	100,0 ± 0,0000
8a	86,38 ± 3,411	86,98 ± 6,895	86,82 ± 4,119	100,0 ± 0,0000

Tabela 5 – Produção de NO pelas PECs dos animais infectados

Animais Infectados				
Semanas	EL	F1	LPS	RPMI
2a	0,0000 ± 0,0000	0,7652 ± 0,8262	76,25 ± 4,073	1,220 ± 2,439
4a	13,85 ± 6,726	8,616 ± 6,457	46,39 ± 4,622	1,069 ± 1,513
6a	17,53 ± 3,570	24,35 ± 0,4267	33,03 ± 2,244	0,2783 ± 0,5567
8a	7,905 ± 1,868	20,75 ± 2,506	67,84 ± 7,148	0,2050 ± 0,4099

Tabela 6 – Produção de NO pelas PECs dos animais normais

Animais Normais				
Semanas	EL	F1	LPS	RPMI
2a	0,0000 ± 0,0000	0,8232 ± 1,426	74,11 ± 0,7895	0,2058 ± 0,3305
4a	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000	48,77 ± 6,592	0,0000 ± 0,0000
6a	0,0000 ± 0,0000	4,560 ± 0,5921	32,90 ± 0,9919	0,0000 ± 0,0000
8a	0,2584 ± 0,4476	1,370 ± 2,373	30,54 ± 5,562	0,2773 ± 0,4803

Tabela 7 – Percentual de capase-1 ativa nos animais infectados

Animais Infectados				
Semanas	EL	F1	LPS	RPMI
2a	18,65 ± 0,4655	18,55 ± 0,7326	13,85 ± 1,480	12,22 ± 1,016
4a	13,15 ± 0,9883	15,33 ± 0,4349	11,10 ± 0,7746	10,98 ± 0,4508
6a	13,75 ± 0,5568	13,22 ± 1,196	11,45 ± 0,4509	11,18 ± 0,8808
8a	21,55 ± 0,5686	22,43 ± 0,9878	21,22 ± 0,3515	20,83 ± 0,6850

Tabela 8 – Percentual de caspase-1 ativa nos animais normais

Animais Normais				
Semanas	EL	F1	LPS	RPMI
2a	3,050 ± 0,3500	4,800 ± 0,3000	3,033 ± 0,4163	2,867 ± 0,2309
4a	6,067 ± 0,5774	7,333 ± 0,3512	6,500 ± 0,3000	4,400 ± 0,1000
6a	5,300 ± 0,5000	5,900 ± 0,2000	4,217 ± 0,5346	4,000 ± 0,2000
8a	6,333 ± 0,3512	7,517 ± 0,6292	5,800 ± 0,6000	5,800 ± 0,6000

Tabela 9 – Liberação de IL-1 β pelos animais infectados

Animais Infectados					
Semanas	EL	F1	LPS	ConA	RPMI
2a	185,8 ± 76,97	250,4 ± 98,10	273,6 ± 71,44	4,508 ± 4,756	0,000 ± 0,000
4a	127,3 ± 52,18	16,02 ± 32,03	36,82 ± 6,003	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
6a	0,000 ± 0,000	102,3 ± 28,13	281,3 ± 56,09	191,4 ± 14,61	12,39 ± 14,61
8a	143,4 ± 42,28	582,1 ± 85,70	559,8 ± 92,92	148,6 ± 38,93	47,82 ± 1,142

Tabela 10 – Liberação de IL-1 β pelos animais normais

Animais Infectados					
Semanas	EL	F1	LPS	ConA	RPMI
2a	79,67 ± 26,75	0,000 ± 0,000	82,04 ± 13,54	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
4a	15,09 ± 26,13	0,0000 ± 0,000	80,04 ± 13,54	0,000 ± 0,000	0,7288 ± 1,262
6a	2,446 ± 4,237	5,146 ± 2,427	86,04 ± 13,54	22,74 ± 3,093	0,000 ± 0,000
8a	5,361 ± 3,555	4,232 ± 0,7023	83,04 ± 13,54	64,86 ± 26,55	2,791 ± 3,946

Tabela 11 – Liberação de IL-18 pelos animais infectados

Animais Infectados					
Semanas	EL	F1	LPS	ConA	RPMI
2a	1112 ± 98,06	1065 ± 65,89	860,2 ± 64,15	0,000 ± 0,000	26,01 ± 30,04
4a	492,3 ± 22,95	472,7 ± 61,53	253,2 ± 74,61	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
6a	423,1 ± 30,05	345,2 ± 65,43	267,1 ± 48,91	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
8a	121,4 ± 28,54	109,1 ± 28,45	115,7 ± 24,16	0,000 ± 0,000	1,698 ± 1,526

Tabela 12 – Liberação de IL-18 pelos animais normais

Animais Normais					
Semanas	EL	F1	LPS	ConA	RPMI
2a	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
4a	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
6a	57,58 ± 7,501	74,67 ± 9,866	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
8a	56,41 ± 6,143	46,82 ± 10,13	28,30 ± 2,064	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000

Tabela 13 – Liberação de IFN- γ pelos animais infectados

Animais Infectados					
Semanas	EL	F1	LPS	ConA	RPMI
2a	766,7 ± 116,2	1238 ± 302,3	1851 ± 64,26	504,8 ± 41,95	0,000 ± 0,000
4a	1024 ± 78,48	1602 ± 210,1	1510 ± 115,5	715,1 ± 280,3	21,10 ± 4,659
6a	1392 ± 93,84	1010 ± 50,34	1564 ± 97,33	361,5 ± 64,65	9,628 ± 6,888
8a	815,6 ± 149,6	1692 ± 110,6	1723 ± 74,83	433,6 ± 151,9	1,186 ± 1,392

Tabela 14 – Liberação de IFN- γ pelos animais normais

Animais Normais					
Semanas	EL	F1	LPS	ConA	RPMI
2a	167,7 ± 25,76	336,6 ± 123,5	1650 ± 120,4	352,1 ± 137,7	6,175 ± 3,418
4a	400,4 ± 10,26	660,2 ± 21,04	1084 ± 42,15	407,8 ± 170,1	49,49 ± 5,183
6a	364,1 ± 32,76	821,3 ± 10,49	1533 ± 33,66	769,5 ± 33,28	164,0 ± 51,12
8a	143,2 ± 40,51	444,3 ± 9,491	1524 ± 252,8	219,2 ± 14,00	0,000 ± 0,000

