

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA

THAIS DE CÁSSIA NEGRINI

Influência do receptor Toll-like 2 na defesa do hospedeiro contra o
fungo Sporothrix schenckii

ARARAQUARA - SP

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA

THAIS DE CÁSSIA NEGRINI

**Influência do receptor Toll-like 2 na defesa do hospedeiro contra o
fungo *Sporothrix schenckii***

Tese 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 obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área de concentração Buco-Dental, área de concentração em Imunologia Clínica.

Orientadora: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos
Co-orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio

ARARAQUARA - SP

2012

Ficha Catalográfica

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

N386i Negrini, Thais de Cássia
Influência do receptor Toll-like 2 na defesa do hospedeiro contra o fungo *Sporothrix schenckii* / Thais de Cássia Negrini. – Araraquara, 2012
116 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia
Orientador: Iracilda Zeppone Carlos
Coorientador: Luis Carlos Spolidorio

1. *Sporothrix schenckii*. 2. Esporotricose. 3. Camundongo.
4. TLR-2. 5. Citocinas. I. Carlos, Iracilda Zeppone, orient. II. Spolidorio, Luis Carlos, coorient. III. Título.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP) com apoio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), por meio da concessão de Bolsa (Processo nº 2009/07529-1) e Auxílio Pesquisa (Processo nº 2009/11999-3).

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Anésio e Roseli**, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, honestidade e respeito, que não mediram esforços para que conquistasse todos os meus objetivos. Obrigada pelo incentivo e confiança em todos os momentos da minha vida. A vocês, devo tudo o que sou hoje e dedico esta conquista.*

*Aos meus irmãos, **Lucas e André**, presentes de Deus na minha vida, pela preocupação um com o outro, pela torcida, pelo carinho e respeito presentes na nossa convivência.*

*Aos meus tios **Vanderley Vicente Fazolaro e Rosemary Aparecida Fazolaro** (in memoriam), que sempre souberam me fazer sorrir, pelo imenso amor e carinho, pela alegria em fazer tudo parecer mais simples e prazeroso. Sei que está muito feliz e orgulhosa "Ronaldinha" ... tenho plena certeza de que está ao meu lado neste momento.*

*Ao meu esposo **Rodrigo**, que tem sido meu suporte, fonte de inspiração, companheiro e amigo de todas as horas. Obrigada pelo amor, incentivo contante e por, além de tudo, ter sido um grande colaborador na condução deste trabalho. Este título não é somente meu, mas sim nosso. Com todo meu amor dedico esta conquista.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A **DEUS**, pela presença constante e oportunidades concedidas. Por sempre me amparar nos momentos difíceis e por permitir que **Santa Rita de Cássia** e todo **campo espiritual** estejam comigo em todos os momentos.

À **Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos**, minha orientadora a quem admiro e respeito muito, por ter me recebido com tanto carinho, pela amizade construída, por torcer por mim e me apoiar em todos os momentos. Agradeço pela orientação e contribuição à minha formação profissional. Serei eternamente grata pela confiança depositada em mim. A senhora sempre estará presente no meu coração e, com certeza, nos meus trabalhos futuros.

Ao **Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio**, meu co-orientador, pelo carinho, pela amizade, pelos conselhos, pela ajuda de sempre e por estar presente em todos os momentos da minha vida desde a minha Iniciação Científica contribuindo para o meu crescimento profissional.

À minha cunhada **Beatriz de Godoy**, pela amizade e por conceder a nossa princesinha **Heloisa**, motivo de alegria da nossa família.

À minha prima **Renata**, pela presença constante em todos os momentos da minha vida, que em dupla com minha tia Ronaldinha sempre fez o possível para que meu sorriso estivesse estampado no rosto mesmo nas situações mais difíceis. Saudade eterna!

A toda família Fazolaro (“família cachoeira”), **Marcelo, Luzia, Sandra, Vini e Paolla**, pela presença constante em todos os momentos da minha vida, pela alegria e torcida de sempre.

À minha segunda família, **família do Rodrigo**, por terem me acolhido com tanto carinho, pela torcida e pelo apoio constantes.

À **Maria Helena Leves e família**, por terem me adotado como membro da família, pelo imenso carinho, pela ajuda, amizade e torcida. Ma, obrigada pela presença constante não só na minha vida, mas também por todo carinho dedicado aos meus pais nos momentos em que não estava presente.

À minha professora e amiga, **Denise Madalena Palomari Spolidorio**, que incentivou meu primeiro passo nesta trajetória acadêmica estando comigo desde a Iniciação Científica, pela convivência e amizade, pelos conselhos. Por sempre estar de portas abertas e por ter sido meu exemplo a ser seguido.

Ao funcionário do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo), **Júlio Anselmo Siqueira**, por sempre me atender com carinho nos momentos de desespero e dificuldade de obtenção dos animais para a realização deste trabalho.

À **Fabiana Rossetto de Moraes**, responsável pela Citometria de Fluxo na Faculdade de Ciências Farmacêuticas em Ribeirão Preto – USP, pela atenção e por não ter medido esforços para me atender quando necessitei.

À **Marisinha**, minha querida, pela amizade, ajuda, atenção e pelo imenso carinho. Você sempre estará no meu coração.

Aos meus colegas de laboratório e agregados da Imuno, **Aline, Amanda, Camila, Carol Quinello, Carol Urbaczek, Danielle, Deivys, Djamile, Felipe, Juliana, Livia, Lucas, Marcela, Mauro, Pâmela, Rosângela, Rosemira**, pela ajuda daqueles que trabalharam efetivamente no desenvolvimento do projeto, pela convivência com todos e pelo coleguismo.

Ao meu querido aluno de Iniciação Científica, **Pedro Sundfeld Passos**, pela educação e responsabilidade, tenho certeza que construirá uma carreira de muito sucesso e realizações.

A todos professores, amigos e funcionários da **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - FCFAR/UNESP**, pelo carinho, pela atenção e amizade. Momentos que sempre serão lembrados com muita saudade.

Às funcionárias da Seção de Pós-graduação, **Cláudia, Márcia, Sônia, Laura, Daniela e Joyce** pela prontidão em me atender nos momentos em que precisei.

À **Profa. Dra. Mythily Srinivasan** e ao **Prof. Dr. Rodrigo Alex Arthur**, meus orientadores durante os meses em que realizei estágio de doutorado no exterior na Indiana University School of Dentistry. Agradeço pela atenção, ajuda e pelo carinho com que fui recebida em seus laboratórios. Obrigada pela oportunidade e pela contribuição no meu enriquecimento profissional.

A todos os professores e funcionários da Indiana University School of Dentistry pela paciência, dedicação em me fazer sentir em casa e pela ajuda durante a realização do estágio, especialmente ao **Prof. Dr. Domenick Zero** e aos queridos amigos **Sharon E. Gwinn, Robert Aaron Waeiss e Dharanikanth Sathyanarayana**.

Aos membros da banca do exame de qualificação, **Profa. Dra. Carla Raquel Fontana Mendonça** e **Prof. Dr. Alexandre Valentim Xavier Mourão do Carmo**, pelas sugestões e considerações feitas para o enriquecimento do trabalho.

Aos professores, amigos e funcionários da **Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP/UNICAMP**, em especial aos meus orientadores, **Profa. Dra. Renata de Oliveira Mattos-Graner** e **Prof. Dr. Edgard Graner**, pela oportunidade concedida para a realização do meu mestrado e ao querido **Prof. Dr. José Francisco Höfling**, pela amizade, atenção e pelo carinho. O senhor é muito especial para mim professor,

um ser humano iluminado. O mestrado foi um período importante de crescimento profissional durante esta minha jornada.

Aos professores, amigos e funcionários da **Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAr/UNESP**, por terem participado da minha formação durante o Curso de Graduação em Odontologia e por sempre torcerem por mim de maneira tão intensa e carinhosa. Todos vocês possuem um espaço muito especial no meu coração.

Às minhas amigas e irmãs de Araraquara, **Sybele Saska** e **Vanessa Martelli**, pelos vários anos de amizade e lealdade. Obrigada por estarem presentes em todos os momentos não só da minha vida, mas também da minha família.

À companheira de trabalho e amiga, **Cristiane Duque**, um exemplo de competência, determinação e força de vontade. Obrigada pelo carinho, confiança e amizade. Mesmo estando distante fisicamente no meu doutorado, sempre esteve presente na minha vida desde a Iniciação Científica colaborando para o meu enriquecimento profissional. Você é, e sempre será, muito especial para mim.

À querida amiga **Janaina Sardi**, companheira desde o mestrado, pela amizade sincera e pelo carinho. Você é muito iluminada pelo rapazinho lá de cima Janinha. Apesar da distância física, você sempre vai estar no meu coração.

À querida amiga **Flávia Sammartino Mariano Rodrigues**, pela amizade e consideração, pelo carinho. Flavinha, muito obrigada por tudo.

A **todos os meus amigos**, distantes ou não fisicamente, que o cotidiano não nos permite estarmos juntos todos os dias, muito obrigada pelo carinho, pela torcida e amizade sincera. Todos vocês são muito especiais para mim.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelos recursos concedidos que foram fundamentais para a realização desse trabalho (Processos n^{os} 2009/07529-1 e 2009/11999-3).

A **todos** que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

meus sinceros agradecimentos.

"Muitas vezes, as pessoas são egocêntricas,
ilógicas e insensatas.
Perdoe-as, assim mesmo.

Se você é gentil, as pessoas podem acusá-lo
de egoísta, interesseiro.
Seja gentil, assim mesmo.

Se você é um vencedor, terá alguns falsos
amigos e inimigos verdadeiros.
Vença, assim mesmo.

Se você é honesto e franco, as pessoas
podem enganá-lo.
Seja honesto e franco, assim mesmo.

Se você tem paz e é feliz, as pessoas podem
sentir inveja.
Seja feliz, assim mesmo.

O bem que você faz hoje, pode ser
esquecido amanhã.
Faça o bem, assim mesmo.

Dê ao mundo o melhor de você, mas isso
pode nunca ser o bastante.
Dê o melhor de você, assim mesmo.

Veja você que, no final das contas,

É ENTRE VOCÊ E DEUS,

nunca entre você e as outras pessoas."

Madre Teresa de Calcutá

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

Capítulo I

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Esporotricose	18
1.2. <i>S. schenckii</i> e seus fatores de virulência	20
1.3. A resposta imunológica e o fungo <i>S. schenckii</i>	22
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. Delineamento experimental	32
3.2. Microrganismo	32
3.3. Cultivo do fungo <i>S. schenckii</i>	33
3.4. Obtenção dos antígenos do fungo <i>S. schenckii</i>	34
3.4.1. Exoantígeno	34
3.4.2. Antígeno solúvel	34
3.4.3. Antígeno lipídico	35
3.5. Animais	35
3.6. Infecção dos animais	35
3.7. Obtenção dos macrófagos peritoneais e condições de cultura	36
3.8. Obtenção dos sobrenadantes das culturas das células peritoneais	38
3.9. Determinação da produção de óxido nítrico (NO)	39
3.10. Extração e pesagem do baço dos camundongos WT e TLR-2 ^{-/-} infectados e não infectados com o fungo <i>S. schenckii</i>	40
3.11. Obtenção das células do baço	40
3.12. Obtenção dos sobrenadantes das culturas das células do baço	41
3.13. Análise fenotípica dos linfócitos provenientes do baço por	41

citometria de fluxo	
3.14. Análise dos resultados	43
4. RESULTADOS	44
4.1. Determinação da produção de IL-1 β , IL-12 e TNF- α por macrófagos peritoneais	44
4.2. Determinação da produção de óxido nítrico (NO)	51
4.3. Verificação do peso do baço dos camundongos WT e TLR-2 $^{-/-}$ infectados e não infectados com o fungo <i>S. schenckii</i>	53
4.4. Determinação da produção de IFN- γ , IL-6, IL-4, IL-10, IL-17 e TGF- β pelas células do baço	55
4.5. Análise fenotípica dos linfócitos provenientes do baço por citometria de fluxo	68
5. DISCUSSÃO	73
6. CONCLUSÕES	85
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
<i>Capítulo II</i>	
Artigo aceito para publicação	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µg	micrograma
µm	micrometro
µL	microlitro
APC	Aloficocianina
AS	Antígeno solúvel
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CAA	Células Apresentadoras de Antígeno
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
Cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
ConA	Concanavalina A
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EXO	Exoantígeno
<i>et al</i>	e outros (de <i>et alli</i>)
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FoxP3	<i>transcription factor forkhead box P3</i>
<i>g</i>	Força gravitacional
g	Gramma
H	Horas
IFN-γ	Interferon gama
Km	Kilometro
IL	Interleucina
LIP	Antígeno Lipídico
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
min	minutos
mL	mililitros

mM	milimolar
mm	milímetros
nm	nanometro
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PE	<i>Phycoerythrin</i>
pg	picogramas
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
q.s.p.	quantidade suficiente para
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (meio de cultura – série 1640)
Th	Linfócito T <i>helper</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
Treg	Células T regulatórias
UV	Ultravioleta
U	Unidades
W	Watts
WT	<i>Wild Type</i>

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Método de cultivo do fungo *Sporothrix schenckii*33
- Figura 2.** Método de infecção pelo fungo *Sporothrix schenckii*36
- Figura 3.** Procedimento de inoculação de 3ml de tioglicolato de sódio (3%) na cavidade peritoneal dos camundongos37
- Figura 4.** Etapas da coleta de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 previamente inoculados com solução de tioglicolato de sódio a 3%38
- Figura 5.** Concentração de IL-1 β liberada nos sobrenadantes de cultura dos macrófagos peritoneais de camundongos WT não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* e TLR-2 $^{-/-}$ não infectados (C) ou infectados (D) com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas46
- Figura 6.** Concentração de IL-12 liberada nos sobrenadantes de cultura dos macrófagos peritoneais de camundongos WT não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* e TLR-2 $^{-/-}$ não infectados (C) ou infectados (D) com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas48
- Figura 7.** Concentração de TNF- α liberada nos sobrenadantes de cultura dos macrófagos peritoneais de camundongos WT não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* e TLR-2 $^{-/-}$ não infectados (C) ou infectados (D) com o fungo *S. Schenckii* durante dez semanas50
- Figura 8.** Produção de NO em cultura dos macrófagos peritoneais de camundongos WT não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* e TLR-2 $^{-/-}$ não infectados (C) ou infectados (D) com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas52
- Figura 9.** Peso do baço de camundongos WT (A) e TLR-2 $^{-/-}$ (B) não infectados ou infectados com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas54
- Figura 10.** Concentração de IFN- γ liberada nos sobrenadantes de cultura das células do baço de camundongos WT não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* e TLR-2 $^{-/-}$ não infectados (C) ou infectados (D) com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas57

Figura 11. Concentração de IL-6 liberada nos sobrenadantes de cultura das células do baço de camundongos WT não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* e TLR-2^{-/-} não infectados (C) ou infectados (D) com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas59

Figura 12. Concentração de IL-4 liberada nos sobrenadantes de cultura das células do baço de camundongos WT não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* e TLR-2^{-/-} não infectados (C) ou infectados (D) com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas61

Figura 13. Concentração de IL-10 liberada nos sobrenadantes de cultura das células do baço de camundongos WT não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* e TLR-2^{-/-} não infectados (C) ou infectados (D) com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas63

Figura 14. Concentração de IL-17 liberada nos sobrenadantes de cultura das células do baço de camundongos WT não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* e TLR-2^{-/-} não infectados (C) ou infectados (D) com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas65

Figura 15. Concentração de TGF- β liberada nos sobrenadantes de cultura das células do baço de camundongos WT não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* e TLR-2^{-/-} não infectados (C) ou infectados (D) com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas67

Figura 16. Porcentagem de linfócitos T CD4⁺ (LT-CD4) encontrada no baço de camundongos WT e TLR-2^{-/-} não infectados ou infectados com o fungo *S. schenckii* e TLR-2^{-/-} durante dez semanas70

Figura 17. Porcentagem de linfócitos T CD8⁺ (LT-CD8) encontrada no baço de camundongos WT e TLR-2^{-/-} não infectados ou infectados com o fungo *S. schenckii* e TLR-2^{-/-} durante dez semanas71

Figura 18. Porcentagem de linfócitos T CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺ (LT-CD4/CD25/FoxP3) encontrada no baço de camundongos WT e TLR-2^{-/-} não infectados ou infectados com o fungo *S. schenckii* e TLR-2^{-/-} durante dez semanas72

RESUMO

A esporotricose é uma infecção causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenckii*, o qual contamina o hospedeiro através de locais com pequenos traumas, causando lesões cutâneas, subcutâneas que podem se disseminar para outros tecidos. Os mecanismos imunológicos envolvidos na prevenção e controle da esporotricose sugerem que a imunidade mediada por células apresenta um importante papel na proteção do hospedeiro contra *S. schenckii*. Os receptores Toll-like (TLR), presentes nas células do sistema imune inato, destacam-se pelo seu papel central na ligação de patógenos e iniciação da resposta imune. A ativação desses receptores por padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) induz a fagocitose, a liberação de citocinas e mediadores químicos que atuam no sistema imune eliminando ou favorecendo a infecção. O TLR-2 está envolvido na resposta do hospedeiro contra uma variedade de fungos. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a participação do TLR-2 na resposta imunológica induzida pelo *S. schenckii*. Foram utilizados camundongos C57BL/6 (WT) e C57BL/6 TLR-2 Knockout (TLR-2^{-/-}) para que se conseguisse verificar, durante um período de 10 semanas de infecção esporotricótica, a influência do TLR-2 na produção das citocinas IL-1 β , IL-12 e TNF- α por macrófagos; a estimulação dos macrófagos através da liberação de NO, a participação do TLR-2 na geração dos perfis celulares Th1, Th2 e Th17 e, por fim, a influência desse receptor na produção de IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-4, IL-17 e TGF- β . Entre os antígenos do fungo *S. schenckii* utilizados como estímulo nas culturas celulares, verificou-se que o antígeno lipídico é o mais eficaz na capacidade de estimular a produção dos mediadores imunológicos, seguido do exoantígeno e do

antígeno solúvel, respectivamente. Em se tratando da produção dos mediadores pro-inflamatórios e NO, a interferência do TLR-2 é marcante, uma vez que sua ausência a inibiu totalmente. Com relação às citocinas IL-10 e IL-4, a ausência desse receptor não aboliu a produção, mas interferiu nos níveis liberados, estando abaixo daqueles observados nos animais com a presença de TLR-2. A produção de IL-17 ocorreu independente da ausência de TLR-2, animais TLR-2^{-/-} apresentaram produção superior desse mediador quando comparados aos animais WT. A ausência de resposta Th1 nos animais TLR2^{-/-} foi concomitante com a produção de IL-17, enquanto que a baixa porcentagem de Treg sugeriu o aumento dessa interleucina. Portanto, com base nos resultados obtidos, pode-se sugerir que a ausência de TLR-2 interfere no curso da infecção induzida pelo fungo *S. schenckii*.