Tabela 15 – Liberação de IL-17 pelos animais infectados

Animais Infectados					
Semanas	EL	F1	LPS	ConA	RPMI
2a	5,937 ± 1,425	168,5 ± 5,123	82,59 ± 10,73	0,000 ± 0,000	0,707 ± 0,8858
4a	1,107 ± 2,215	10,66 ± 1,794	22,26 ± 5,316	8,800 ± 12,19	1,046 ± 2,092
6a	5,609 ± 3,593	37,75 ± 4,244	26,99 ± 4,038	0,337 ± 0,6758	0,000 ± 0,000
8a	17,98 ± 16,25	96,47 ± 2,938	32,82 ± 18,92	6,502 ± 6,520	0,3857 ± 0,771

Tabela 16 – Liberação de IL-17 pelos animais normais

Animais Normais					
Semanas	EL	F1	LPS	ConA	RPMI
2a	0,0000 ± 0,0000	15,81 ± 6,958	45,70 ± 17,01	0,000 ± 0,000	4,033 ± 2,001
4a	0,0000 ± 0,0000	3,659 ± 6,338	45,80 ± 13,82	1,006 ± 1,743	1,074 ± 0,9395
6a	0,0000 ± 0,0000	24,26 ± 3,548	62,51 ± 3,914	0,000 ± 0,000	0,037 ± 0,065
8a	0,000 ± 0,000	8,061 ± 13,96	14,41 ± 4,041	2,109 ± 2,912	1,532 ± 1,350

Tabela 17 – Liberação de IL-23 pelos animais infectados

Animais Infectados					
Semanas	EL	F1	LPS	ConA	RPMI
2a	655,2 ± 47,49	785,1 ± 0,4741	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	3,397 ± 4,514
4a	0,000 ± 0,000	115,3 ± 4,483	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
6a	338,4 ± 48,94	333,6 ± 17,52	176,3 ± 71,47	0,000 ± 0,000	4,947 ± 3,412
8a	78,05 ± 156,1	657,7 ± 76,52	354,7 ± 38,21	195,6 ± 92,25	0,000 ± 0,000

Tabela 18 – Liberação de IL-23 pelos animais normais

Animais Normais					
Semanas	EL	F1	LPS	ConA	RPMI
2a	56,88 ± 29,48	14,45 ± 25,02	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
4a	18,53 ± 32,09	2,948 ± 5,107	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
6a	0,000 ± 0,000	8,673 ± 15,02	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
8a	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	26,66 ± 37,40	0,000 ± 0,000

Tabela 19 – Liberação de TGF-β pelos animais infectados

Animais Infectados					
Semanas	EL	F1	LPS	ConA	RPMI
2a	614,2 ± 76,84	605,1 ± 24,06	517,2 ± 82,88	584,2 ± 52,27	57,13 ± 32,06
4a	367,4 ± 39,88	261,7 ± 65,27	361,6 ± 42,07	332,0 ± 86,35	45,97 ± 28,61
6a	720,3 ± 74,74	617,8 ± 86,34	683,8 ± 54,36	781,5 ± 64,39	34,63 ± 15,30
8a	817,4 ± 93,85	808,5 ± 119,8	827,6 ± 90,81	818,6 ± 6,471	25,33 ± 2,242

Tabela 20 – Liberação de TGF-β pelos animais normais

Animais Normais					
Semanas	EL	F1	LPS	ConA	RPMI
2a	74,43 ± 1,466	83,67 ± 10,74	174,3 ± 20,71	221,2 ± 21,70	0,000 ± 0,000
4a	158,2 ± 38,30	183,7 ± 24,65	238,8 ± 42,38	314,6 ± 60,03	1,773 ± 1,822
6a	55,93 ± 18,05	59,05 ± 20,09	269,2 ± 30,67	302,8 ± 20,07	4,657 ± 1,664
8a	52,62 ± 30,17	81,52 ± 14,19	269,2 ± 30,67	309,5 ± 59,65	6,225 ± 5,415

Capítulo II

Artigo Científico

Mensagem original

De: Immunobiology <esubmissionsupport@elsevier.com>

Para: maiadcg@uol.com.br

Assunto: A manuscript number has been assigned: IMBIO-D-13-00018

Enviada: 25/01/2013 10:02

Ms. Ref. No.: IMBIO-D-13-00018

Title: Involvement of the inflammasome and cytokines in the immunological response to fungal infections by *Sporothrix schenckii*

Immunobiology

Dear Danielle,

Your submission entitled "Involvement of the inflammasome and cytokines in the immunological response to fungal infections by *Sporothrix schenckii*" has been assigned the following manuscript number: IMBIO-D-13-00018.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/imbio/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Wilhelm J. Schwaeble, PhD, DSc

Editor-in-Chief

Immunobiology

1 Title: Involvement of the inflammasome and cytokines in the immunological response
2 to fungal infections by *Sporothrix schenckii*

3 Short title/running head: The inflammasome and cytokines in sporotrichosis

4 Authors: Amanda Costa Gonçalves¹, Danielle Cardoso Geraldo Maia¹, Lucas Souza
5 Ferreira¹, Luis Gustavo Silva Monnazzi¹, Pâmela Alegranci¹, Marisa Campos Polesi
6 Placeres¹, Iracilda Zeppone Carlos¹.

7 Address: ¹Department of Clinical Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, São
8 Paulo State University, Araraquara, São Paulo 14801-902, Brazil.