PALAVRAS-CHAVE: *Sporothrix schenckii*, esporotricose, camundongo, TLR-2, citocinas.

ABSTRACT

Sporotrichosis is an infection caused by the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*, which infects the host through local minor trauma, causing skin and subcutaneous lesions which can spread to other tissues. The immunological mechanisms involved in sporotrichosis prevention and control suggest that cell-mediated immunity plays an important role in protecting the host against *S. schenckii*. The Toll-like receptors (TLR), found on innate immune system cells, for their central role in pathogen-binding and immune response initiation. The activation of these receptors by pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) induces phagocytosis and the release of chemical mediators and cytokines which direct the immune system in favoring or eliminating the infection. TLR-2 is involved in host responses against a variety of fungi. Therefore, the aim of this study was to evaluate the involvement of TLR-2 in the immune response induced by *S. schenckii*. C57BL/6 mice (WT) and C57BL/6 TLR-2 knockout (TLR-2^{-/-}) were used in order to evaluate, over a period of 10 weeks of sporotrichotic infection, the influence of TLR-2 over macrophages production of the cytokines IL-1 β , IL-12 and TNF- α , their stimulation level by NO release, the involvement of TLR-2 in the generation of Th1, Th2 and Th17 cell profiles and, finally, the influence of this receptor in the production of IFN - γ , IL-6, IL-10, IL-4, IL-17 and TGF- β . Among all the *S. schenckii* antigens used as stimulus in cell cultures, it was found that the lipid antigen is the most effective in regard to the ability to stimulate the production of immune mediators, followed by the exoantigen and the soluble antigen, respectively. In terms of the production of pro-inflammatory mediators and NO, TLR-2 interference is striking, since its absence completely

inhibited it. Regarding the cytokines IL-10 and IL-4, absence of the aforementioned receptor did not abolish their production, but reduced the released levels to below those observed in animals with normal TLR-2 expression. IL-17 production was independent of TLR-2, with TLR-2^{-/-} animals showing higher production of this mediator when compared to WT animals. The absence of Th1 response in TLR2^{-/-} animals was concomitant with IL-17 production, whereas the lower percentage of Treg cells suggested the increase of this interleukin. Therefore, based on the obtained results, it can be suggested that TLR-2 absence interferes with the course of the infection induced by the fungus *S. schenckii*.

KEY-WORDS: *Sporothrix schenckii*, sporotrichosis, mice, TLR-2, cytokines.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

1.1. Esporotricose

A esporotricose é uma micose provocada pelo fungo *Sporothrix schenckii* (*S. schenckii*) pertencente à classe dos Hyphomycetes (Donadel et al., 1993), o qual é constituído de hifas septadas, com conídios lateralmente na hifa ou em grupos no final de conidióforos. Quando se desenvolve a 37°C, cresce na forma de levedura. Em muitos casos crescem redondos, ovais ou em forma de charuto e se reproduzem por brotamento (Gori et al., 1997; Méndez-Tovar et al., 2004). A manifestação da doença é resultante da inoculação direta de conídios e hifas do fungo. O habitat do *S. schenckii* é o solo, onde vive em associação com restos vegetais, bolor e madeira, em regiões de climas temperado e tropical úmido (da Rosa et al., 2005). Fatores geoclimáticos, como elevada altitude, alta quantidade de chuvas, alta umidade do ar e temperaturas amenas, são favoráveis para o crescimento do *S. schenckii* (Agarwal et al., 2008). Assim, a esporotricose é uma importante micose cutânea endêmica, de distribuição mundial, encontrada principalmente em regiões de clima temperado ou tropical (Belknap, 1989; Barros et al., 2003). Na América do Sul, a doença ocorre com maior frequência no outono úmido ou verão (Lopes et al., 1999).

Esta micose atinge, principalmente, trabalhadores que possuem contato diretamente com a terra, como fazendeiros, horticultores, jardineiros e floristas (Belknap, 1989; Morris-Jones, 2003). Entretanto, atualmente os veterinários, técnicos, cuidadores e proprietários de gatos com esporotricose têm sido considerados como uma nova categoria de risco para a aquisição dessa doença (Barros et al., 2010).

A doença se desenvolve habitualmente na pele, no tecido subcutâneo e, através dos vasos linfáticos, pode comprometer órgãos internos (Nascimento et al., 2005;

Mendoza et al., 2007; Fernandes et al., 2008; Carlos et al., 2009). Entretanto, formas disseminadas da doença são menos comuns e podem estar associadas à imunossupressão. Nesses casos o fungo pode invadir o sistema sanguíneo e disseminar-se para outros tecidos. Pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) são altamente suscetíveis ao desenvolvimento de esporotricose (Rocha et al., 2001; Carvalho et al., 2002; Hardman et al., 2005). Por outro lado, casos de esporotricose osteo-articular são manifestações que normalmente acometem pessoas com uso abusivo de álcool (Howell & Toohey, 1998). A disseminação do fungo para o pulmão, da mesma forma, está relacionada ao abuso de álcool ou a pessoas que possuem obstrução pulmonar crônica (Pluss & Opal, 1986).

Sabe-se que diferentes microrganismos podem penetrar no hospedeiro por inalação, ingestão, transmissão sexual, picadas de insetos ou mordidas de animais. Alguns autores sugerem que animais capazes de desenvolver a doença podem transmiti-la ao homem por mordedura, arranhadura e picada. No Brasil, o número de pacientes que adquirem esporotricose por transmissão direta de gatos domésticos aumentou significativamente na última década (Schubach et al., 2008; Silva, 2010). Os felinos possuem o hábito de cavar buracos, cobrir seu excremento com terra, além de afiar as unhas em troncos de árvores, o que faz com que suas garras entrem em contato com o fungo o que possibilita esses animais se tornarem agentes carreadores do *Sporothrix* podendo infectar outros animais ou humanos mesmo sem manifestarem a doença (Souza et al., 2006). Além disso, a esporotricose em gatos apresenta algumas características que as distinguem das expressas em outras espécies, a mais importante é a exuberância de células fúngicas nas lesões cutâneas o

que potencializa a capacidade infectante desse animal tanto ao homem quanto a outros animais (Marques et al., 1993). No Rio Grande de Sul, 92 casos de gatos com esporotricose foram diagnosticados pelo Laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade Federal de Pelotas entre os anos de 2000 e 2012 (Madrid et al., 2012). No Rio de Janeiro, entre o período de 1998 a 2004, 759 pessoas, 64 cães e 1503 gatos foram diagnosticados com esporotricose no Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas. Desses, 85% dos cães e 83,4% dos pacientes tiveram contato com gatos enfermos, e 55,8% desses pacientes relataram mordidas ou arranhões pelos gatos (Schubach et al., 2008). Os casos de esporotricose relatados no Rio de Janeiro, acometem áreas caracterizadas por serviços de saúde precários e condições sócioeconômicas desprivilegiadas representando um problema de saúde pública (Barros et al., 2010).

1.2. *S. schenckii* e seus fatores de virulência

A característica dimórfica e termotolerante do fungo *S. schenckii* são considerados fatores relacionados à sua virulência, já que conferem maior capacidade de proteção desse patógeno frente ao sistema imune do hospedeiro.

Além das características citadas acima, alguns dos antígenos do fungo podem estar relacionados à resposta imune gerada durante a infecção, a forma leveduriforme possui uma fina camada de um composto peptideo-polissacarídico na superfície celular que pode ser parcialmente liberada no meio de cultura, compreendendo uma série de produtos conjuntamente chamados de exoantígenos (Polonelli & Morace, 1982; Carlos et al., 2009).

Outros componentes da parede celular também parecem estar relacionados à virulência deste fungo patogênico (Sgarbi et al., 1997; Carlos et al., 1999; Fernandes et al., 2000). Castillo et al. (1990) demonstraram que os antígenos da superfície celular do fungo *S. schenckii*, presentes tanto na fase miceliar quanto na leveduriforme podem induzir a produção de anticorpos. Por outro lado, estudos mostraram que lipídeos da superfície celular podem inibir a fagocitose das células leveduriformes pelos macrófagos peritoneais *in vitro*, sugerindo um possível mecanismo de escape do patógeno durante a infecção fúngica (Oda et al., 1983; Carlos et al., 2003). Outro estudo demonstrou que não houve produção de NO e TNF- α por macrófagos deficientes para TLR-4 quando estimulados por esse antígeno (Sassá et al., 2009). Além disso, Negrini et al. (2012) analisando o papel do antígeno solúvel e do antígeno lipídico no processo de fagocitose do fungo *S. schenckii* observaram que ambos antígenos foram reconhecidos pelo receptor TLR-2 impedindo a ligação do fungo no início da fagocitose, prejudicando esse processo.

O ergosterol é outra molécula presente na membrana celular das leveduras, o qual pode estar relacionado à virulência desse fungo, como um mecanismo de evasão das espécies reativas do oxigênio durante a fagocitose, formando o ergosterol peróxido (Sgarbi et al., 1997). Além do ergosterol, as células leveduriformes do fungo possuem dupla camada rica em resíduos de ácido siálico, enquanto que as hifas possuem apenas uma. Estes resíduos protegem as células da fagocitose por macrófagos peritoneais em camundongos e também podem ser liberados formando agregados que interagem com os anticorpos e outros elementos do sistema imune, o que torna esse patógeno livre para proliferar e invadir os tecidos (Oda et al., 1983).

A produção de melanina, pigmentos marrom-escuros ou pretos, também parece estar relacionada a infectividade do fungo. Mesmo não sendo essenciais para sobrevivência da célula fúngica, esses pigmentos contribuem para o crescimento e desenvolvimento das espécies, auxiliando a sobrevivência e competição dos fungos no meio ambiente. Vários fungos dimórficos e patogênicos produzem melanina, como o *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitides*, *Coccidioides posadasii* e também *S. schenckii* (Taborda et al., 2008). No fungo *S. schenckii* a melanina parece proteger os conídios de danos oxidativos por radicais livres, frente a radiação UV. Além disso, a produção de melanina por esse patógeno também confere alta resistência à fagocitose pelos macrófagos (Romero-Martinez et al., 2000).

Esses entre outros antígenos existentes do fungo *S. schenckii* contribuem para a virulência do mesmo, entretanto variações genotípicas entre cepas, independentemente do estado imune do hospedeiro, podem contribuir para diferentes manifestações clínicas da doença (Zhang et al., 2011). Fernandes et al., 2009 analisaram o perfil de proteínas expressas pelo fungo *S. schenckii* verificando 13 cepas distintas de 5 regiões brasileiras (1000 a 2000 Km uma da outra) e 10 cepas de uma ou mais regiões no interior do estado de São Paulo (200 a 400 Km uma da outra) e encontraram diferenças quantitativas e qualitativas na expressão de proteínas. Esse estudo demonstra a heterogeneidade existente dentro de uma mesma espécie o que pode interferir nos seus fatores de virulência e formas de manifestação da doença.

1.3. A resposta imunológica e o fungo *S. schenckii*

As primeiras barreiras de infecção aos diferentes patógenos são a pele intacta do hospedeiro, as superfícies mucosas e os seus produtos de secreção. Elas são

defesas notáveis contra a maior parte das infecções (Lamm, 1997). Em geral, em indivíduos saudáveis, algumas infecções são causadas por microrganismos relativamente virulentos que são capazes de causar dano ou penetrar as barreiras epiteliais intactas (Marshall, 2000). Por outro lado, a maior parte das infecções de pele e mucosa em pessoas saudáveis é causada por microrganismos menos virulentos que entram na pele e mucosa através de locais lesados, como é o caso da esporotricose (Appenzeller et al., 2006). Sabe-se também que há necessidade de uma ampla variedade de respostas imunes para controlar cada tipo de microrganismo. O local da infecção e o tipo do patógeno são fatores determinantes do tipo de resposta imune a ser elaborada. Os mecanismos de resistência e suscetibilidade em infecções com *S. schenckii* ainda não são totalmente conhecidos (Carlos et al., 2009).

Os componentes do sistema imunológico são classificados em duas categorias, o sistema imune inato e o sistema imune adaptativo (Janeway & Medzhitov, 2002; Azuma, 2006). O sistema imune inato compreende os componentes que atuam na primeira linha de defesa impedindo a entrada de patógenos nos tecidos. Estes incluem as barreiras epiteliais e diversos componentes químicos de defesa, além de células fagocíticas. Componentes do sistema imune inato também ativam a resposta imune adaptativa antígeno-específica (Janeway & Medzhitov, 2002; Azuma, 2006).

Os macrófagos são células do grupo dos fagócitos mononucleares, os quais atuam como células apresentadoras de antígenos. Os precursores destas células estão presentes no sangue e são denominados de monócitos. Amplamente distribuídos pelo corpo, os macrófagos são responsáveis por numerosos processos imunológicos e inflamatórios constituindo uma defesa imediata contra elementos estranhos ao

organismo. Algumas localizações particulares destas células incluem órgãos como baço, fígado (células de Kupffer), pulmão e nódulos linfóides. Na pele são chamados de células de Langerhans, possuindo características funcionais específicas em cada local (Adams, 1979; Halliwell & Gutteridge, 1999). As principais funções dos macrófagos estão relacionadas ao processo inflamatório, ao processamento e apresentação dos antígenos, à ativação de linfócitos T e B, à capacidade fagocítica, ao processo de hematopoiese e de reparo tecidual, além da atividade citotóxica contra células tumorais e microrganismos (Wing & Remington, 1980; Cavaillon, 1994; Popov, et al., 1999; Vadivello et al., 2000; Cook et al., 2001).

A fagocitose envolve a entrada de partículas grandes, tipicamente $\geq 0,5\mu\text{m}$, inclusive células que sofreram apoptose e microrganismos (Jutras & Desjardins, 2005). Em mamíferos, a fagocitose comumente envolve receptores para porção Fc dos anticorpos e para o complemento, os quais facilitam o engolfamento das partículas opsonizadas (Swason & Hoppe, 2004). Além disso, a fagocitose pode ocorrer independentemente da presença de opsoninas, através de receptores para componentes comuns de diferentes microrganismos, por exemplo os receptores “Toll-like” (Draper et al., 2006), que serão descritos com mais detalhes nos parágrafos seguintes.

Quando a fagocitose ocorre, os macrófagos englobam partículas como bactérias, leveduras e células tumorais e, para eliminar essas partículas ingeridas, eles produzem substâncias derivadas de oxigênio e nitrogênio (Marcinkiewicz, 1997; Aderem & Underhill, 1999; Halliwell & Gutteridge, 1999).

Uma vez que os fagócitos agem como células regulatórias e efetoras do sistema imune, o aumento da função fagocítica pode ser aplicado como terapia contra infecções microbianas (Popov et al., 1999). Se uma falha nesse sistema estiver estabelecida, há maior facilidade do microrganismo se desenvolver no hospedeiro e intensificar o processo infeccioso.

É bem estabelecido que o sistema imune inato fornece sinais para a ativação do sistema imune adaptativo, que induz a diferenciação dos linfócitos em diferentes fenótipos com ações efetoras ou de memória. Os fenótipos Th1/Th2 refletem o resultado da ativação das células T (Noben-Trauth et al., 2000). Células Th1 exibem um padrão de resposta pró-inflamatória, agindo principalmente contra células cancerígenas e agentes patogênicos intracelulares. Além disso, também atuam na resposta a antígenos virais, bacterianos e fúngicos produzindo IFN- γ , IL-6, fator de necrose tumoral (TNF- α) (Lee et al., 2006). Células Th2 atuam com características anti-inflamatórias na proteção contra patógenos extracelulares e liberam as interleucinas IL-4, IL-5, IL-10 que ativam a imunidade humoral (Muthukuro et al., 2005). Esta diferenciação dos padrões de resposta imune ocorre a partir do contato dos linfócitos ditos Th precursores com o antígeno (Szabo et al., 2003).

Os mecanismos imunológicos envolvidos na prevenção e controle da esporotricose sugerem que a imunidade mediada por células Th1 apresenta um importante papel na proteção do hospedeiro contra *S. schenckii* (Carlos et al., 1992; Carlos et al., 1994, Maia et al., 2006). Em infecções experimentais, camundongos atímicos são mais suscetíveis a esporotricose e a imunidade adquirida contra *S. schenckii* é principalmente mediada por macrófagos e por células T (Tachibana et al.,

1999). O principal mecanismo de defesa contra fungos é a eliminação dos microrganismos por macrófagos, através da fagocitose e da produção de agentes tóxicos, tais como compostos intermediários reativos de nitrogênio, como o óxido nítrico (NO), um potente mediador das respostas imune e inflamatória (Carlos et al., 2003). Além disso, tem sido descrita a participação de IFN- γ neste processo de proteção, promovendo um aumento na ativação de neutrófilos e macrófagos (Romani, 2004).

Em trabalhos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa, Maia et al. (2006) avaliaram o perfil de diferenciação de linfócitos T durante a esporotricose. As células Th1 produziram IFN- γ que ativaram macrófagos promovendo a imunidade mediada por células. Além disso, houve um aumento da produção de IL-4 após a 5ª e 6ª semana de infecção sugerindo a participação da resposta padrão Th2 neste período. Em vista desses resultados, o estudo demonstrou que na esporotricose experimental, a resposta imune celular participou ao longo das 10 semanas de infecção e apresentou-se como um mecanismo dependente do óxido nítrico. A presença da resposta Th2 a partir da 5ª semana sugeriu a participação de uma resposta imune humoral nos estágios avançados do processo infeccioso.

Em 2003 foi descrito um novo fenótipo de linfócitos T designado por Th17 (Moseley et al., 2003). A diferenciação e persistência de células Th17 estão associadas à patologia observada em algumas doenças auto-imunes e infecções crônicas (Weaver et al., 2006). Estas células produzem principalmente IL-17 e estão associadas ao desenvolvimento de respostas inflamatórias e possível proteção do hospedeiro contra bactérias intracelulares e fungos (Weaver et al., 2007). A ação da IL-17 sobre os

macrófagos induz a expressão de TNF- α e IL-6. Além disso, sugere-se que o IFN- γ regule negativamente a diferenciação de células Th17, enquanto que o TGF- β estimula a expressão das mesmas (Korn et al., 2007; Lee et al., 2006).

O TGF- β é produzido, dentre outras células, pelas células Treg (FoxP3+ CD4+ CD25+), as quais representam uma subpopulação de linfócitos T importantes para manutenção do equilíbrio das respostas imunes. Essas células secretam citocinas descritas supressoras, como o TGF- β e IL-10, as quais suprimem a produção de citocinas pró-inflamatórias impedindo os danos que poderiam ser causados por uma resposta inflamatória exacerbada (Torre et al., 2002, Liu et al., 2010, Wing & Sakaguchi, 2012).

O reconhecimento de microrganismos pelo sistema imune inato é o primeiro passo para a ativação de uma resposta imunológica mais efetiva. Um dos responsáveis por essa resposta são os receptores do tipo “Toll-like receptor” (TLR), os quais fazem parte de uma família de receptores evolutivamente conservados que contém um domínio externo à membrana com seqüências ricas em leucina, particular para cada TLR (Gay & Keith, 1991; Carlos et al., 2009; Sassá et al., 2009). Foram identificadas 12 proteínas em mamíferos, sendo que para os humanos foram descritos 10 receptores até o momento (Kawai & Akira et al., 2010; Kondo et al., 2012).

De acordo com a localização na célula, na membrana ou intracelular, os TLRs podem ser divididos em dois grandes grupos de receptores. Os componentes do primeiro grupo, TLR1, 2, 4, 5 e 6, estão presentes na superfície celular reconhecendo, principalmente, estruturas lipídicas (McGettrick & O'Neill, 2010). O TLR2, por

exemplo, reconhece uma variedade de componentes microbianos incluindo lipoproteínas/lipopeptídeos de vários agentes patogênicos, ácido lipoteicoico de bactérias Gram-positivas, lipoarabinomanano de micobactérias e zimozan, um polissacarídeo presente na parede celular dos fungos (Takeda et al., 2003; Takeda & Akira, 2005). Já os componentes do segundo grupo, TLR3, 7, 8 e 9, estão presentes no compartimento intracelular e são responsáveis por reconhecer, principalmente, ácidos nucleicos (McGettrick & O'Neill, 2010).

Os TLRs são um dos principais receptores de reconhecimento padrão (PRR) envolvidos na imunidade inata. São encontrados, principalmente, nas células do sistema imunológico como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, sendo capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Akira et al., 2006). Esses PAMPs são expostos na superfície de microrganismos como vírus, bactérias, fungos e parasitas, apresentando características comuns: são expressos normalmente por microrganismos e não por células do hospedeiro, mostram pouca variação entre os microrganismos e a sua expressão é essencial para a sobrevivência destes microrganismos (Teixeira et al., 2002). São exemplos de PAMPs: lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), presentes em todas as bactérias gram-negativas, peptidoglicanos presentes em todas as bactérias gram-positivas, β -glucanas presentes na superfície de fungos (Liew et al., 2005).

Uma efetiva resposta imune depende do reconhecimento dos macrófagos aos PAMPs. Após isso, os TLRs ativados sinalizam componentes que ativam respostas imunes apropriadas necessárias para defesa do hospedeiro (Kawai & Akira, 2007; Carlos et al., 2009).

Estudos demonstram que os receptores TLR-2 e TLR-4 são cruciais para o reconhecimento de PAMPs dos fungos *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans* (Underhill et al., 1999; Meier et al., 2003; Braedel et al., 2004). Camundongos deficientes para TLR-4 apresentaram aumento na suscetibilidade à infecções por *Candida* (Netea et al., 2002). Entretanto, a ausência de TLR-2 aumentou a resistência desses animais à candidíase, fato associado à diminuição de citocinas anti-inflamatórias, mas não as pró-inflamatórias, melhorando o recrutamento de leucócitos para os sítios de infecção, bem como a diminuição do número de células T_{reg} CD4⁺ CD25⁺ (Netea et al., 2004). Netea et al. (2008) analisou ainda o papel dos receptores TLR-1 e TLR-6 no reconhecimento de *Candida albicans* e verificou o não envolvimento de TLR-1 na resposta contra esse patógeno. Em contraste, demonstrou que TLR-6 modula o balanço na produção de citocinas dos perfis Th1 e Th2, já que, camundongos TLR-6^{-/-} foram defectivos para produção de IL-10 e eficientes para a produção de IFN- γ . Além de estar envolvido no reconhecimento de células fúngicas, o TLR-2 também está presente nos mecanismos de resposta do hospedeiro a outros microrganismos como *Staphylococcus*, *Mycobacterium* e *Pneumococcus* (Krutzik et al., 2003; Koedel et al., 2003).

No trabalho realizado em nosso laboratório, Sassá et al. (2009) avaliaram a participação de TLR-4 no reconhecimento do fungo *S. schenckii* comparando camundongos deficientes de TLR-4 (C3H/HeJ) aos não deficientes (C3H/HePas). Tais resultados demonstraram que tanto mediadores pró-inflamatórios (NO e TNF- α) quanto anti-inflamatório (IL-10) estavam reduzidos nos camundongos deficientes do receptor TLR-4 sugerindo um envolvimento do mesmo no reconhecimento do

agente infeccioso. Estudos recentes mostraram que o *A. fumigatus* altera a resposta induzida por alguns TLRs, diminuindo a capacidade do seu reconhecimento pelos receptores TLR-2 e TLR-4 (Chai et.al., 2009). Além disso, sabe-se que os receptores TLR-2 e TLR-4 não estão somente envolvidos com a sinalização inflamatória, mas também na ativação de mecanismos anti-inflamatórios (Netea et al., 2003). Negrini et al. (2012), avaliando o papel do TLR-2 no processo de fagocitose do *S. schenckii*, verificaram que a ausência desse receptor proporcionou uma menor taxa de fagocitose desse patógeno e uma menor produção das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-12 e IL-10 em comparação com animais que apresentavam TLR-2. Estes resultados sugerem um novo conceito de como o sistema imune, através de TLR-2, reconhece e induz a produção de mediadores em resposta ao fungo *S. schenckii*.

Com base na literatura citada, receptores do tipo “Toll-like” desempenham um importante papel no desenvolvimento de doenças causadas por fungos, em particular *S. schenckii*. Qual o papel do receptor tipo Toll-like 2 na resposta imune do hospedeiro? Qual seria a influência desse receptor no curso da infecção induzida por esse microrganismo e de que forma respostas poderão contribuir para um maior entendimento dessas questões com ênfase no tratamento de infecções por esse fungo? A procura de respostas à essas dúvidas e outras mais específicas norteou esta pesquisa.

2. OBJETIVOS

Geral:

Verificar a influência do TLR-2 na resposta imunológica induzida pelo fungo *S. schenckii*.

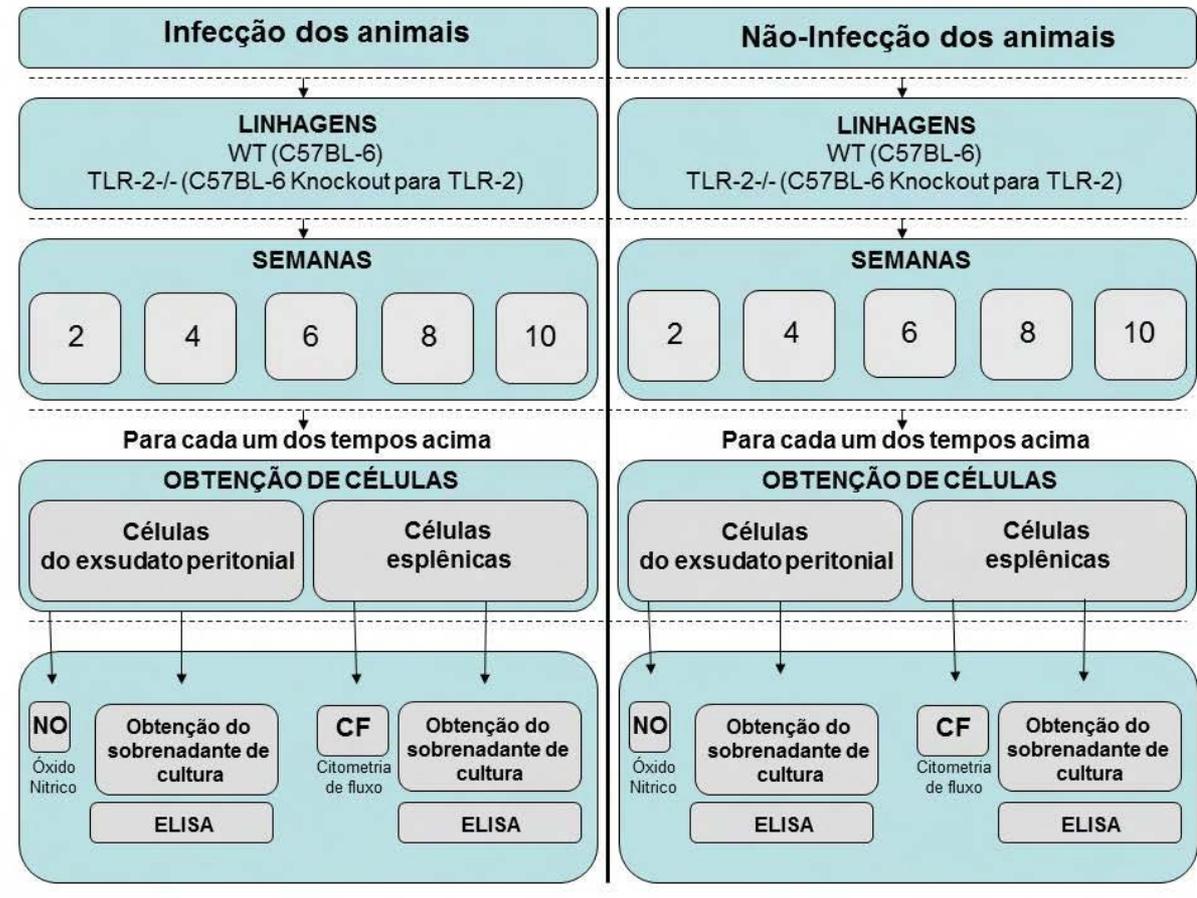
Específicos:

Durante um período de dez semanas de infecção:

- avaliar a eficácia dos antígenos lipídico, exoantígeno e solúvel, provenientes do fungo *S. schenckii*, na capacidade de estimular a produção de mediadores imunológicos;
- avaliar a influência do receptor TLR-2 na produção das citocinas IL-1 β , IL-12 e TNF- α por macrófagos;
- analisar a estimulação dos macrófagos através da liberação de NO;
- verificar a participação do receptor TLR-2 na geração dos perfis celulares Th1, Th2 e Th17;
- avaliar a influência do receptor TLR-2 na produção das citocinas: Th1 (IFN- γ , IL-6), Th2 (IL-10, IL-4), Th17 (IL-17) e Treg (TGF- β).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental



3.2. Microrganismo

No presente projeto foi utilizada amostra do fungo *S. schenckii*, isolado clínico 1099-18, proveniente de um caso de esporotricose humana na seção de Micologia do Departamento de Dermatologia da Columbia University, New York, NY, EUA. Essa cepa foi gentilmente cedida pela Dra. Celuta Sales Alviano do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

3.3. Cultivo do fungo *S. schenckii*

Isolados fúngicos foram semeados em meio ágar dextrose Sabouraud (Difco) para que fosse obtido o tapete de células fúngicas na forma miceliar em temperatura ambiente. Esse tapete foi removido e imerso em meio BHI caldo (Brain Heart Infusion, Difco) para a obtenção do fungo na forma de levedura. Para isso, o fungo foi cultivado à 37°C por 20 dias em BHI caldo (Difco) com constante agitação 150 ciclos/min (Carlos et al., 2003). Uma alíquota desta cultura foi centrifugada (Centrífuga Fanem, INd. Bras.) a 700g por 10 min (Figura 1) e o *pellet* obtido foi ressuspendido em 1mL de PBS para a contagem em câmara de Neubauer (Boeco, Germany) e ajuste do número de células que foram utilizadas para a infecção dos animais (Item 3.6).

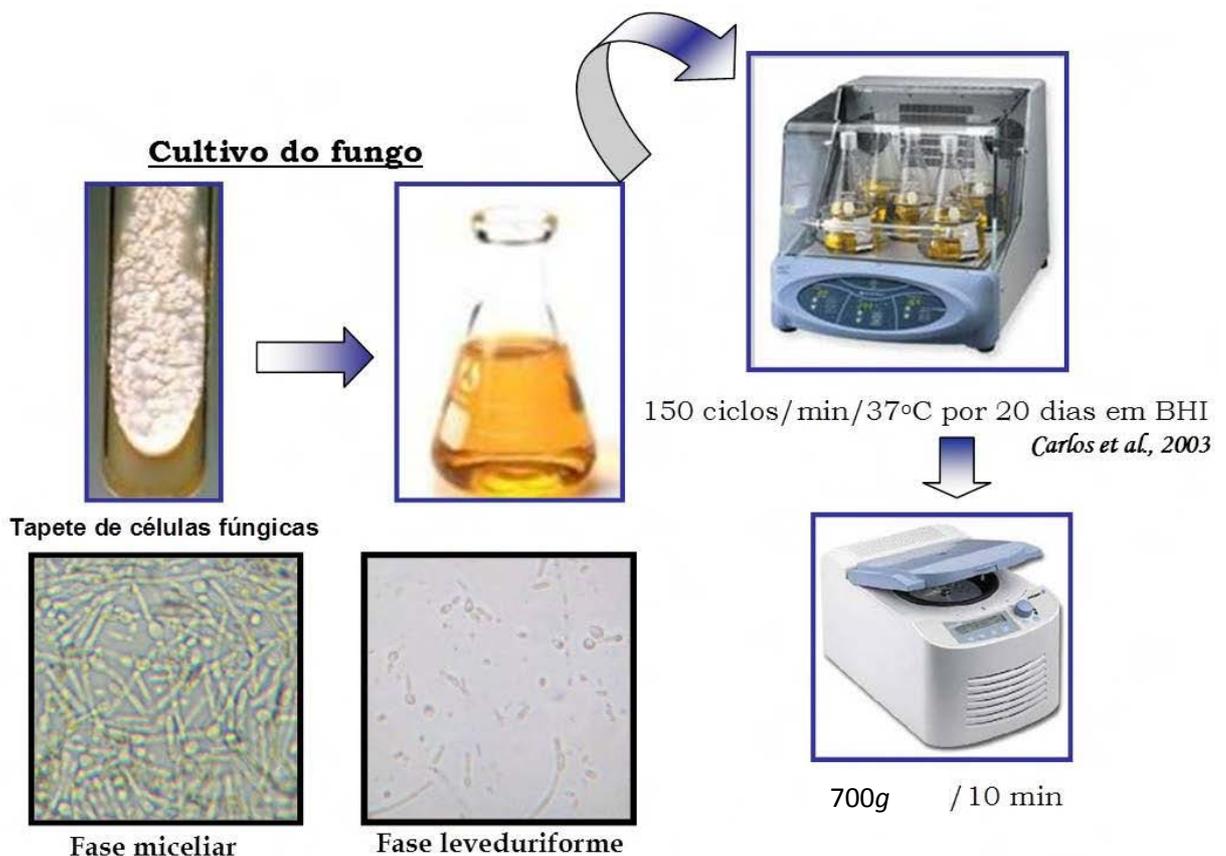


Figura 1. Método de cultivo do fungo *Sporothrix schenckii*

3.4. Obtenção dos antígenos do fungo *S. schenckii*

3.4.1. Exoantígeno

A obtenção do exoantígeno do fungo foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Carlos et al. (2003). O fungo cultivado em meio BHI líquido, com agitação constante de 150 ciclos/minuto a 37°C, foi submetido à radiação ultravioleta (UV) por uma hora. Essa suspensão celular foi mantida por 24 h a 37°C e, novamente submetida à radiação UV por mais uma hora. Em seguida, acrescentou-se timerosal na concentração final de 1/5000 e a suspensão celular foi congelada a -20°C por 48 h. Após esse período, foi realizado teste de esterilidade em Ágar Dextrose Sabouraud (Difco). A suspensão celular obtida foi centrifugada e o sobrenadante filtrado. O filtrado obtido foi concentrado 50 a 100 vezes em polietilenoglicol 2000 (Fluka). A dosagem de proteínas no exoantígeno obtido foi feita pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951). Para a realização dos testes, o exoantígeno foi utilizado na concentração de 60,8 µg/mL.

3.4.2. Antígeno solúvel

O antígeno solúvel foi extraído a partir de 300 mg da linhagem 1099-18 liofilizada, onde foram adicionados 10 mL de PBS (pH 7,4). A solução foi sonicada por 20 minutos, sendo 10 sonicações a 50 W com intervalos de 2 minutos, usando o MSE-Ultrasonic Disintegrator (Londres). A suspensão celular foi centrifugada por 1 hora a 700g em centrífuga refrigerada modelo J2-13 a 5°C. O sobrenadante foi separado e esterilizado através de filtro Millipore 0,22µm e a concentração protéica foi dosada pelo método de Lowry (57,2 µg/mL) (Carlos et al., 1992).

3.4.3. Antígeno lipídico

Os lipídeos foram extraídos a partir da massa de células obtidas por centrifugação da cultura do fungo na forma leveduriforme 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) e C:M:H₂O (C:M:H) (4:8:3, v/v) e concentrados até a secura a vácuo (Carlos et al., 1999). A concentração utilizada nos experimentos foi de 57,6 µg/mL.