9 Correspondence information: Department of Clinical Analyses, Faculty of
10 Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University, Araraquara, São Paulo 14801-
11 902, Brazil. Rua Expedicionários do Brasil, 1621, Universidade Estadual Paulista-
12 UNESP, Júlio Mesquita Filho, Araraquara, SP, Brazil. Phone: +55 16 33015713; Fax:
13 +55 16 3332-0880; e-mail: carlosiz@fctfar.unesp.br

14 Abstract

15 Sporotrichosis is a disease that is caused by the thermo-dimorphic fungus *Sporothrix*
16 *schenckii*. The inflammasome is an important regulator of inflammation that is
17 comprised of the NLR receptor, ASC and caspase-1 and is responsible for the
18 maturation of IL-1 β and IL-18. The induction of cellular immunity depends on the
19 interactions between antigens, macrophages and lymphocytes because when activated,
20 these cell populations release immune mediators to establish a link between the innate
21 and adaptive immune responses. The high production of NO and reduced secretion of
22 the proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-17 in the 4th and 6th weeks of infection

23 result in host immunosuppression and increased disease severity. The percentage of
24 activated caspase-1 is decreased during this time period and is accompanied by
25 decreases in IL-1 β and IL-18 during the period of higher susceptibility to this infection.
26 IFN- γ levels were elevated during the entire time course of infection. Overall, the
27 results emphasize the importance of inflammasomes in the host defense against *S.*
28 *schenckii* fungal infections.

29 1. Introduction

30 Sporotrichosis is caused by the thermo-dimorphic fungus *Sporothrix schenckii* (*S.*
31 *schenckii*), which affects both the cutaneous and subcutaneous tissues and subsequently
32 affects the lymphatic vessels, lymph nodes and visceral organs. Infection usually occurs
33 through post-traumatic inoculations of the fungus, which is present in soils, plants and
34 contaminated organic materials (1). Plant growers, farmers, miners and fishermen were
35 shown previously to be affected, and increasingly, veterinarians, animal caretakers, cat
36 owners and laboratory handlers of *S. schenckii* are considered to be at risk for the
37 development of such infections (2).

38 The anti-fungal immune response uses several mechanisms to prevent infections (3). In
39 the innate response, one mechanism involves the presence of pattern recognition
40 receptors (PRRs) that detect and respond to the presence of pathogen-associated
41 molecular patterns (PAMPs) (4). The NOD-like receptors (NLRs) are PRRs that are
42 located within the cytoplasm and are mainly expressed in macrophages, which
43 recognize highly conserved products and pathogens. The NLRs are present in
44 multiprotein complexes that are called inflammasomes (5).

45 The inflammasome is an important regulator of inflammation through the activation of
46 caspase-1, which culminates in the maturation of pro-IL-1 β and pro-IL-18 to the active
47 forms. These interleukins contribute to the host defense against infections by enhancing
48 the antimicrobial properties of phagocytes and contributing to the Th1 and Th17
49 adaptive immune responses (6). Several studies of *Candida albicans* infection models
50 have shown that the inflammasome is important to host antifungal defenses (7);
51 however, no information is available with regards to the involvement of the
52 inflammasome in *S. schenckii* infections.

53 Macrophages are cells of the innate immune response and are responsible for
54 phagocytosis, antigen presentation, and the production of cytokines and anti-microbial
55 agents, such as reactive nitrogen intermediates (8). Nitric oxide (NO), a reactive
56 nitrogen intermediate, is highly cytotoxic against *S. schenckii* and acts as a potent
57 mediator of the immune and inflammatory responses, which lead to the destruction of
58 the microorganism by pro-inflammatory cytokines (9).

59 In addition to their roles in the innate responses, antigen-presenting cells primarily
60 capture and present immunogenic pathogen fragments to T cells (10). The Th1/Th2
61 paradigm has proven essential to an understanding of the adaptive host immune
62 response. Studies that have examined the importance of regulatory T cells in fungal
63 infections, as well as the recent discovery of Th17 cells, have provided crucial
64 information to an understanding of the complementary roles that are played by T helper
65 lymphocytes in host defenses against various fungal infections (11).

66 The interactions between the innate and adaptive responses enable effective host
67 responses against a variety of infections and pathogenic agents. Therefore, the aim of
68 this study was to analyze host immune responses in a systemic sporotrichosis infection
69 model. These responses were measured by the production of NO and the involvement of
70 the inflammasome in activated macrophages, as well as the interactions *in vitro* between
71 peritoneal macrophages and splenic lymphocytes in an eight-week coculture infection
72 model with different antigenic preparations of *S. schenckii*.

73 2. Materials and methods

74 2.1. Animals

75 Male 4–6-week-old BALB/c mice were purchased from the Multidisciplinary Center for
76 Biological Research (CEMIB), University of Campinas (UNICAMP), São Paulo,
77 Brazil. The mice were housed in specific pathogen-free (SPF) conditions in our animal
78 facility. All procedures were approved by the Institutional Ethics Committee (Protocol
79 CEP/FCF/CAR no. 06/2012).

80 2.2. *Sporothrix schenckii* culture

81 *Sporothrix schenckii*, strain 1099-18, was kindly provided by Dr. Celuta Sales Alviano
82 at the Institute of Microbiology, Federal University of Rio de Janeiro (Brazil). This
83 strain was isolated from a human case of sporotrichosis at the Mycology Section of the
84 Department of Dermatology, Columbia University (New York, NY, USA). The fungus
85 was cultured at 37°C for 8 days in brain heart infusion (BHI) broth (DIFCO) with
86 constant rotatory shaking at 150cycles/min, which maintained a suspension of yeast
87 cells.

88 2.3. Infection method

89 For *S. schenckii* infections, a yeast suspension of 10^8 cells/ml was prepared in
90 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). Each animal in the experimental group was
91 inoculated intraperitoneally with 0.10 ml of this suspension, while animals in the
92 control group were injected with 0.10 ml of PBS alone. Mice were sacrificed at different
93 time points after infection (2nd, 4th, 6th, and 8th weeks), and the peritoneal and spleen
94 cells of the infected and control animals were collected and stimulated *in vitro* with a
95 lipid extract of *S. schenckii* (12).

96 2.4. Lipid extraction

97 Freeze-dried yeast cells were disrupted by six cycles of ultrasonic vibration at 200W for
98 3min each. A high degree of disruption was observed consistently by phase-contrast
99 microscopy. The cell walls were washed with distilled water and collected by
100 centrifugation at 5000xg for 5min. The washes were continued until phase-contrast
101 microscopy indicated that the suspension was free of undisrupted cells and cytoplasmic
102 components. The freeze-dried cell wall samples were subjected to lipid extraction by
103 soaking in a chloroform/methanol solution (2:1, v/v) with stirring for 2h at room
104 temperature. The extract was separated by centrifugation at 5000 x g for 5min, and the
105 insoluble residue was re-extracted three more times as described. The component was
106 called the lipid extract (EL).