3.5. Animais

Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 "Wild type" (WT) e C57BL/6 TLR-2 "Knockout" (TLR-2^{-/-}), com peso médio de 20-25 gramas e idade entre 6 e 8 semanas, provenientes do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FAMERP-USP). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas em ambiente com temperatura (21±1°C), umidade (65-75%) e ciclos de luz (12h claro-12h escuro) controlados. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário de Araraquara – UNIARA (#940/2009) e foi realizado de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.6. Infecção dos animais

Após o cultivo do fungo como descrito no item 3.3, a suspensão celular foi ajustada à concentração de 10⁹ células/ml e, cada animal foi inoculado intraperitonealmente com 0,1mL desta suspensão contendo 10⁸ células

leveduriformes (Figura 2). Os animais infectados, juntamente com os animais não infectados, inoculados com 0,1mL de PBS (grupo controle), foram eutanasiados na 2^a, 4^a, 6^a, 8^a e 10^a semanas de infecção para a realização dos experimentos.

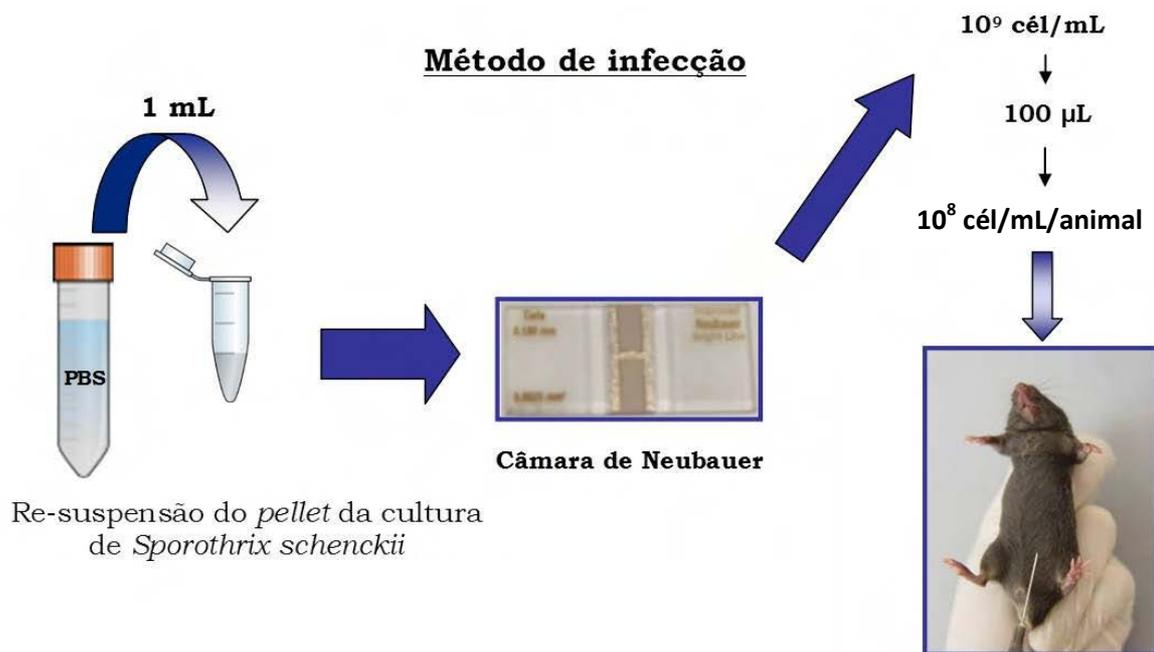


Figura 2. Método de infecção pelo fungo *Sporothrix schenckii*.

3.7. Obtenção dos macrófagos peritoneais e condições de cultura

Os camundongos WT e TLR-2^{-/-}, nos diferentes períodos de infecção e os não infectados, foram previamente estimulados pela inoculação intraperitoneal de 3 mL de tioglicolato de sódio (DIFCO Lab. LTDA) a 3% (Figura 3). Após 3 dias, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e, para remoção dos macrófagos, foi realizada a exposição da cavidade peritoneal desses animais com o auxílio de pinças dente de rato e injeção intraperitoneal de 5ml de PBS (pH7,2) gelado e estéril para a realização de massagem leve da cavidade (Figura 4). O líquido resultante foi coletado e centrifugado a 700g durante 5 min (Centrífuga Fanem, Ind. Bras.). O sedimento

celular foi lavado três vezes com 3mL de PBS. Após a última lavagem, as células foram ressuspendidas em 1mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma) contendo 2 β -mercaptoetanol (Sigma) a 2×10^{-5} M, penicilina 100U/mL (Sigma), estreptomicina 100U/mL (Sigma), L-glutamina 2mM (Sigma) e 5% de soro fetal bovino (Cultilab) (RPMI-1640C) para a contagem de células. O número de células foi determinado pela contagem em câmara de Neubauer (Boeco, Germany) e a suspensão celular ajustada à concentração adequada à realização dos testes propostos.

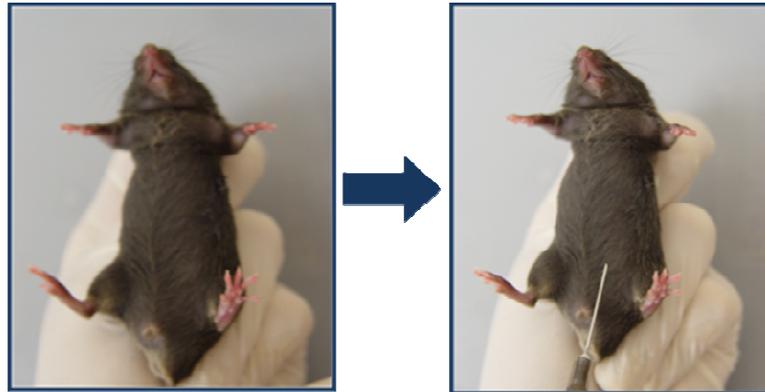


Figura 3. Procedimento de inoculação de 3ml de tioglicolato de sódio (3%) na cavidade peritoneal dos camundongos.



Figura 4. Etapas da coleta de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 previamente inoculados com solução de tioglicolato de sódio a 3%. **A e B** Exposição da cavidade peritoneal. **C.** Inoculação de 5ml de PBS gelado. **D.** Massagem da cavidade peritoneal. **E.** Aspiração do líquido intraperitoneal contendo macrófagos peritoneais.

3.8. Obtenção dos sobrenadantes das culturas das células peritoneais

As células peritoneais obtidas, como descrito no item 3.7, foram ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL em meio RPMI-1640-C e distribuídas em placas de cultura de tecidos de 24 cavidades (Corning, Inc.). A cada cavidade foi adicionado 1mL da suspensão celular e as placas foram incubadas a 37°C por 60 min em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂. Após esta incubação, as células não aderentes foram retiradas por lavagens com o meio de cultura RPMI-1640C. Aos macrófagos que ficaram aderidos à placa foi adicionado volume igual ao inicial de RPMI-1640C e ainda acrescentados os antígenos do fungo nas concentrações propostas acima (itens 3.6.1, 3.6.2 e 3.6.3) ou LPS a 10 µg/mL como controle positivo ou somente RPMI-1640C como controle de células. Essas placas foram novamente incubadas a 37°C em estufa com tensão constante de 5% de CO₂ por mais 24h. Após

esta incubação, os sobrenadantes foram centrifugados em centrífuga refrigerada (Hettich, Inc.) a 4°C durante 10 min a 700g. Em seguida, foram coletados, aliquotados e estocados em freezer a -80°C até o momento da determinação das citocinas IL-1 β , IL-12 e TNF- α através do teste imunoenzimático ELISA de captura para cada citocina. Para isso foi utilizado o Kit DuoSet, R&D Systems de acordo com as instruções dos fabricantes.

3.9. Determinação da produção de óxido nítrico (NO)

O NO foi quantificado por espectrofotômetro para avaliar o acúmulo de nitrito no sobrenadante da cultura celular através da reação de diazotação com o reagente de Griess (composto de 1g de sulfanamida (Merck), 0,1g de dicloro N (1-naftil) etilenodiamina (Merck), 2,5 mL de ácido ortofosfórico (Mallinckrodt Chemical) e água deionizada q.s.p. 100 mL), conforme descrito por Green et al., 1982. Alíquotas de 50 μ L dos sobrenadantes das culturas celulares do exsudato peritoneal, foram transferidas para uma placa de cultura de células, não estéril, contendo 96 cavidades de fundo planas (Corning, Inc.) e acrescidas de igual volume de reagente de Griess. Após 10 min de incubação, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a absorbância foi determinada em UV/visível com filtro de 540nm em espectrofotômetro (Microplate Reader, Multiskan Ascent, Labsystems). As concentrações de NO liberado nos sobrenadantes das culturas celulares foram calculadas a partir de uma curva padrão, previamente estabelecida, com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio e os valores foram expressos em μ mol de nitrito/ 5×10^6 células.

3.10. Extração e pesagem do baço dos camundongos WT e TLR-2^{-/-} infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii*

Os camundongos WT e TLR-2^{-/-}, nos diferentes períodos de infecção e os não infectados, foram sacrificados em câmara de CO₂ e, para remoção do baço, foi realizada a exposição da cavidade peritoneal desses animais com o auxílio de pinças dente de rato. Após a extração do órgão, estes foram pesados em balança analítica (Boeco, Germany).

3.11. Obtenção das células do baço

Os camundongos dos grupos dos animais infectados e não infectados, foram sacrificados em câmara de CO₂ e os baços foram retirados em condições assépticas e macerados, com auxílio de uma pinça reta, em uma placa de Petri estéril (Corning, Inc.) contendo 2 mL de RPMI-1640-C. A suspensão obtida foi aspirada por seringa de 3 mL e agulha 25 x 7,0 mm para obtenção de uma suspensão celular homogênea. Após este procedimento a suspensão foi transferida para um tubo Falcon de 15 mL (Corning, Inc.) e, à mesma, foram inseridos 8 mL de uma solução de cloreto de amônio 0,83% e soro fetal (3:1). Em seguida, foi realizada centrifugação à 4°C por 5min para que ocorresse a lise das hemácias. Após isso, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 3mL RPMI-1640C e novamente centrifugadas por 5 min. Após esse período, as células foram ressuspendidas em 1 mL de RPMI-1640-C para contagem do número de células viáveis em câmara de Neubauer (Boeco, Germany) pela técnica de exclusão com Azul de Trypan e a

suspensão celular foi ajustada à concentração de 5×10^6 células para a determinação de citocinas.

3.12. Obtenção dos sobrenadantes das culturas das células do baço

A suspensão celular contendo as células do baço foi ajustada a 5×10^6 células/mL, obtidas como descrito no item anterior, e distribuída placas de cultura de tecidos de 24 cavidades (Corning, Inc.), 1mL por cavidade na qual foram acrescentados o estímulo (antígenos do fungo *S. schenckii*) ou Concanavalina A (ConA) na concentração de $0,5 \mu\text{g} / \text{mL}$, usada como controle positivo, ou somente meio de cultura (RPMI-1640C) nos controles de células. As placas foram incubadas a 37°C em estufa contendo tensão constante de 5% de CO_2 (Forma Scientific) por 24 h. Após esta incubação, os sobrenadantes foram coletados e centrifugados a 4°C durante 10 min a 700g, aliquotados e estocados a -80°C para posterior dosagem das citocinas Th1 (IFN- γ , IL-6), Th2 (IL-4, IL-10), Th17 (IL-17) e Treg (TGF- β) por ELISA. Para isso, foi utilizado o Kit DuoSet, R&D Systems de acordo com as instruções dos fabricantes.

3.13. Análise fenotípica dos linfócitos do baço por citometria de fluxo

Os camundongos dos grupos dos infectados e não infectados, foram sacrificados em câmara de CO_2 e os baços foram retirados em condições assépticas e macerados, com auxílio de uma pinça reta, em uma placa de Petri estéril (Corning, Inc.) contendo 2 mL de RPMI-1640-C. Para cada animal foi preparada uma suspensão contendo 2×10^6 células/mL em meio RPMI-1640C. Após esse procedimento, $500 \mu\text{L}$

dessa suspensão foram distribuídos em tubos para citometria e centrifugada a 700g por 5 min. Em seguida, foi realizado o descarte do sobrenadante e ressuspensão do pellet em 500µL de uma solução de PBS contendo 1% de BSA. Foram adicionados, a cada tudo, 1µL de solução *Mouse FcBlockTM* (BD PharMingen). Após incubação de 20 min a 4°C, foi iniciada a marcação dos antígenos CD3, CD4, CD8 e CD25. Para isso, as células foram incubadas por 30 min a 4°C com quantidades saturantes dos anticorpos conjugados com respectivos fluorocromos da seguinte forma: anti-CD3 conjugado à ficoeritrina (PE), anti CD-4 conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC), anti-CD8 conjugado à alofocianina (APC), anti CD-25 conjugado à APC. Todos os anticorpos foram adquiridos da BD PharMingen, San Diego, EUA. Ao término desta incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS contendo 1% de BSA (700g/5min), ressuspendidas em 500µL de PBS contendo 1% de BSA, armazenadas na ausência de luz à 4°C para posterior leitura em citômetro de fluxo.

Para determinação intracelular de FoxP3 as células foram tratadas com tampão Perm-Wash (BD PharMingen) para alterar a permeabilidade da membrana possibilitando a marcação intracitoplasmática pelo anticorpo anti-FoxP3 conjugado à PE. Para isso, após as células terem sido centrifugadas a 700g por 5 min foi realizado o descarte do sobrenadante, ressuspensão do pellet em 500µL de uma solução de PBS contendo 1% de BSA e nova centrifugação a 700g por 5 min . Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em solução CytoFix/CytoPerm (BD PharMingen), a fim de proporcionar-se a fixação celular. Após uma incubação de 20 min a 4°C ao abrigo da luz, as células foram lavadas com 500µL de tampão Perm Wash. Posteriormente, foi realizada nova centrifugação ressuspensão em 100

μ L de Perm Wash e então foram adicionados o anticorpo específico anti-FoxP3 ou o anticorpo isotipo-controle. Seguiu-se nova incubação a 4°C e ao abrigo da luz por um período de 30 minutos. Por fim, as células foram lavadas com 500 μ L de Perm Wash, ressuspensas em 500 μ L de PBS com 1% de BSA e mantidas a 4°C ao abrigo da luz até o momento da análise em citômetro de fluxo. A marcação celular foi verificada em citômetro de fluxo FACSCanto (Becton & Dickinson, San Diego, CA, USA) e para análise dos dados foi utilizado o programa FACSDiva (Becton & Dickinson) (Morita et al., 1998, Netea et al., 2004). Os linfócitos foram especificamente analisados baseado-se nos parâmetros de tamanho e granulosidade celular. Os anticorpos isotipo-específicos, marcados com os mesmos fluorocromos, foram utilizados como controles (isotipo controle). Trinta mil eventos por tubo foram adquiridos em citômetro e analisados pelo programa FACSDiva.

3.14. Análise dos resultados

A análise estatística foi realizada por intermédio do programa estatístico InStat version 3.0 for Windows (GraphPad Software, Inc. San Diego- USA) adotando-se análise de variância com determinação do nível de significância para $p < 0,05$, por meio de comparações múltiplas (teste de Tukey). Todos os experimentos foram realizados utilizando-se 5 animais por semana de infecção e cada determinação foi realizada em duplicata.

4. RESULTADOS

4.1. Determinação da produção de IL-1 β , IL-12 e TNF- α por macrófagos peritoneais

A produção das citocinas IL-1 β , IL-12 e TNF- α foi quantificada no sobrenadante das culturas de macrófagos peritoneais dos camundongos WT e TLR-2^{-/-} nos diferentes períodos de infecção com o fungo *S. schenckii* e do grupo controle, na presença dos antígenos do fungo EXO, LIP e AS, do LPS (como controle positivo) ou somente do meio RPMI-1640C (como controle negativo). Os resultados foram calculados através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas das citocinas determinadas.

A Figura 5 apresenta a produção da citocina IL-1 β nos sobrenadantes das culturas de células do exsudato peritoneal dos animais WT e TLR-2^{-/-}. De um modo geral verificou-se uma maior produção nos animais infectados quando comparados aos não infectados, principalmente na 2^a semana de infecção (Figura 6A e 6B). Interessantemente, foi verificado na 4^a semana uma diminuição na produção desse mediador.

Quando foi observado o curso da infecção, pôde-se destacar maiores níveis desta citocina na 2^a e 6^a semanas de infecção, com maior produção para a 2^a semana quando comparada a 6^a ($p < 0,001$), tanto para o LPS quanto para os antígenos testados. Comparando-se as médias de produção na 2^a e 6^a semanas, pôde-se verificar que a produção de IL-1 β pelo EXO (206,49 pg/mL e 155 pg/mL, respectivamente) foi em torno da metade do valor apresentado pelo LIP (388,44 pg/mL e 344,53 pg/mL, respectivamente) (Figura 5B). Na 8^a e 10^a semanas, notou-se

um declínio da produção quando as células foram estimuladas com todos os antígenos testados.

Em relação à presença desta citocina no sobrenadante das culturas tanto dos animais TLR-2^{-/-} infectados quanto não infectados, não foi observada produção em nenhuma das condições testadas (Figura 5C e 5D).