107 2.5. Alkali-insoluble fraction

108 This was performed by alkaline extraction as described previously by Kanetsuma.
109 Briefly, cell walls were suspended in 1 N NaOH (10 mg/ml) and were gently stirred for
110 1h at room temperature. After centrifugation at 5000 x g for 10 min, the supernatant was

111 collected, and the procedure was repeated four times, after which all supernatants were
112 combined. The alkali-insoluble sediment was washed with water until it reached pH 7.0
113 and was then washed with ethanol, acetone and diethyl ether in that order. The resulting
114 white powder was called the alkali-insoluble fraction (F1).

115 2.6. Peritoneal exudate cells

116 Thioglycollate-elicited peritoneal exudate cells (PECs) were harvested from BALB/c
117 mice in 5.0 mL of sterile PBS (pH 7.4). The cells were washed twice by centrifugation
118 at 200 x g for 5 min at 4°C and were resuspended in the appropriate medium for each
119 test.

120 2.7. Splenocytes

121 Spleens were collected aseptically and placed in a Petri dish with 3.0 ml of RPMI-1640
122 culture medium (Sigma). Cell suspensions were obtained by tweezing the spleen,
123 followed by 3 washes with RPMI-1640 as described above. The cells were re-suspended
124 at a concentration of 1×10^7 cells/ml in RPMI-1640 with 100 U/mL penicillin, 100
125 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin, 5×10^{-2} M mercaptoethanol and 5% inactivated fetal calf serum
126 (Sigma).

127 2.8. NO measurement

128 Adherent PECs were re-suspended in RPMI-1640 medium at a concentration of 5×10^6
129 cells/mL, and 100 μL of this suspension was added to each well of a 96-well tissue
130 culture dish along with 100 μL of lipid extract, the alkali-insoluble fraction (F1) from *S.*
131 *schlenckii* yeast form, and lipopolysaccharide (LPS) from *E. coli* O111:B in RPMI-
132 1640C for the positive control or RPMI-1640C alone for the negative control. The cells

133 were incubated for 24 h at 37 °C in a mixture of 95% air and 5% CO₂. To measure NO,
134 50-μL aliquots of the culture supernatants were mixed with 50 μL of Griess reagent (13)
135 (1% w/v sulfanilamide, 0.1% w/v naphthylethylenediamine and 3% H₃PO₄) and
136 incubated at room temperature for 10 min. The color reactions were analyzed at 540 nm
137 with a Multiskan Ascent ELISA reader (Labsystems, Helsinki, Finland).

138 2.9. Flow cytometry analysis of activated caspase-1

139 The PECs were resuspended in RPMI-1640C at a concentration of 2x10⁶ cells/mL, and
140 the adherent cells were obtained by a 1-h incubation at 37°C in an atmosphere with 5%
141 CO₂ (Forma Scientific). Adherent cells were incubated with EL, F1, LPS or RPMI-
142 1640C alone for 2 h at 37°C in 5% CO₂. After this period, FLICA reagent (FAM-
143 YVAD-fmk caspase-1 FLICA™ Kit, Immunochemistry Technologies) was used to
144 determine the percentage of cells with activated caspase-1 by flow cytometry, according
145 to the manufacturer's instructions. The percentage of cells with activated caspase-1 was
146 detected by flow cytometry with a FACSCanto flow cytometer and FACSDiva software
147 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

148 2.10. Cytokine assay

149 The PECs were resuspended in RPMI-1640C at a concentration of 5x10⁶ cells/mL, and
150 the adherent cells were obtained after a 1-h incubation at 37°C in an atmosphere with
151 5% CO₂ (Forma Scientific). The adherent cells were incubated with splenocytes at a
152 concentration of 1x10⁷ cells/mL and EL, F1, LPS, Concanavalin-A (ConA) or RPMI-
153 1640C alone. The cocultured cells were incubated for 24 h at 37°C in 5% CO₂. The
154 levels of IL-1β, IL-18, IL-17 and IFN-γ in the coculture supernatants were determined
155 by ELISA (eBioscience) according to the manufacturer's instructions. The ELISA

156 absorbances were read at 450 nm on a microplate reader (Multiskan Ascent,
157 Labsystems) within 30 min of stopping the reactions.

158 2.11. Statistical analysis

159 Tukey's test (Prism Software, San Diego) was used to determine the statistical
160 significances of differences between the experimental groups. Significance was declared
161 if $P < 0.05$. The reported data are representative of three independent experiments and are
162 presented as the means \pm SD of triplicate observations.

163 3. Results

164 3.1. Nitric oxide production

165 NO production was evaluated in PECs from mice that were infected with *S. schenckii*
166 (Fig. 1A) or with uninfected mice (Fig. 1B). PECs from infected animals produced high
167 levels of NO upon exposure to EL and F1, particularly during the period between the
168 fourth and sixth weeks. The cells from infected animals demonstrated an increased
169 production of NO in response to EL between the fourth and sixth weeks ($p < 0.001$).
170 When cells from infected mice were stimulated with F1, low levels of NO production
171 were observed in the second week but were elevated in the other weeks, with a peak
172 concentration in the sixth week ($p < 0.001$). In uninfected mice, NO production remained
173 low in all weeks.

174 3.2. Determination of active caspase-1

175 The presence of activated caspase-1 in the PECs was assessed with flow cytometry
176 through the covalent attachment of FLICA, a cell permeable substance, to activated
177 caspase-1. In PECs from infected animals (Fig. 2A), after exposure to EL and F1, the

178 percentage of cells with activated caspase-1 was elevated in the second week, reduced
179 in the fourth ($p < 0.001$ between the second and fourth weeks) and sixth weeks, and
180 reached a peak level in the eighth week ($p < 0.001$ between the sixth and eighth weeks).
181 We observed that in the cells from infected mice that were cultured with RPMI-C only,
182 there were higher percentages of cells with activated caspase-1 due to sporotrichosis in
183 the source animals. Among PECs from the uninfected mice (Fig. 2B), low percentages
184 of cells with active caspase-1 were observed throughout the eight-week study.

185 Figures 3 and 4 show histograms and dot plots that represent the flow cytometer
186 calibration controls and the post-adhesion PECs in BALB/c mice that were infected or
187 not with *S. schenckii*.

188 3.3. Release of IL-1 β , IL-18, IL-17 and IFN- γ

189 The cells from infected animals (Fig. 5A) produced lower levels of IL-1 β when
190 stimulated with fungal antigens in the fourth and sixth weeks of infection ($p < 0.001$
191 compared with other weeks). The responses of cells from infected animals to EL and
192 F1, as measured by IL-1 β , were elevated in the second week, reduced in the fourth and
193 sixth weeks ($p < 0.001$) and elevated further in the eighth week.

194 Cells from infected animals that were exposed to fungal antigens produced high levels
195 of IL-18 in the second week; IL-18 concentrations decreased progressively throughout
196 the remaining weeks. The cells from infected animals (Fig. 6A) that were exposed to EL
197 and F1 produced IL-18 in a similar pattern, with observed peak concentrations in the
198 second week and lower concentrations in the eighth week ($p < 0.001$ in the second, fourth
199 and sixth weeks and $p < 0.05$ in the eighth week when compared with the negative
200 control).

201 When cells from infected animals (Fig. 7A) were treated with EL, lower levels of IL-17
202 were observed in the early weeks without much increase in the sixth and eighth weeks.
203 When cells from infected animals were treated with F1, the production of IL-17 in each
204 week ($p < 0.001$ in the second, sixth and eighth weeks when compared with the negative
205 control). High IL-17 concentrations were observed in the second and eighth weeks
206 ($p < 0.001$ compared with other weeks).

207 The cells from infected animals (Fig. 8A) were observed to produce high concentrations
208 of IFN- γ in all weeks ($p < 0.001$ when compared with the negative controls) when
209 exposed to EL and F1. When exposed to EL, increased IFN- γ production was observed
210 in the second, fourth and sixth weeks of infection, with a peak production of IFN- γ in
211 the sixth week ($p < 0.05$ between the fourth and sixth weeks). In response to F1, cells
212 from infected mice produced high amounts of IFN- γ in the second and fourth weeks,
213 with a peak concentration in the eighth week of infection ($p < 0.001$ between the sixth
214 and eighth weeks).

215 The analyses of cytokine levels in the supernatants from the cocultured cells of
216 uninfected mice (Figure 5B, 6B, 7B and 8B) showed that the tested fungal antigens
217 induced low levels of all cytokines throughout the study.

218 4. Discussion

219 Pathogenicity from fungal infections has increased significantly in recent years and is
220 likely due to work habits, recreational activities and increased numbers of susceptible
221 patients (14). In the host, fungal infections are recognized primarily by the innate
222 immune response, which ensures the post-infection survival of the host. NO plays an
223 important role in inflammatory responses and thus in innate immune responses through

224 contributions to the cytotoxic activity of macrophages against bacteria, protozoa, fungi
225 and viruses (15). Our results showed that in our infection model, NO production was
226 higher between the fourth and sixth weeks when cells from infected animals were
227 treated with EL. However, when cells from the same infection time points were
228 stimulated with F1, little production of NO was observed in the second week; however,
229 higher NO levels were observed in other weeks, and peak NO concentrations were
230 reached in the sixth week. High NO concentrations during this period of the infection
231 course might be related to immunosuppressive activity, with subsequent increased
232 disease severity and greater host involvement, because fungal growth in the spleens and
233 livers of infected animals was also observed during this period (15).

234 Another mechanism of the innate immune response involves the PRRs, which recognize
235 a broad spectrum of pathogens through the PAMPs (16). NLRs are cytosolic proteins
236 that form complexes called multiprotein inflammasomes, which act in host defenses
237 against various fungi (17). In addition to the NLR protein, the inflammasome consists of
238 the adapter molecule ASC and the enzyme caspase-1; together, the inflammasome acts
239 as an important regulator of inflammation through the activation of caspase-1, which
240 results in the maturation of the immature forms of IL-1 β and IL-18. These cytokines
241 contribute to the host defense against infections by enhancing the antimicrobial
242 properties of phagocytes and initiating Th1 and Th17 adaptive immune responses (6).

243 The involvement of the inflammasome in this study was verified by the flow cytometric
244 determination of activated caspase-1 levels, through which it was found that infected
245 animals had higher percentages of cells with activated caspase-1 than did normal
246 animals. The cells of infected animals, when exposed to fungal antigens, had higher
247 percentages of cells with activated caspase-1 in the second and eighth weeks and lower

248 percentages in the weeks between those time points. These results indicated low
249 inflammasomal activation during this period, which suggested immunosuppression in
250 the host organism that led to an increased susceptibility to the pathogen. The
251 inflammasome plays an important role in antifungal host defenses, and studies showed
252 that NLR- and ACS-deficient mice had lower survival rates and higher colonization
253 rates in the oral cavities and kidneys after *C. albicans* infection than did wild-type mice,
254 which indicated that the inflammasome is necessary for resistance to the spread of
255 fungal infections (7).

256 Cytokines are regulatory proteins that are released by phagocytic and adaptive immune
257 cells and that are essential to intercellular communication in many pathophysiological
258 processes. The induction of cellular immunity against fungal infections depends on the
259 interactions between antigens, macrophages and lymphocytes (3). Thus, we evaluated
260 the interactions between adherent peritoneal exudate cells and total splenocytes in
261 coculture with *S. schenckii* fungal antigens to determine the effects on the production of
262 various cytokines. IL-1 β is a proinflammatory cytokine that has an important protective
263 role in several bacterial, viral and fungal infection models (18). When cells from
264 infected mice were stimulated with E1 and F1, IL-1 β production was low between the
265 fourth and sixth weeks of infection. Previous studies have observed similar reductions
266 in IL-1 β production during the same time period along with increased fungal
267 proliferation in the spleens of infected animals, which indicate that the absence of IL-1 β
268 could be related to a suppression of the immune response during this time period (13,
269 15, 19). Likewise, IL-18 was thought to be involved in many fungal infections in which
270 the protective role of this cytokine is primarily related to the induction of IFN- γ (20).
271 Our findings regarding IL-18 show that cells from infected animals showed increased
272 production of IL-18 during the second week after exposure to fungal antigens and that

273 IL-18 production decreased progressively throughout the remaining weeks. Further, the
274 reduced production of this cytokine at the midpoint of the experimental timeline might
275 support fungal dissemination and increase host immunosuppression, as most of the
276 fungal proliferation was observed in the spleens of infected animals. Thus, the
277 inflammasome could prevent the spread of fungal contamination. In this context, the
278 cytokine profiles could influence the potential innate immune response.