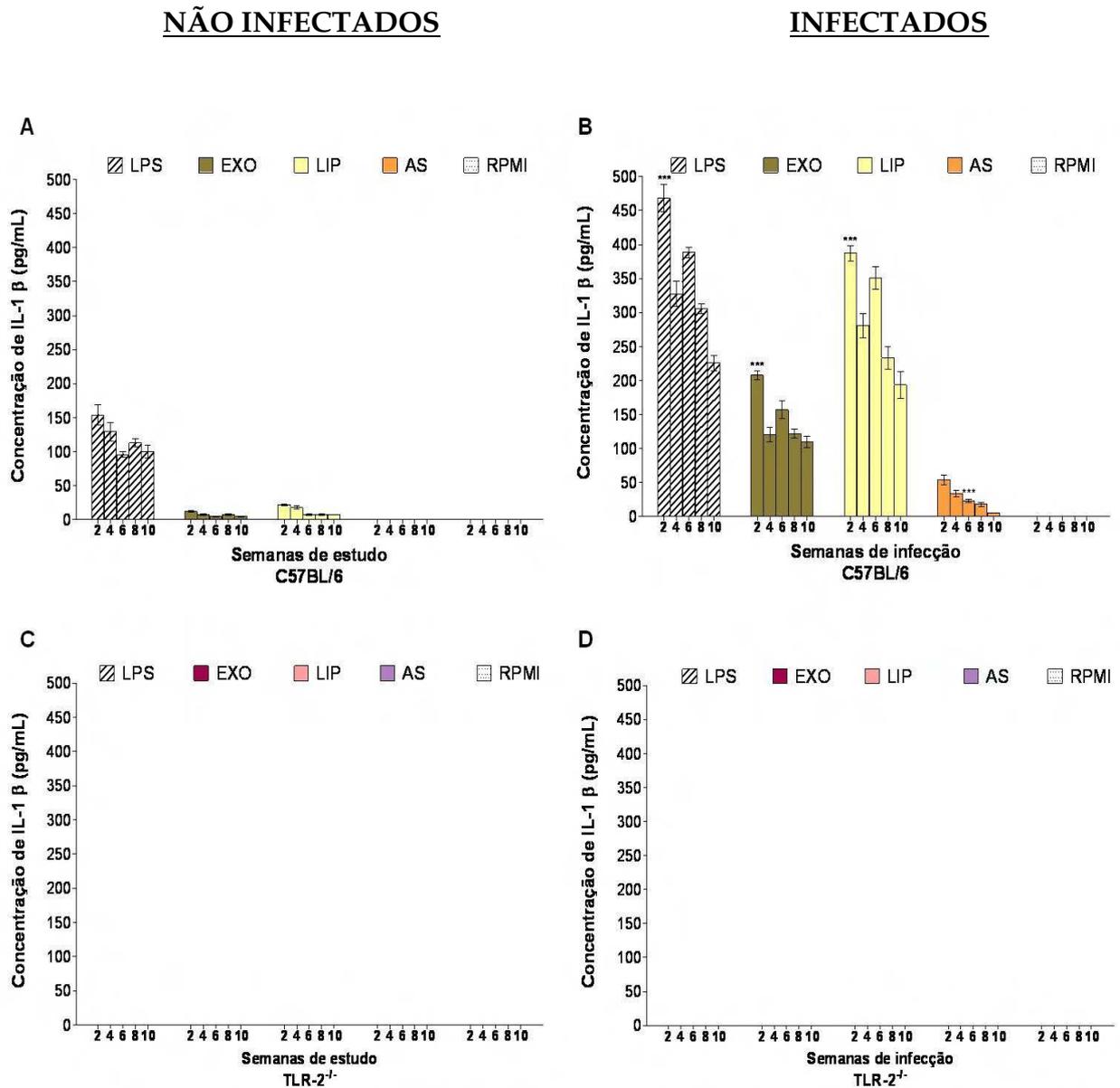


Figura 5. Concentração de IL-1 β liberada nos sobrenadantes de cultura dos macrófagos peritoneais de camundongos WT não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* e TLR-2^{-/-} não infectados (C) ou infectados (D) com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas. Os macrófagos peritoneais dos camundongos infectados e não infectados foram cultivados na presença de LPS, exoantígeno (EXO), antígenos lipídico (LIP), antígenos solúvel (AS) e somente meio RPMI-1640C. As concentrações de IL-1 β foram calculadas por meio de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IL-1 β . Os resultados foram expressos em pg/mL e são representativos de dois experimentos independentes. As colunas representam as médias \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção, ***p<0,001 detalhada no texto.

A produção de IL-12 (Figura 6) demonstrou um perfil semelhante ao da IL-1 β . Na análise dos animais WT não infectados foi observado que não houve produção de IL-12 nos sobrenadantes das culturas de células frente aos antígenos do fungo durante todo o período experimental, verificando-se mínima produção deste mediador pelo LPS (Figura 6A). Nos animais WT infectados com o fungo *S. schenckii* foi observado que houve produção de IL-12 estatisticamente significativa por macrófagos peritoneais frente aos antígenos LIP e EXO quando comparados ao controle negativo ($p < 0,001$; $p < 0,01$, respectivamente) durante todo o período experimental e, além disso, na 6^a semana em que foi verificado o pico de produção desse mediador por esses antígenos, o LIP apresentou-se como um potente indutor quando comparado ao EXO ($p < 0,001$) (Figura 6B). Em relação à presença desta citocina nos sobrenadantes das culturas tanto dos animais TLR-2^{-/-} infectados quanto não infectados, não foi observada produção em nenhuma das condições testadas (Figura 6C e 6D).

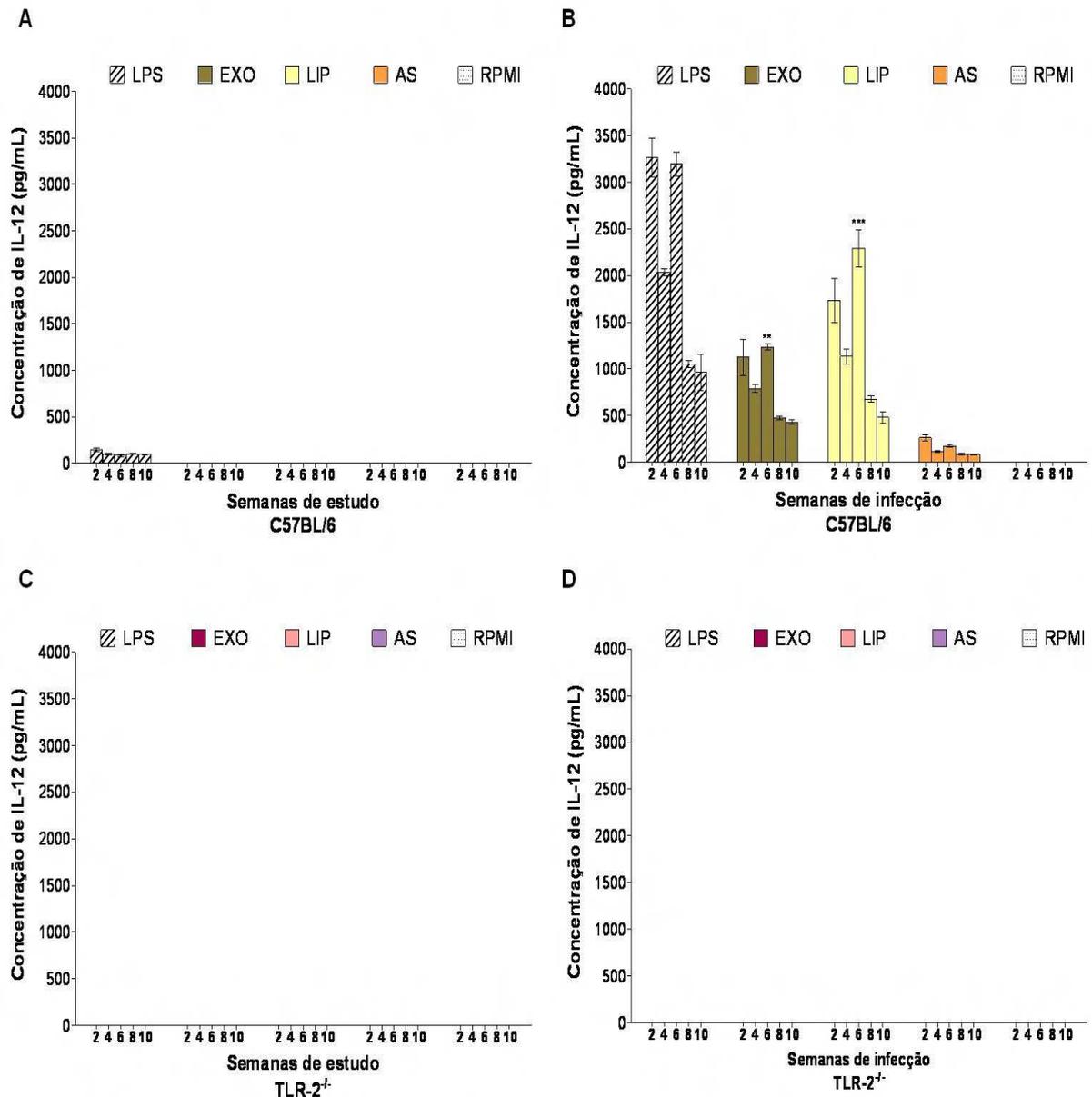
NÃO INFECTADOSINFECTADOS

Figura 6. Concentração de IL-12 liberada nos sobrenadantes de cultura dos macrófagos peritoneais de camundongos WT não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* e TLR-2^{-/-} não infectados (C) ou infectados (D) com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas. Os macrófagos peritoneais dos camundongos infectados e não infectados foram cultivados na presença de LPS, exoantígeno (EXO), antígenos lipídico (LIP), antígenos solúvel (AS) e somente meio RPMI-1640C. As concentrações de IL-12 foram calculadas por meio de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IL-12. Os resultados foram expressos em pg/mL e são representativos de dois experimentos independentes. As colunas representam as médias \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção, **p<0,01, ***p<0,001 detalhadas no texto.

A Figura 7 permite a observação de que o LIP é um potente indutor de TNF- α tanto quanto o LPS, não havendo diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) desse estímulo em relação ao LPS (Figura 8B). De um modo geral, a maior produção de TNF- α foi observada na 2ª semana em todas as condições testadas, ou seja, na fase inicial da infecção tanto para os animais WT infectados quanto para os não infectados (Figura 7A e 7B). Comparando-se o perfil de produção do antígeno LIP em relação ao EXO, tornou-se claro o potencial efeito desse antígeno, já que, estimulou o dobro da produção de TNF- α em relação ao EXO, 7165,61 pg/mL e 3268,93 pg/mL, respectivamente ($p < 0,001$) (Figura 8B).

Em relação a presença desta citocina no sobrenadante das culturas tanto dos animais TLR-2^{-/-} infectados quanto não infectados, não foi observada produção em nenhuma das condições testadas (Figura 7C e 7D). Esse mesmo perfil foi encontrado na produção das citocinas IL-1 β e IL-12.

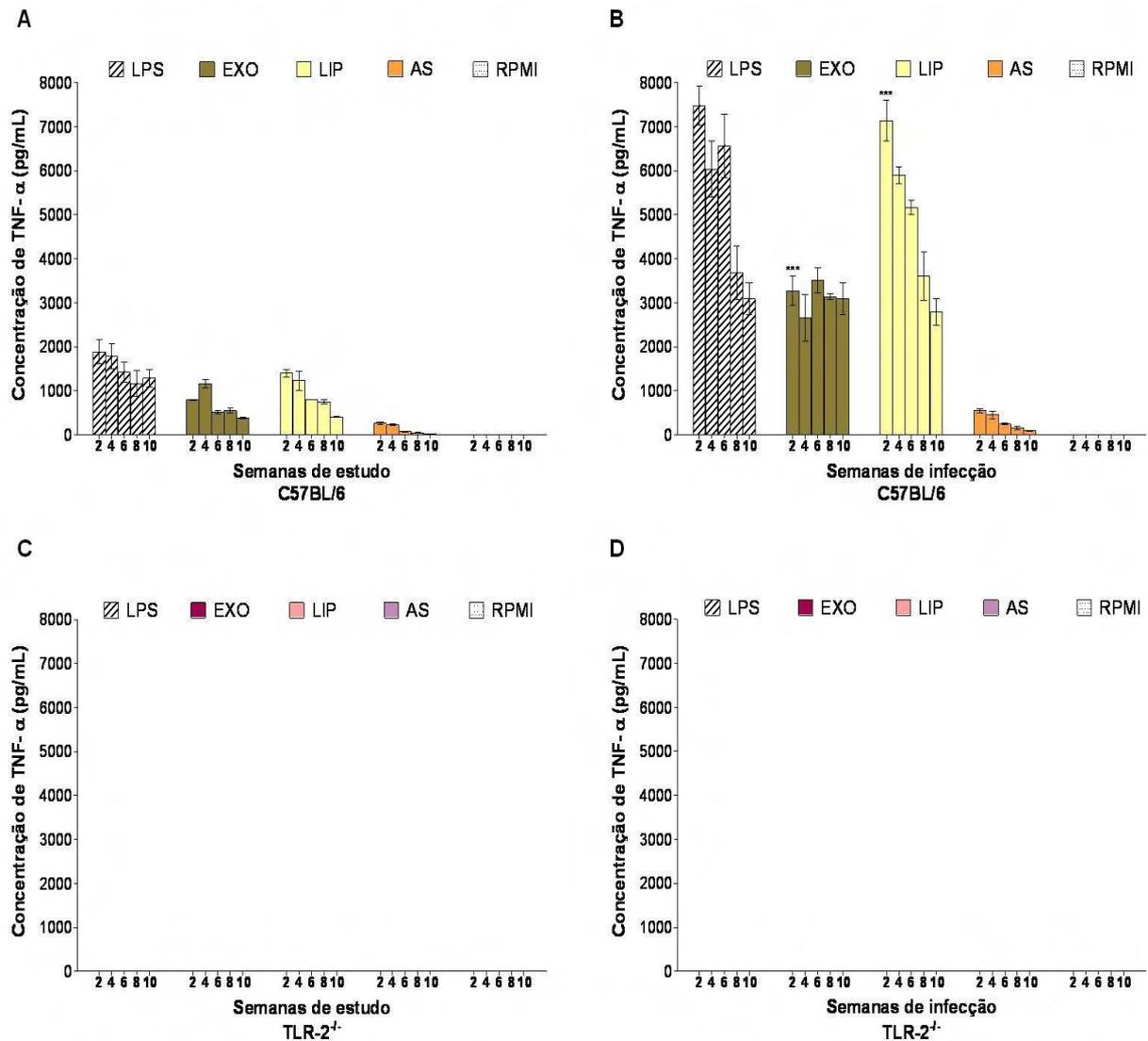
NÃO INFECTADOSINFECTADOS

Figura 7. Concentração de TNF- α liberada nos sobrenadantes de cultura dos macrófagos peritoneais de camundongos WT não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* e TLR-2^{-/-} não infectados (C) ou infectados (D) com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas. Os macrófagos peritoneais dos camundongos infectados e não infectados foram cultivados na presença de LPS, exoantígeno (EXO), antígenos lipídico (LIP), antígenos solúvel (AS) e somente meio RPMI-1640C. As concentrações de TNF- α foram calculadas por meio de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de TNF- α . Os resultados foram expressos em pg/mL e são representativos de dois experimentos independentes. As colunas representam as médias \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção, ***p<0,001 detalhada no texto.

4.2. Determinação da produção de óxido nítrico (NO)

A quantificação de NO foi realizada nos sobrenadantes das culturas de células do exsudato peritoneal dos camudongos WT e TLR-2^{-/-} em diferentes períodos de infecção com o fungo *S. schenckii* e do grupo controle frente todas as condições testadas.

As células dos animais WT não infectados não produziram quantidades significativas de NO quando cultivadas com os antígenos do fungo independente do período experimental avaliado (Figura 8A). Entretanto, conforme esperado, o LPS induziu a produção deste mediador em todas as semanas do estudo (Figura 8A). Em relação ao grupo de animais infectados nesta mesma linhagem, foi observado que houve produção ascendente da 2^a a 6^a semanas e acentuada queda na fase tardia (8^a e 10^a semanas). Comparando-se o pico de produção pelos antígenos LIP e EXO, maior produção foi verificada para o primeiro em relação ao último ($p < 0,001$). Quando as células foram cultivadas em presença de LPS, o pico de liberação também ocorreu na 6^a semana ($p < 0,001$) quando comparada a produção frente a qualquer dos estímulos testados (Figura 8B). Em relação à presença deste mediador no sobrenadante das culturas tanto dos animais TLR-2^{-/-} infectados quanto não infectados, não foi observada produção em nenhuma das condições testadas (Figura 8C e 8D).

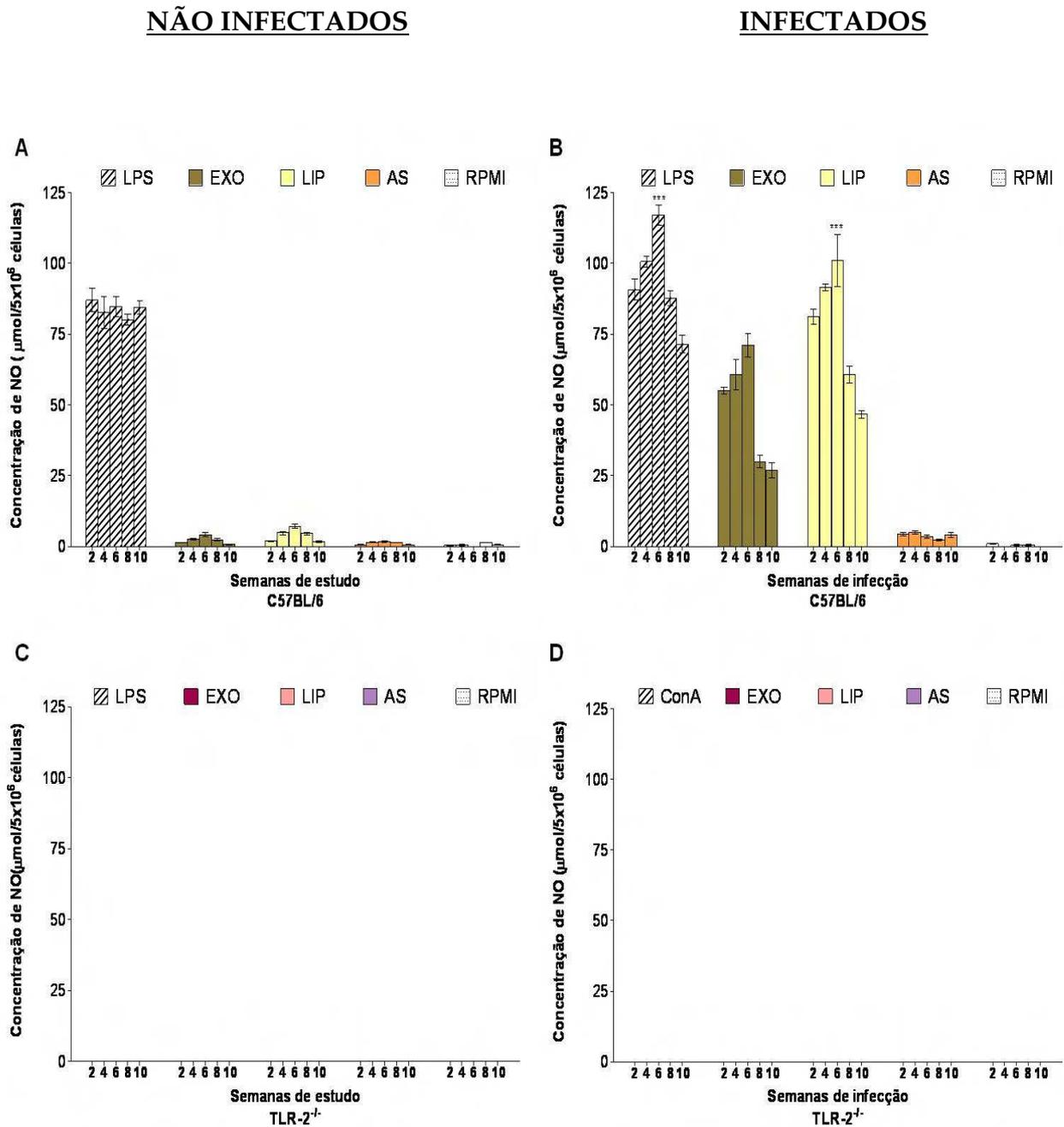


Figura 8. Produção de NO em cultura dos macrófagos peritoneais de camundongos WT não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* e TLR-2^{-/-} não infectados (C) ou infectados (D) com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas. Os macrófagos peritoneais dos camundongos infectados e não infectados foram cultivados na presença de LPS, exoantígeno (EXO), antígenos lipídico (LIP), antígenos solúvel (AS) e somente meio RPMI-1640C. As concentrações de nitrito foram obtidas por meio de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio (NaNO₂). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol}/5 \times 10^6$ células e são representativos de dois experimentos independentes. As colunas representam as médias \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção, *** $p < 0,001$ detalhada no texto.