279 IL-17-producing cells comprise a subset of T cells that have been increasingly
280 recognized as important in adaptive immune responses to a variety of fungi (3). Our
281 results show that IL-17 production by infected cells was more pronounced in response
282 to F1 and that IL-17 production was reduced between the 4th and 6th weeks. In
283 comparison, IL-17 production in response to EL was lower in the initial weeks and was
284 reduced further in the final weeks. This finding is supported by previous reports because
285 IL-17-deficient mice are highly susceptible to disseminated candidiasis and presented
286 with delays in wound healing (23). Throughout the infection time course, cells from
287 infected animals produced high concentrations of IFN- γ after exposure to EL and F1.
288 EL exposure induced peak IFN- γ production levels in the sixth week, while F1 exposure
289 induced peak IFN- γ production levels in the eighth week of infection. Thus, it is
290 possible that the increased release of IFN- γ sustains the release of NO in response to
291 fungal antigens during this time period (23).

292 The IL-1 β - and IL-18-dependent caspase-1 is activated early in Th1 and Th17 adaptive
293 responses. Studies have demonstrated a critical role for inflammasomal components in
294 antifungal responses, as caspase-1 and ASC were observed to facilitate the
295 dissemination of candidiasis by regulating Th1 and Th17 responses (6). Caspase-1- and
296 ASC-deficient mice presented with diminished Th1 and Th17 responses and subsequent

297 increases in fungal proliferation and survival rates of smaller animals, findings that were
298 verified in the present study.

299 This study is the first to relate inflammasomal involvement to *S. schenckii* and its fungal
300 antigens. Our results demonstrated a period of immunosuppression and consequent
301 progression of the disease, as well as the importance of the inflammasome in the effects
302 of this pathogen on host protection. Thus, the data suggest that emerging therapies for
303 this disease could be achieved through the efforts of a controlled inflammatory response
304 that contributes to fungal elimination without major consequences for the host.

305 References

306 1. La Hoz, R.M., Baddley, J.W. 2012. Subcutaneous Fungal Infections. *Curr Infect Dis*
307 *Rep.* 14, 530–539.

308 2. Barros, M.B.L., Almeida-Paes, R., Schubach, O. 2011. *Sporothrix schenckii* and
309 Sporotrichosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 24(4), 633-654.

310 3. Romani, L. 2011. Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 275– 288.

311 4. Lamkanfi, M., Dixit, V.M. 2009. Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity.
312 *Immunol Rev.* 227, 95-105.

313 5. Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. 2011. Pathogen recognition by the innate immune
314 system. *Int Rev Immunol.* 30 (1), 16–34

315 6. Veerdonk, F.L., Netea, M.G., Dinarello, C.A.; Joonsten, L.A. 2011. Inflamassome
316 activation and IL-1b and IL-18 processing during infection. *Trends in Immunology.* 32,
317 110-116.

- 318 7. Hise, A.G., Tomalka, J., Ganesan, S., Patel, K., Hall, B.A., Brown, G.D., Fitzgerald,
319 K.A. 2009. An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the
320 human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Host Microbe*. 5, 487-497.
- 321 8. Maia, D.C., Sassa, M.F., Placeres, M.C., Carlos, I.Z. 2006. Influence of Th1/Th2
322 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix*
323 *schenckii*. *Mycopathologia*. 161, 11–19.
- 324 9. Fernandes, K.S., Neto, E.H., Brito, M.M., Silva, J.S., Cunha, F.Q., Barja-Fidalgo, C.
325 2008. Detrimental role of endogenous nitric oxide in host defence against *Sporothrix*
326 *schenckii*. *Immunology*. 123, 469–479.
- 327 10. Guermonprez, P.; Valladeau, J.; Zitvogel, L.; Théry, C.; Amigorena, S. 2002. Antigen
328 presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 20, 621-667.
- 329 11. Veerdonk, F.L., Netea, M.G. 2010. T-cell Subsets and Antifungal Host Defenses.
330 *Curr Fungal Infect Rep*. 4, 238–243.
- 331 12. Carlos, I. Z., Zini, M. M., Sgarbi, D.B., Angluster, J., Alviano, C. S., Silva, C. L.
332 1994. Disturbances in the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor in
333 disseminated murine sporotrichosis. *Mycopathologia*. 127(3), 189-194.
- 334 13. Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S.,
335 Tannenbaum, S.R. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and (15N) nitrate in biological
336 fluids. *Anal Biochem*. 126, 131–138.
- 337 14. Sifuentes-Osornio, J., Corzo-León, D.E., Ponce-de-León, L.A. 2012. Epidemiology
338 of Invasive Fungal Infections in Latin America. *Curr Fungal Infect Rep*, 6, 23–34.

339 15. Carlos, I.Z., Sassa, M.F., Sgarbi, D.B., Placeres, M.C., Maia, D.C. 2009. Current
340 research on the immune response to experimental sporotrichosis. *Mycopathologia*. 168,
341 1–10.

342 16. Gil, M.L.; Gozalbo, D. 2006. TLR2, but not TLR4, triggers cytokine production by
343 murine cells in response to *Candida albicans* yeasts and hyphae. *Microbes Infect.* 8,
344 2299–2304.

345 17. Chen, G., Pedra, J.H. 2010. The inflammasome in host defense. *Sensors (Basel)*.
346 10(1), 97-111.

347 18. Dinarello, C.A. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med.* 2005. 201(9),
348 1355-1359.

349 19. Carlos, I.Z., Sgarbi, D.B., Angluster, J., Alviano, C.S., Silva, C.L. 1992.
350 Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix*
351 *schlenckii* in the systemic form of the disease. *Mycopathologia*, 117(3), 139-144.

352 20. Sahoo, M., Ceballos-Olvera, I., Barrio, L., Re, F. 2011. Role of the Inflammasome,
353 IL-1 β , and IL-18 in Bacterial Infections. *TheScientificWorldJournal*, 11, 2037–2050.

354 21. Carlos, I.Z., Sgarbi, D.B.G., Santos, G.C., Placeres, M.C.P. 2003. *Sporothrix*
355 *schlenckii* Lipid Inhibits Macrophage Fagocytosis: Involvement of Nitric Oxide and
356 Tumour Necrosis Factor- α . *Scandinavian Journal of Immunology*. 57, 214-220.

357 Figure Legends

358 Figure 1 - NO production in cultured PECs from BALB/c mice that were infected (A) or
359 not (B) with the fungus *S. schlenckii* for eight weeks. The PECs of infected and

360 uninfected animals were cultured in the presence of EL, F1, LPS or RPMI-C. PECs
361 from each test animal were evaluated in triplicate at the time of the experiment, and
362 these results show the values from three independent experiments. The nitrite
363 concentrations were obtained from a standard curve that had been established
364 previously with known molar concentrations of sodium nitrite (NaNO_2), and the results
365 were expressed in $\mu\text{mols nitrite}/5 \times 10^5$ of cells. The data are shown as the means \pm SD of
366 five animals per each week of infection. *** $p < 0.001$ between the fourth and sixth
367 weeks compared with the other weeks.

368 Figure 2 - Determination of caspase-1 activity in PECs of BALB/c mice that were
369 infected (A) or not (B) with *S. schenckii* for eight weeks. The PECs from infected and
370 uninfected mice were cultured in the presence of EL, F1, LPS or RPMI-C. Activated
371 caspase-1, as determined by FLICA binding, was quantified by flow cytometry. These
372 results show the values from three independent experiments. The results were expressed
373 as the percentages of cells with activated caspase-1 and are shown as the means \pm SD of
374 five animals per each week of infection. *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ for EL and F1 treated
375 cells compared with the negative control.

376 Figure 3 - Histograms and dot plots that represent the calibration controls for the flow
377 cytometric analysis of PECs that were obtained from BALB/c mice infected with *S.*
378 *schonckii*. The values shown in the quadrants correspond to the control cells and FLICA
379 reagent.

380 Figure 4 - Histograms and dot plots that represent the calibration controls for the flow
381 cytometric analysis of PECs that were obtained from uninfected BALB/c mice. The
382 values shown in the quadrants correspond to the control cells and FLICA reagent.

383 Figure 5 - Concentrations of IL-1 β in the supernatants from PEC and total splenocyte
384 cocultures from BALB/c mice that were infected (A) or not (B) with *S. schenckii* for
385 eight weeks. The cells were cultured in the presence of EL, F1, LPS, Con-A or RPMI-
386 C. IL-1 β concentrations were determined by ELISA and were calculated with a standard
387 curve that was established previously from known concentrations of IL-1 β . These
388 results show the values from three independent experiments. The results were expressed
389 as pg/ml and were shown as the means \pm SD of five animals per each week of infection.
390 *** $p < 0.001$ for the fourth and sixth weeks compared with the other weeks.

391 Figure 6 - Concentration of IL-18 in the supernatants from PEC and total splenocyte
392 cocultures from BALB/c mice that were infected (A) or not (B) with *S. schenckii* for
393 eight weeks. The cells were cultured in the presence of EL, F1, LPS, Con-A or RPMI-
394 C. IL-18 concentrations were determined by ELISA and were calculated with a standard
395 curve that was established previously from known concentrations of IL-18. These
396 results show the values from three independent experiments. The results were expressed
397 as pg/ml and are shown as the means \pm SD of five animals per each week of infection.
398 *** $p < 0.001$ for EL and F1 treated cells compared with the negative control.

399 Figure 7 - Concentration of IL-17 in the supernatants from PEC and total splenocyte
400 cocultures from BALB/c mice that were infected (A) or not (B) with *S. schenckii* for
401 eight weeks. The cells were cultured in the presence of EL, F1, LPS, Con A or RPMI-C.
402 IL-17 concentrations were determined by ELISA and were calculated with a standard
403 curve that was established previously from known concentrations of IL-17. These
404 results show the values from three independent experiments. The results were expressed
405 as pg/ml and are shown as the means \pm SD of five animals per each week of infection.
406 *** $p < 0.001$ for F1 treated cells compared with the negative control.

407 Figure 8 - Concentration of IFN- γ in the supernatants from the PECs and total
408 splenocytes from BALB/c mice that were infected (A) or not (B) with *S. schenckii* for
409 eight weeks. The cells were cultured in the presence of EL, F1, LPS, Con A or RPMI-
410 1640C. IFN- γ concentrations were determined by ELISA and were calculated with a
411 standard curve that was established previously from known concentrations of IFN- γ .
412 These results show the values from three independent experiments. The results were
413 expressed as pg/ml and are shown as the means \pm SD of five animals per each week of
414 infection. *** $p < 0.001$ for EL and F1 compared with the negative control, # $p < 0.05$ for
415 the peak concentration of IFN- γ at eight weeks.