4.3. Verificação do peso do baço dos camundongos WT e TLR-2^{-/-} infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii*

A pesagem do baço foi realizada para avaliação das possíveis alterações durante o curso da infecção. Os animais infectados apresentaram aumento de peso do órgão quando comparados aos animais não infectados, em ambas as linhagens (Figura 9). As diferenças de peso mais notáveis foram verificadas principalmente na 4^a, 6^a e 8^a semanas de infecção ao ser realizada a comparação entre o peso baço dos animais infectados aos não infectados dentro da mesma linhagem (**p<0,001 para ambas as linhagens).

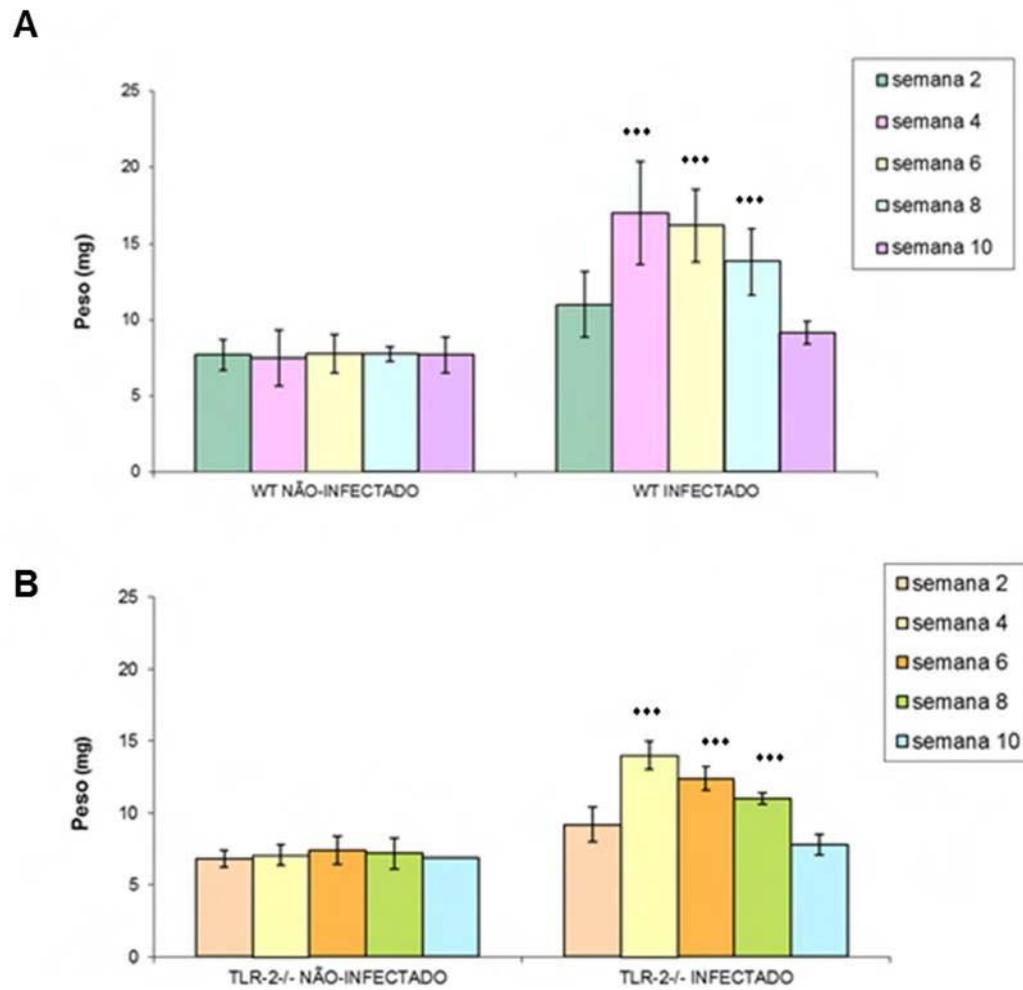


Figura 9. Peso do baço de camundongos WT (A) e TLR-2^{-/-} (B) não infectados ou infectados com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas. Os resultados foram expressos em mg e são representativos de dois experimentos independentes. As colunas representam as médias \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção, obtidas de dois experimentos independentes, *** $p < 0,001$ ao se comparar o peso do baço dos animais infectados aos não infectados dentro da mesma linhagem.

4.4. Determinação da produção de IFN- γ , IL-6, IL-4, IL-10, IL-17 e TGF- β pelas células do baço

A produção de IFN- γ , IL-6, IL-4, IL-10, IL-17 e TGF- β foi quantificada no sobrenadante das culturas das células do baço dos camundongos WT e TLR-2^{-/-} nos diferentes períodos de infecção com o fungo *S. schenckii* e do grupo controle, na presença dos antígenos do fungo EXO, LIP e AS, da Concanavalina A (Con A) (como controle positivo) ou somente do meio RPMI-1640C (como controle negativo). Os resultados foram calculados através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas das determinadas citocinas.

Na análise da produção de IFN- γ observou-se a 6^a semana destacando-se na produção desse mediador, assim como ocorreu com o perfil da IL-12 e com a produção de NO. Avaliando-se os animais WT não infectados foi observado que não houve produção desse mediador nos sobrenadantes das células frente aos antígenos do fungo durante todo o período experimental, verificando-se mínima produção deste mediador pela ConA na 2^a, 4^a e 6^a semanas (Figura 10A). No grupo dos animais WT infectados tanto para a ConA quanto para os antígenos verificou-se um perfil ascendente de produção de IFN- γ até a 6^a semana em que houve pico da produção, sendo que não se verificou diferença estatisticamente significativa nessa semana de análise entre ConA e LIP ($p > 0,05$), somente de ambos em relação ao EXO ($p < 0,01$) (Figura 10B).

Em relação à presença desta citocina no sobrenadante das culturas tanto dos animais TLR-2^{-/-} infectados quanto não infectados, não foi observada produção em nenhuma das condições testadas (Figura 10C e 10D). Esse mesmo perfil foi

encontrado na produção das citocinas produzidas por macrófagos (IL-1 β , IL-12 e TNF- α).

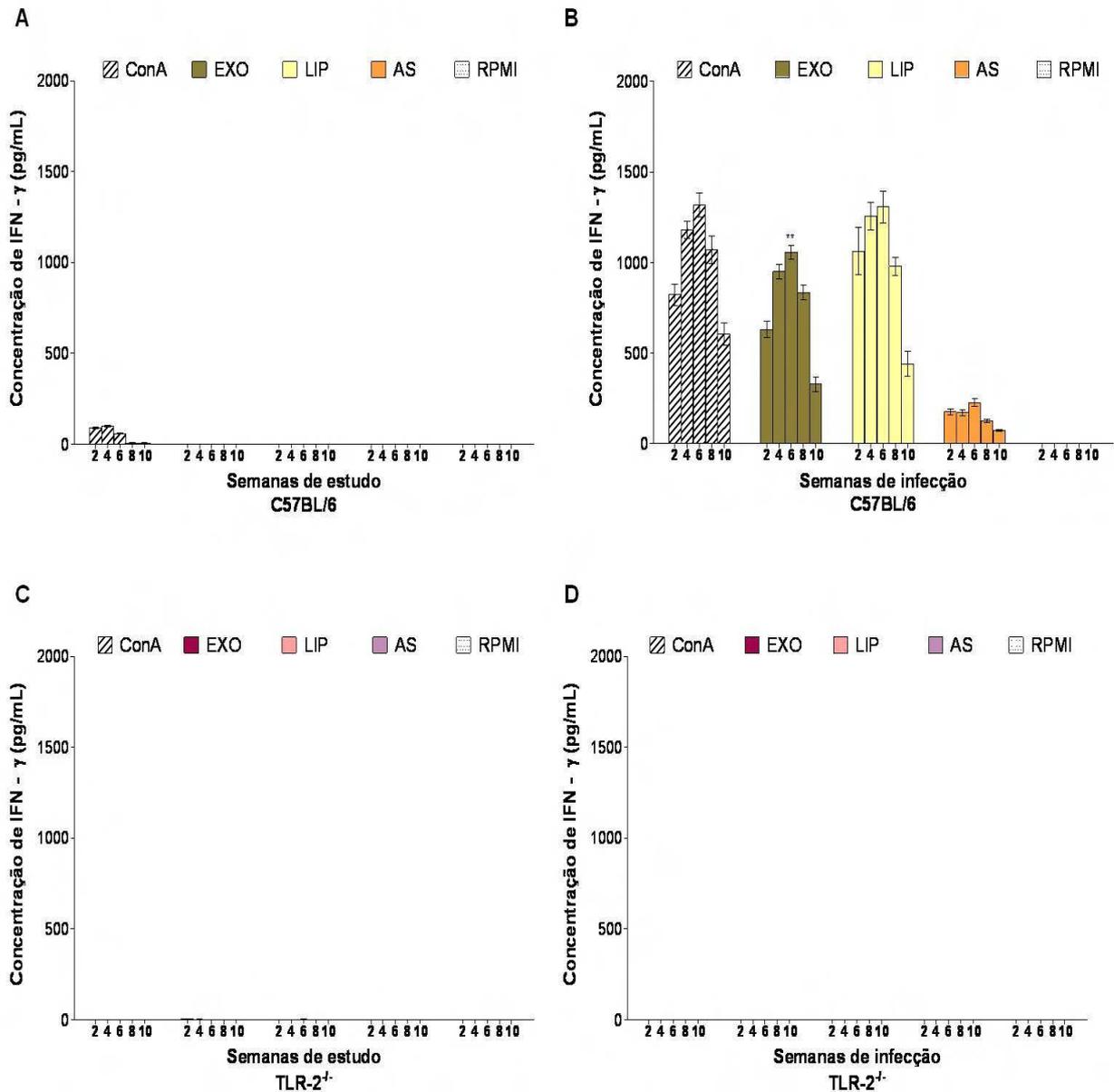
NÃO INFECTADOSINFECTADOS

Figura 10. Concentração de IFN- γ liberada nos sobrenadantes de cultura das células do baço de camundongos WT não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* e TLR-2^{-/-} não infectados (C) ou infectados (D) com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas. As células do baço dos camundongos infectados e não infectados foram cultivados na presença de ConA, exoantígeno (EXO), antígenos lipídico (LIP), antígenos solúvel (AS) e somente meio RPMI-1640C. As concentrações de IFN- γ foram calculadas por meio de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IFN- γ . Os resultados foram expressos em pg/mL e são representativos de dois experimentos independentes. As colunas representam as médias \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção, **p<0,01 detalhada no texto.

Na análise da produção de IL-6, diferentemente das demais citocinas descritas acima, observou-se que houve produção tanto nos animais WT quanto nos animais TLR-2^{-/-} (Figura 11). Além disso, analisando os animais WT infectados, ao contrário das demais citocinas citadas, foi observado que o pico de produção de IL-6 deu-se na 10^a semana de infecção, ou seja, a produção desse mediador foi ascendente no curso da infecção. Observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa nessa semana de análise entre ConA e LIP ($p > 0,05$), somente de ambos em relação ao EXO ($p < 0,01$) (Figura 11B).

Em relação ao perfil de citocinas observado nos animais TLR-2^{-/-} infectados, foi verificada que a maior produção ocorreu na 6^a semana, sendo que não houve diferença estatisticamente significativa entre os antígenos LIP e EXO ($p > 0,05$), somente de ambos em relação ao controle positivo o qual apresentou maior produção de IL-6 ($p < 0,01$) (Figura 11D).

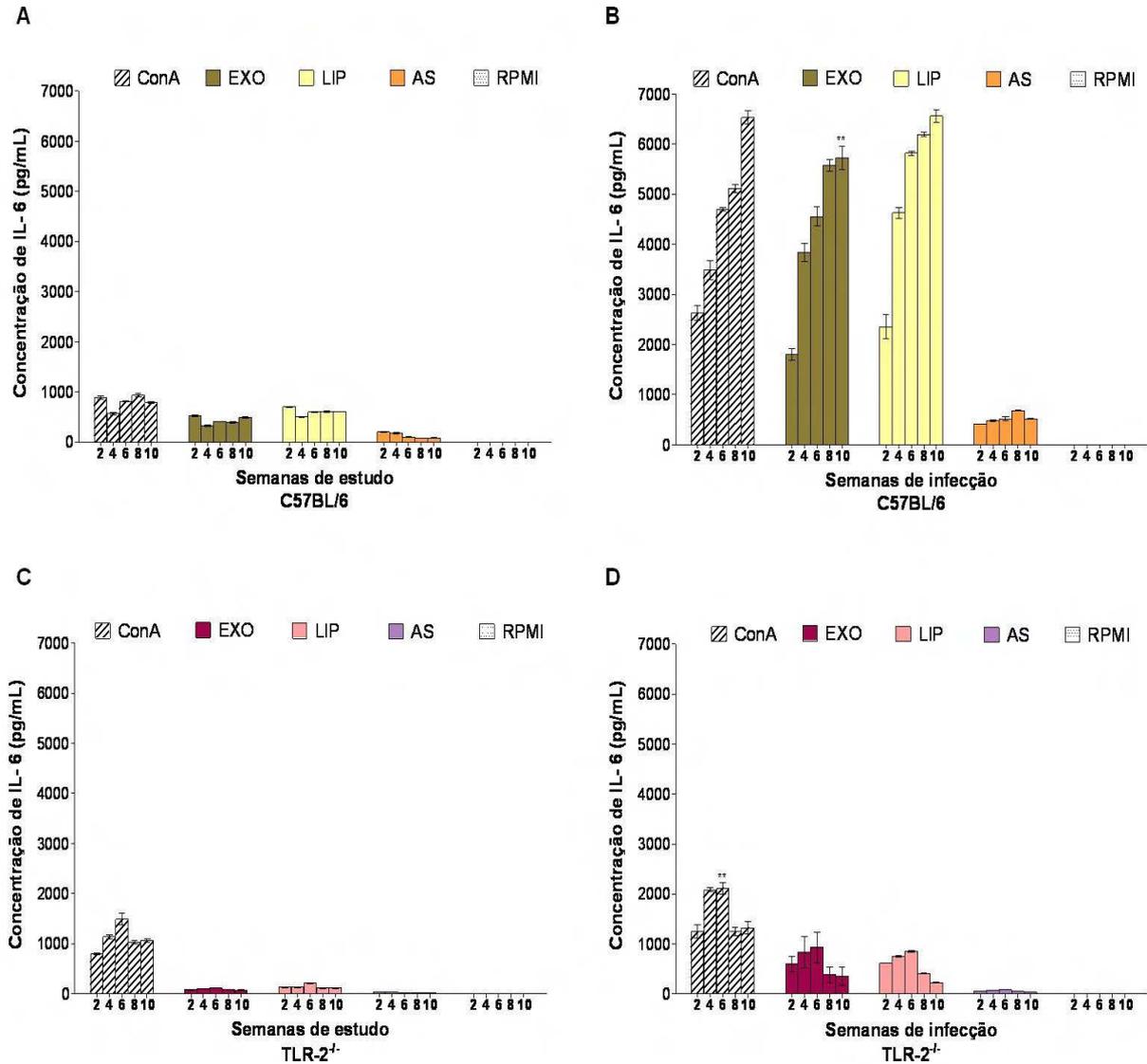
NÃO INFECTADOSINFECTADOS

Figura 11. Concentração de IL-6 liberada nos sobrenadantes de cultura das células do baço de camundongos WT não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* e TLR-2^{-/-} não infectados (C) ou infectados (D) com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas. As células do baço dos camundongos infectados e não infectados foram cultivadas na presença de ConA, exoantígeno (EXO), antígenos lipídico (LIP), antígenos solúvel (AS) e somente meio RPMI-1640C. As concentrações de IL-6 foram calculadas por meio de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IL-6. Os resultados foram expressos em pg/mL e são representativos de dois experimentos independentes. As colunas representam as médias \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção, ** $p < 0,01$ detalhada no texto.

Na determinação da produção de IL-4 (Figura 12) observa-se que houve produção com o mesmo perfil da IL-6, ou seja, uma produção ascendente durante o período de infecção para os animais WT infectados com o pico de produção desse mediador encontrado na 10^a semana, em que mais uma vez destacou-se uma maior produção para o LIP em relação ao EXO ($p < 0,001$) (Figura 12B). Entretanto, destacou-se a produção induzida por AS para esta citocina (165 pg/mL na 10^a semana de infecção), fato não observado em relação à produção pelos antígenos LIP e EXO nas demais citocinas citadas acima. Outro fato importante a ser citado, é a produção desse mediador pelos animais TLR-2^{-/-} infectados. De um modo geral, a produção de IL-4 foi crescente no decorrer das semanas de infecção, verificando-se uma maior produção quando a cultura de células foi estimulada com LIP quando comparada ao EXO e AS na 10^a semana ($p < 0,001$ para ambas as comparações) (Figura 12D).