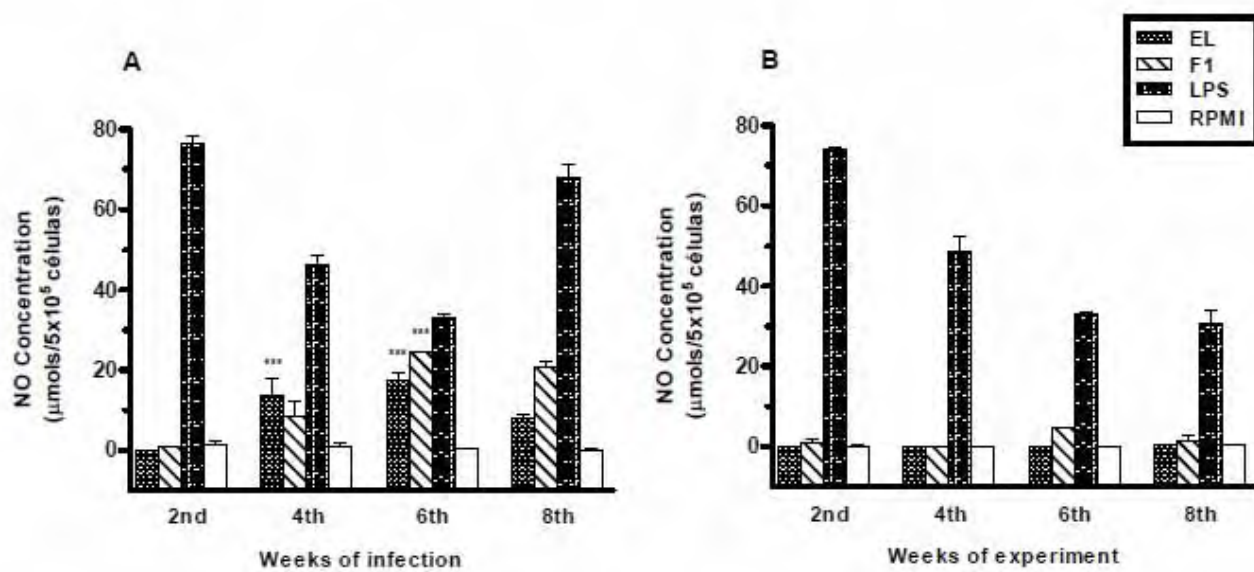


Figure 2.pdf



Figure 3.pdf

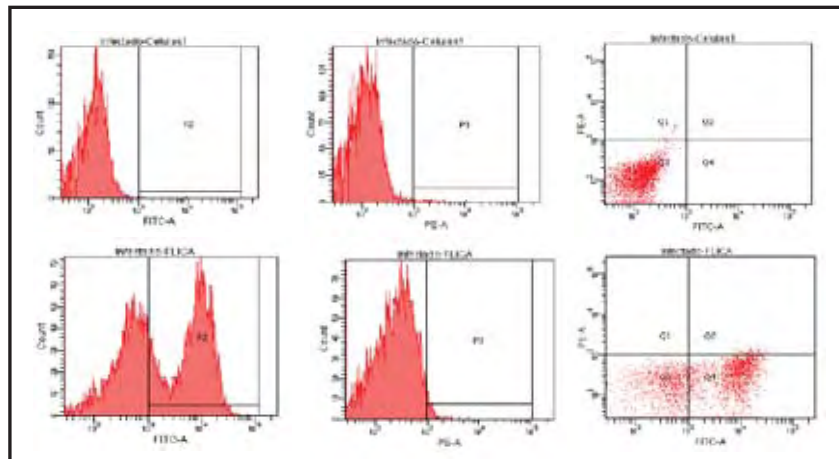
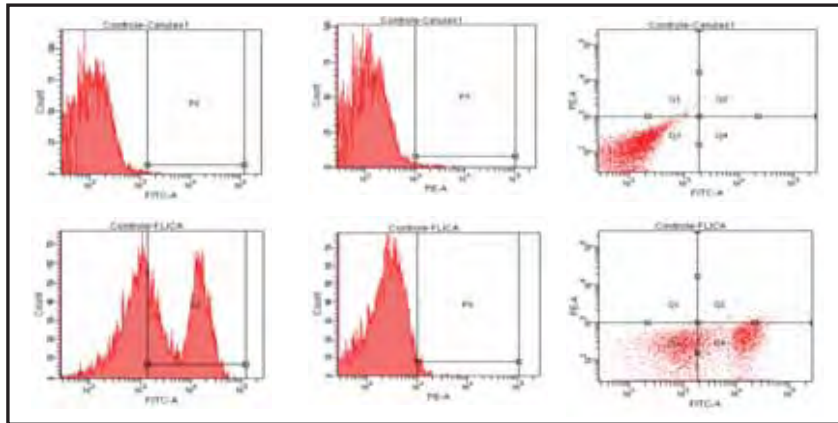


Figure 4.pdf



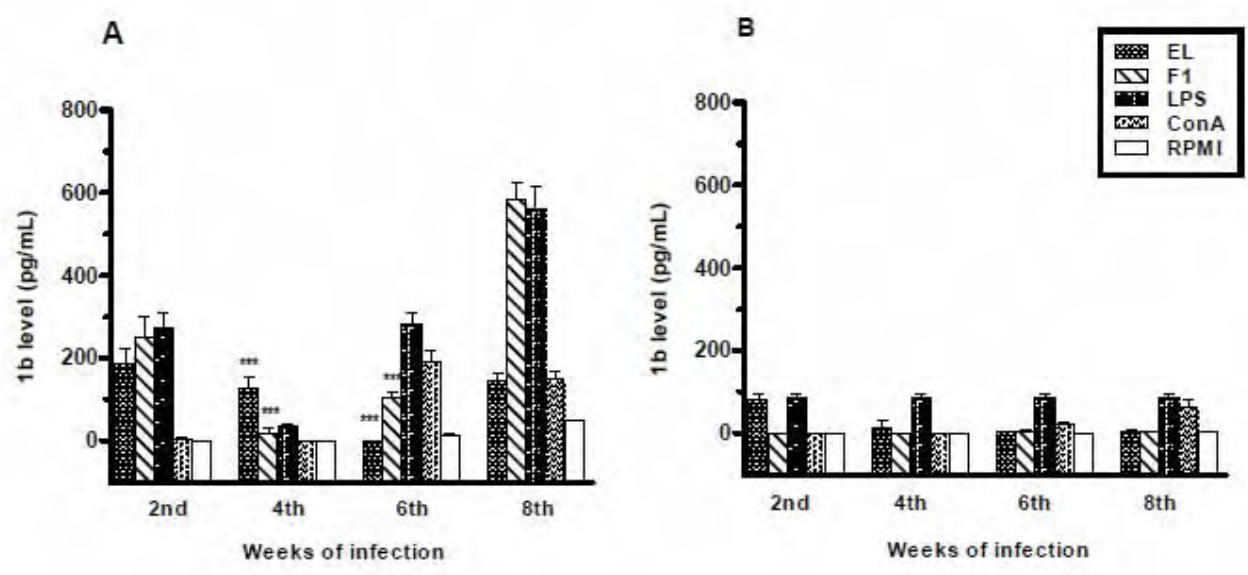


Figure 6.pdf