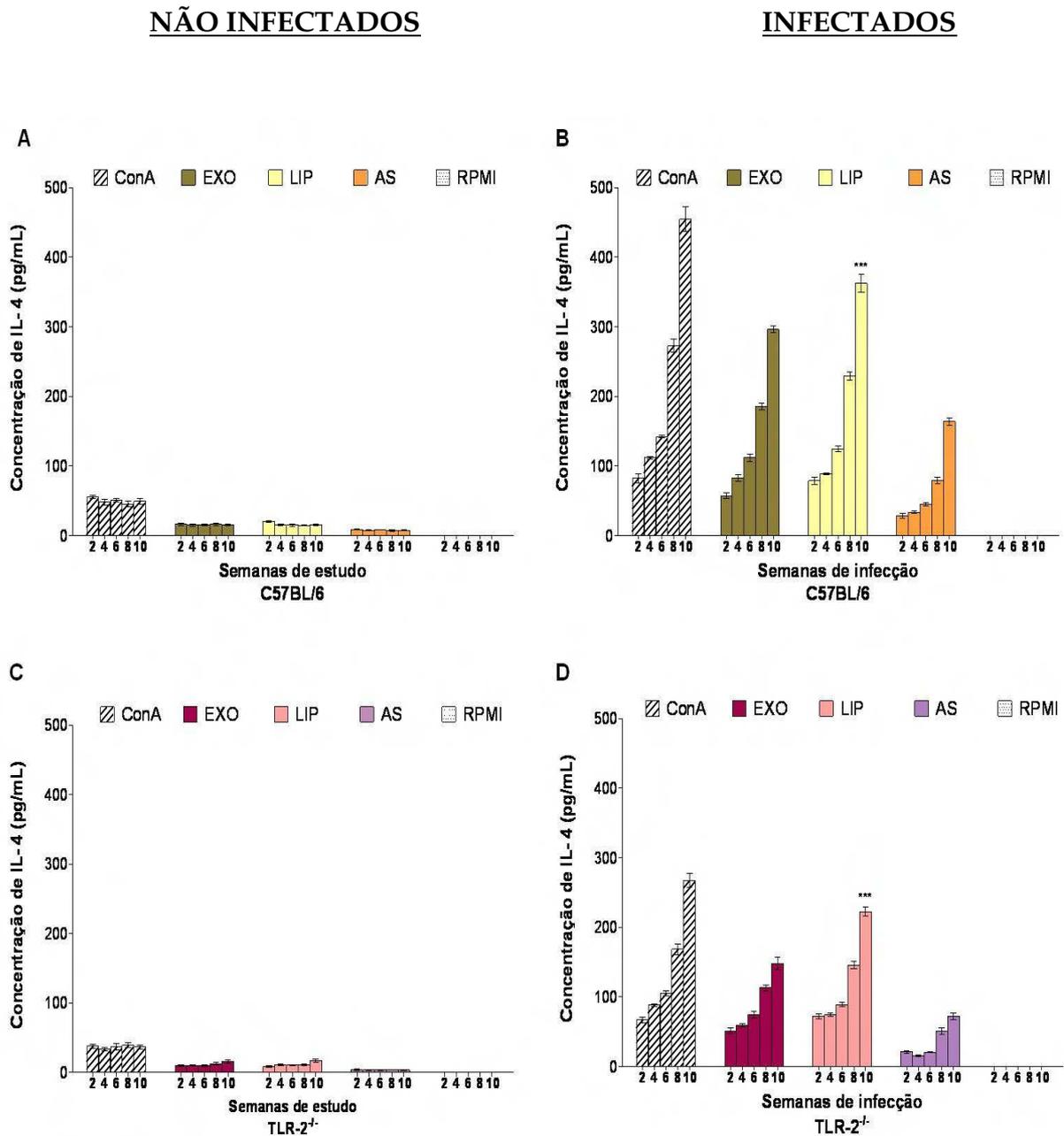


Figura 12. Concentração de IL-4 liberada nos sobrenadantes de cultura das células do baço de camundongos WT não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* e TLR-2^{-/-} não infectados (C) ou infectados (D) com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas. As células do baço dos camundongos infectados e não infectados foram cultivados na presença de ConA, exoantígeno (EXO), antígenos lipídico (LIP), antígenos solúvel (AS) e somente meio RPMI-1640C. As concentrações de IL-4 foram calculadas por meio de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IL-4. Os resultados foram expressos em pg/mL e são representativos de dois experimentos independentes. As colunas representam as médias \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção, *** $p < 0,001$ detalhada no texto.

Em relação à produção de IL-10 nos sobrenadantes das culturas das células do baço (Figura 13), foi observado o mesmo perfil de produção das citocinas IL-6 e IL-4, ou seja, produção ascendente no decorrer das semanas de infecção, com exceção da 6^a em que pode se observar uma acentuada queda tanto no caso da ConA quanto dos demais antígenos testados quando comparada ao pico de produção encontrado na 10^a semana ($p < 0,001$). Esse fato foi verificado tanto nos animais WT infectados quanto TLR-2^{-/-} infectados (Figura 13B e 13D, respectivamente).

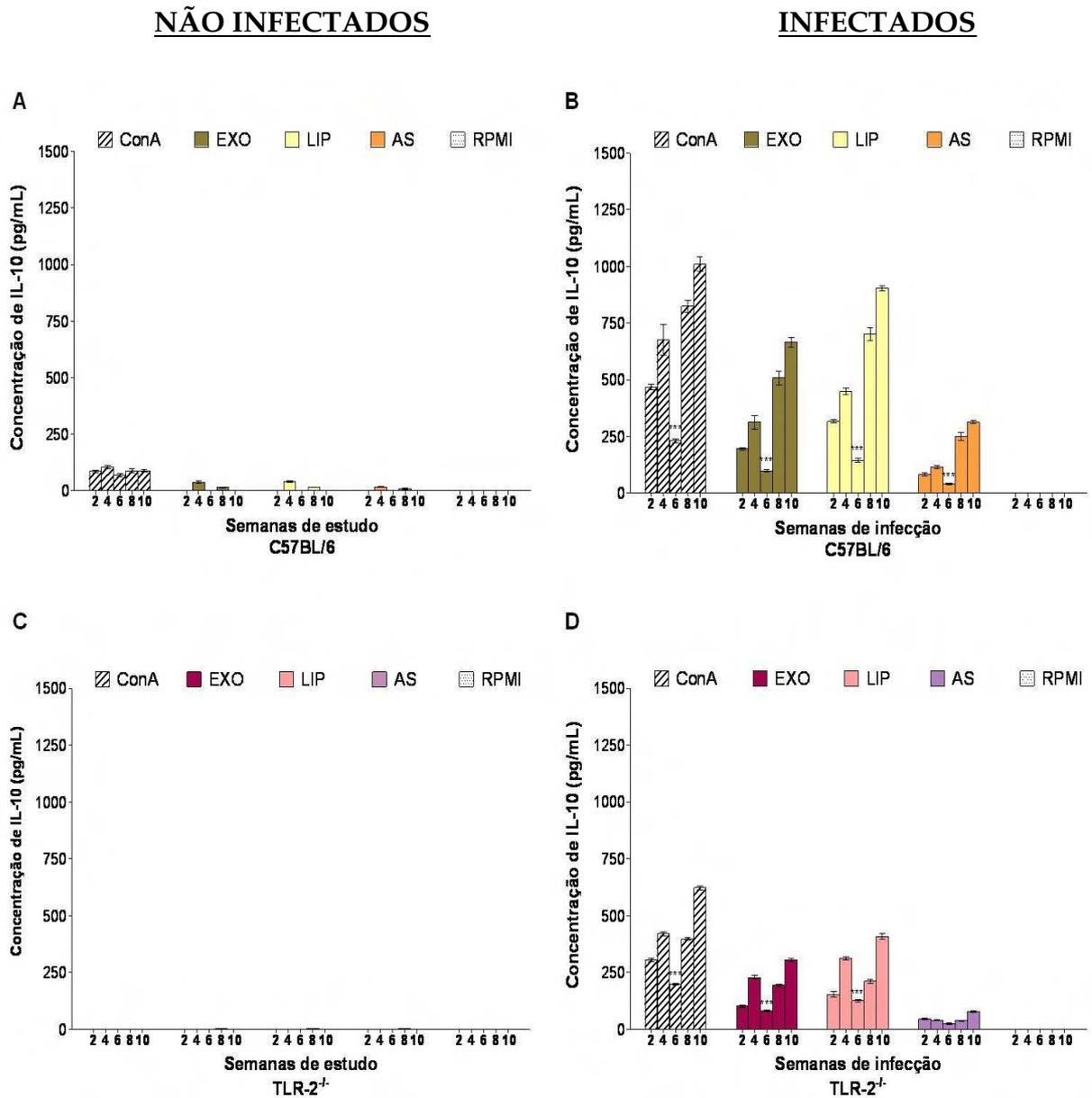


Figura 13. Concentração de IL-10 liberada nos sobrenadantes de cultura das células do baço de camundongos WT não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* e TLR-2^{-/-} não infectados (C) ou infectados (D) com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas. As células do baço dos camundongos infectados e não infectados foram cultivadas na presença de ConA, exoantígeno (EXO), antígenos lipídico (LIP), antígenos solúvel (AS) e somente meio RPMI-1640C. As concentrações de IL-10 foram calculadas por meio de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IL-10. Os resultados foram expressos em pg/mL e são representativos de dois experimentos independentes. As colunas representam as médias \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção, ***p<0,001 detalhada no texto.

A produção de IL-17 nos sobrenadantes das células do baço dos animais WT e TLR-2 infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii* (Figura 14). Em relação aos animais WT infectados, foi observado que a maior produção volta a ser na 6ª semana com destaque para a ConA comparada à produção do LIP e EXO ($p < 0,001$ em relação a ambos os antígenos), houve uma média de produção nessa semana de 218,17 pg/mL para ConA, 128,87 pg/mL e 98,92 pg/mL para os antígenos LIP e EXO, respectivamente (Figura 14B). No caso dos animais TLR-2^{-/-}, também foi observado que a maior produção ocorreu na 6ª semana com destaque para a ConA comparada à produção do LIP e EXO ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, em relação ao LIP e ao EXO, respectivamente) (Figura 14D). Analisando-se o tempo de infecção, tanto para os animais WT quanto para os TLR-2^{-/-}, notou-se um crescimento ascendente até a 6ª semana (pico de produção) com queda a partir desse momento até a 10ª semana. Um dado de destaque é que pôde-se verificar que os animais TLR-2^{-/-} infectados produziram níveis maiores dessa citocina quando comparados aos animais WT infectados (Figuras 14B e 14D).

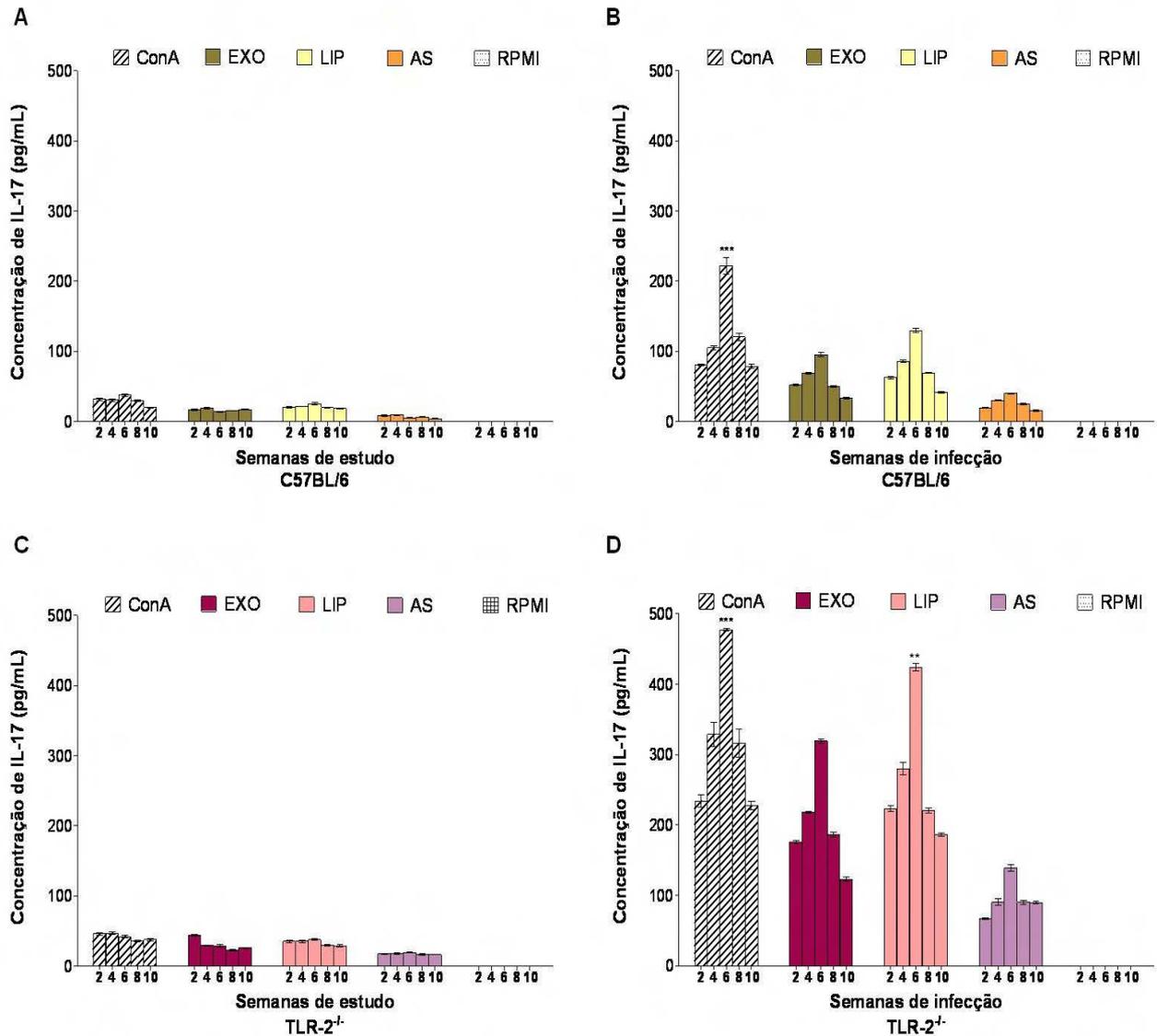
NÃO INFECTADOSINFECTADOS

Figura 14. Concentração de IL-17 liberada nos sobrenadantes de cultura das células do baço de camundongos WT não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* e TLR-2^{-/-} não infectados (C) ou infectados (D) com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas. As células do baço dos camundongos infectados e não infectados foram cultivadas na presença de ConA, exoantígeno (EXO), antígenos lipídico (LIP), antígenos solúvel (AS) e somente meio RPMI-1640C. As concentrações de IL-17 foram calculadas por meio de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IL-17. Os resultados foram expressos em pg/mL e são representativos de dois experimentos independentes. As colunas representam as médias \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção, *** $p < 0,001$ detalhada no texto.

A Figura 15 apresenta a produção de TGF- β tanto nos sobrenadantes das culturas de células de animais WT quanto dos animais TLR-2^{-/-}. Um dado importante a ser notado é que somente animais da linhagem TLR-2^{-/-} infectados apresentaram produção desse mediador (Figura 15D). Entretanto, destaca-se a diminuição da produção de TGF- β na 6^a semana, ou seja, dado oposto ao observado para IL-17. Verificou-se que o pico de produção foi na 8^a semana de infecção, novamente observando-se uma maior produção para ConA quando comparada aos antígenos LIP e EXO, os quais se destacaram na produção de praticamente todas citocinas citadas acima. Dentro de cada estímulo testado, tanto para ConA quanto para os antígenos LIP, EXO e AS, comparando-se a 2^a e 6^a semanas de infecção, verificou-se uma queda de produção acentuada demonstrando uma diferença estatisticamente significativa entre essas semanas ($p < 0,001$ em todos os casos analisados) (Figura 15D).

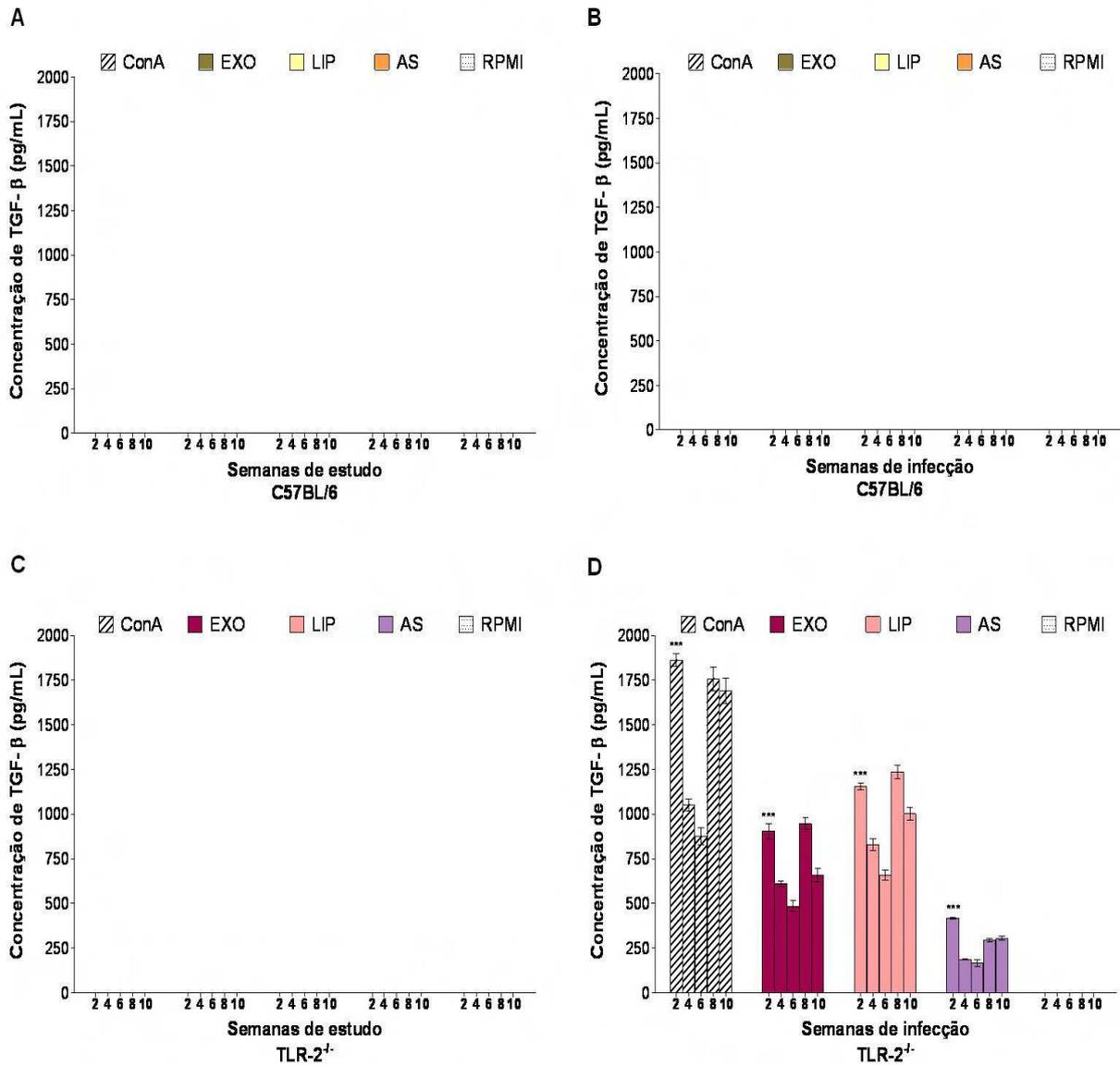
NÃO INFECTADOSINFECTADOS

Figura 15. Concentração de TGF- β liberada nos sobrenadantes de cultura das células do baço de camundongos WT não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* e TLR-2^{-/-} não infectados (C) ou infectados (D) com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas. As células do baço dos camundongos infectados e não infectados foram cultivados na presença de ConA, exoantígeno (EXO), antígenos lipídico (LIP), antígenos solúvel (AS) e somente meio RPMI-1640C. As concentrações de TGF- β foram calculadas por meio de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de TGF- β . Os resultados foram expressos em pg/mL e são representativos de dois experimentos independentes. As colunas representam as médias \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção, ***p<0,001 detalhada no texto.

4.5. Análise fenotípica dos linfócitos provenientes do baço por citometria de fluxo

A análise da expressão de diferentes subpopulações de linfócitos T foi realizada por determinação das porcentagens de células CD3/CD4+, CD3/CD8+ e CD4/CD25/Foxp3+, em suspensão celular obtida do baço dos animais WT e TLR-2^{-/-} infectados com *S. schenckii* e não infectados (controle) (Figuras 16, 17 e 18).

Os resultados obtidos na 2^a, 8^a e 10^a semanas após infecção fúngica não mostraram diferenças significativas nas subpopulações de linfócitos T quando comparadas as células obtidas dos animais não infectados em ambas as linhagens utilizadas (Figuras 16, 17 e 18).

No entanto, na 4^a e 6^a semanas após infecção, foi observado relevante aumento na porcentagem de linfócitos T CD4+ e CD8+ no baço dos animais WT infectados quando comparado ao baço dos animais não infectados ($p < 0,001$ em ambos os casos analisados) (Figuras 16 e 17). Já as células obtidas dos animais TLR-2^{-/-} infectados apresentaram aumento significativo de LT-CD4 em relação aos controles e discreta elevação na porcentagem de células T CD8+, porém não significativa.

Na análise de células Treg, verificou-se um aumento na porcentagem desta subpopulação no baço dos animais WT infectados na 4^a e 6^a semanas, quando comparados aos animais do grupo controle ($p < 0,001$) (Figura 18). Da mesma forma, células dos animais TLR-2^{-/-} infectados também apresentaram significativa alteração na porcentagem de células Treg quando comparados com os animais do grupo controle ($p < 0,001$) (Figura 18).

Na 6^a semana após infecção, animais WT infectados mantiveram o aumento nas porcentagens das subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+ quando

comparados aos animais do grupo controle ($p < 0,001$, em ambas as situações analisadas)(Figuras 16 e 17). Os resultados indicaram que neste período houve um aumento na expressão das subpopulações de linfócitos TCD4+ no baço dos animais TLR-2^{-/-} infectados ($p < 0,001$) quando comparados aos animais não infectados (Figura 16).

Os resultados apresentados na 8^a e 10^a semanas demonstram que não houve diferença estatisticamente significativa ao se comparar a porcentagens de células TCD4+ e TCD8+ dos animais infectados ao controle, tanto nos animais WT quanto nos TLR-2^{-/-} (Figuras 16 e 17). Entretanto verificou-se a presença de Treg, principalmente na 8^a semana com porcentagem de células estatisticamente significativa ao se comparar os animais infectados aos animais controle tanto nos animais WT ($p < 0,001$) quanto nos TLR-2^{-/-} ($p < 0,05$) (Figura 18).

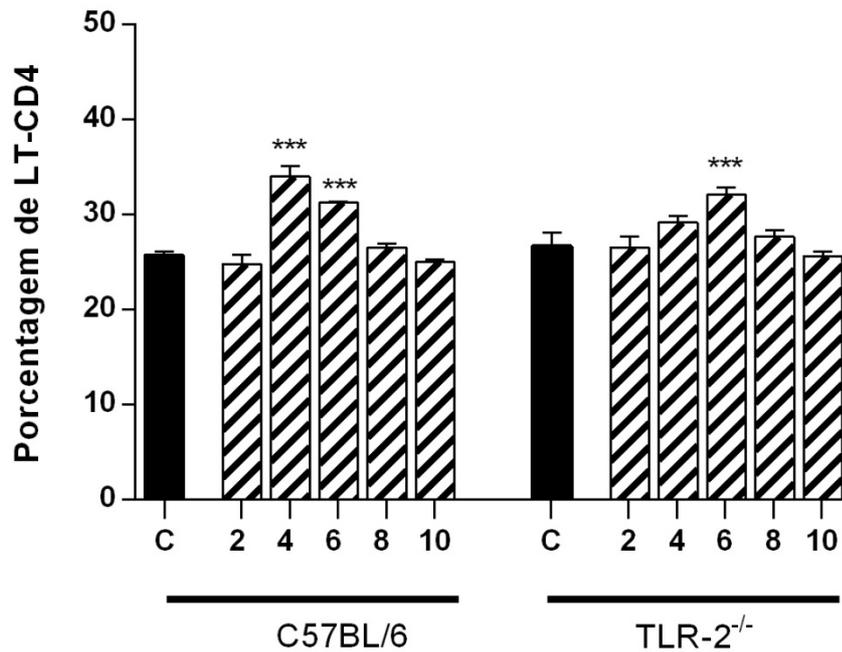


Figura 16. Porcentagem de linfócitos T CD4+ (LT-CD4) encontrada no baço de camundongos WT e TLR-2^{-/-} não infectados (C) ou infectados com o fungo *S. schenckii* e TLR-2^{-/-} durante dez semanas. Camundongos de ambas as linhagens foram sacrificados na 2^a, 4^a, 6^a, 8^a e 10^a semanas de infecção e os LT-CD4 foram quantificados através da metodologia de citometria de fluxo. Os resultados foram expressos em porcentagem e são representativos de dois experimentos independentes. As colunas representam as médias \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção, *** $p < 0,001$ detalhada no texto.

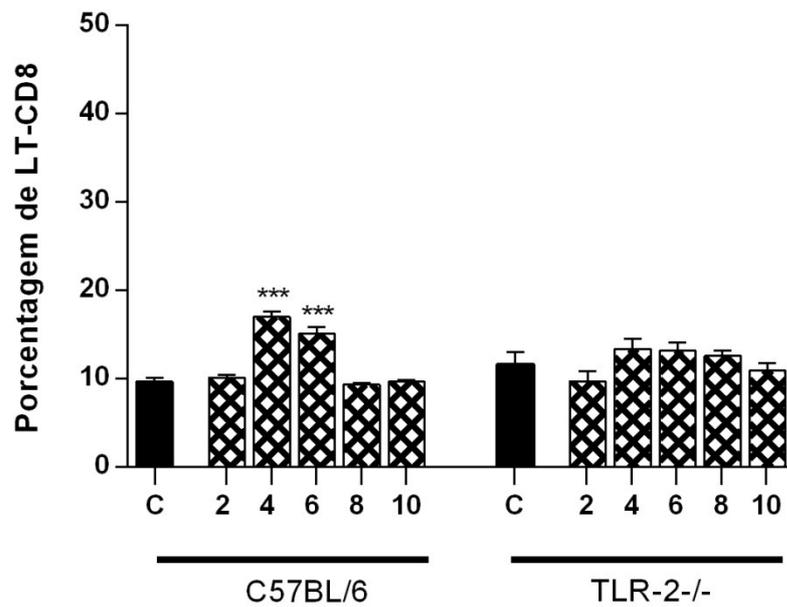


Figura 17. Porcentagem de linfócitos T CD8⁺ (LT-CD8) encontrada no baço de camundongos WT e TLR-2^{-/-} não infectados (C) ou infectados com o fungo *S. schenckii* e TLR-2^{-/-} durante dez semanas. Camundongos de ambas as linhagens foram sacrificados na 2^a, 4^a, 6^a, 8^a e 10^a semanas de infecção e os LT-CD8 foram quantificados através da metodologia de citometria de fluxo. Os resultados foram expressos em porcentagem e são representativos de dois experimentos independentes. As colunas representam as médias \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção, ***p<0,001 detalhada no texto.

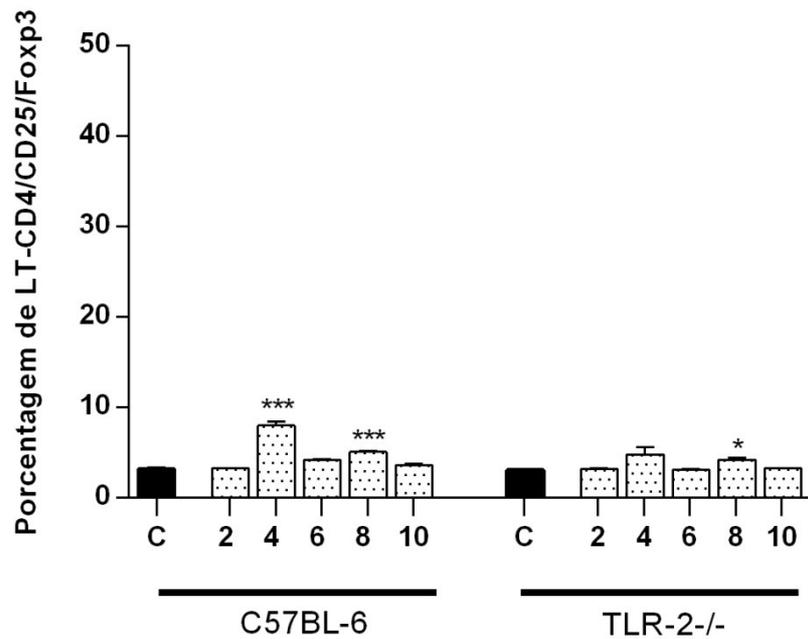


Figura 18. Porcentagem de linfócitos T CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺ (LT-CD4/CD25/Foxp3) encontrada no baço de camundongos WT e TLR-2^{-/-} não infectados (C) ou infectados com o fungo *S. schenckii* e TLR-2^{-/-} durante dez semanas. Camundongos de ambas as linhagens foram sacrificados na 2^a, 4^a, 6^a, 8^a e 10^a semanas de infecção e os LT-CD4/CD25/Foxp3 foram quantificados através da metodologia de citometria de fluxo. Os resultados foram expressos em porcentagem e são representativos de dois experimentos independentes. As colunas representam as médias ± desvio padrão de 5 animais por semana de infecção, *p<0,05; ***p<0,001.

5. DISCUSSÃO

Doenças causadas por fungos representam um paradigma importante em imunologia, pois tanto podem resultar em uma falta de reconhecimento do patógeno pelo sistema imune ou acarretar uma exacerbada resposta inflamatória no combate ao mesmo. Com o estudo de bases moleculares e celulares de virulência em microrganismos tenta-se compreender quais os mecanismos que mantêm a homeostasia do sistema imune com o patógeno e ao mesmo tempo, correlacionar com prováveis causas responsáveis pelo colapso neste equilíbrio, acarretando um processo infeccioso no qual há a instalação da doença (Romani, 2011).

A esporotricose é uma micose granulomatosa crônica causada pelo fungo dimórfico *S. schenckii*, o qual apresenta-se em distribuição mundial habitando restos de plantas e vegetais em decomposição. A doença é causada pela inoculação traumática do fungo no tecido subcutâneo (Kauffman, 1999; Barros et al., 2011).

No Brasil, os primeiros casos de esporotricose em seres humanos e ratos foram descritos por Lutz & Splendore em 1907. Desde então, casos isolados, séries de casos e surtos vêm sendo relatados, a maioria relacionada ao trabalho agrícola ou atividade envolvendo manipulação do solo e vegetais contaminados com o fungo. A ocorrência dessa micose em animais, especialmente em gatos, e sua transmissão para humanos têm sido descritas em diversos países. Entretanto, em nenhum local a doença assumiu proporções epidêmicas como ocorreu no estado do Rio de Janeiro (da Rosa et al., 2005, Lopez-Bezerra et al., 2006, Barros et al., 2010).

Os mecanismos imunológicos envolvidos na prevenção e controle da esporotricose sugerem que a imunidade celular apresenta um importante papel na

proteção do hospedeiro contra *S. schenckii* (Carlos et al., 1992; Carlos et al., 1994; Carlos et al., 2009). Entretanto, apesar de vários trabalhos ressaltarem os mecanismos imunológicos envolvidos no combate ao fungo *S. schenckii*, pouco se conhece sobre a participação dos fatores de virulência e resposta imunológica na esporotricose.

Os “Toll-like receptors” são receptores que reconhecem moléculas de padrão específicos encontradas nos patógenos e são responsáveis por capacitar o sistema imune inato a induzir uma resposta imune adaptativa eficiente frente ao patógeno (Kondo et al., 2012). Com isso, a partir do momento em que o microrganismo entra em contato com o hospedeiro, vários mediadores imunológicos são produzidos.

Diversos trabalhos vêm demonstrando a importância de TLRs em infecções fúngicas, entretanto, os principais receptores envolvidos no reconhecimento desses patógenos são o TLR-2, TLR-4 e TLR-9 (Romani, 2011).

Apesar dos estudos existentes demonstrando a participação dos TLRs no reconhecimento dos microrganismos, ainda não se conhece o papel preciso desses receptores na orquestração do complexo inflamatório resultante em infecções fúngicas e os processos que estão envolvidos na interação TLRs/patógenos permanecem pouco compreendidos (Kasperkovitz et al., 2012), ou seja, a interação de fungos patogênicos com o hospedeiro durante o processo infeccioso tem sido amplamente estudada, porém os mecanismos desenvolvidos pelo hospedeiro para combater esses patógenos e a capacidade dos mesmos em causar doença ainda permanecem pouco elucidados.

Estudos prévios realizados em nosso laboratório demonstraram que o TLR-4 participa no processo de reconhecimento e indução da resposta imune ao fungo *S.*

schenckii (Sassá et al., 2009; Sassá et al., 2012). Com o intuito de dar continuidade aos estudos dos TLRs na resposta imunológica frente a esse patógeno, no presente trabalho avaliamos o papel do receptor TLR-2, já que, tanto os componentes do fungo como os receptores dos fagócitos envolvidos nesta interação são pouco compreendidos. Usando animais C57BL/6 knockout para TLR-2 obtivemos resultados que demonstraram a participação deste receptor no reconhecimento e ativação da resposta imune frente ao fungo *S. schenckii*.

Li et al. (2012) na tentativa também de determinar se o TLR-2, TLR-4 e NF- κ B estavam envolvidos na produção de IL-6 e IL-8 por queratinócitos humanos desafiados com conídios e leveduras do fungo *S. schenckii*, pré-trataram as células humanas com anti-TLR-2, anti-TLR-4 e inibidor de NF- κ B previamente ao desafio com o fungo. Com isso, os autores observaram que a produção dos mediadores foi bloqueada com a utilização de anti-TLR-2 e anti-TLR-4 e neutralizada com o uso do inibidor de NF- κ B, sugerindo que a produção de IL-6 e IL-8 é desencadeada pela ativação dos receptores TLR-2 e TLR-4.

Para se verificar o papel do TLR-2 na resposta imune induzida pelo fungo *S. schenckii* utilizamos vários componentes do mesmo para estimular as culturas de células, dentre eles, o exoantígeno, o antígeno solúvel e o antígeno lipídico, já que, estudos prévios realizados em nosso laboratório demonstraram que esses antígenos desempenharam papel importante na patogênese desta micose (Carlos et al., 1992, Carlos et al., 2003, Maia et al., 2006, Sassá et al., 2009, Sassá et al., 2012, Verdan et al., 2012).

O perfil da resposta, analisando-se as semanas de infecção, foi mantido entre os antígenos do fungo *S. schenckii* utilizados como estímulo nas culturas celulares, muito embora o antígeno lipídico foi o mais eficaz na capacidade de estimular a produção dos mediadores imunológicos, seguido do exoantígeno e do antígeno solúvel, respectivamente. Essa resposta, provavelmente foi obtida pela capacidade do TLR-2 reconhecer, principalmente, componentes lipídicos presentes nos microrganismos (Takeda et al., 2003; Takeda & Akira, 2005; McGettrick & O'Neill, 2010).

Nossos resultados demonstraram que somente animais WT foram capazes de produzir IL-1 β , IL-12 e TNF- α (Figuras 5, 6 e 7, respectivamente). A comparação entre as linhagens de camundongos mostrou também aumento na expressão de linfócitos T CD4⁺ (Figura 16) e CD8⁺ (Figura 17) nos animais WT, principalmente nas semanas iniciais de infecção, mesmo período em que ocorre elevação na produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos peritoneais obtidos desses camundongos. Macrófagos são importantes células apresentadoras de antígenos podendo conduzir a expansão e diferenciação de linfócitos T, dependendo de seus produtos secretados. O aumento na secreção de citocinas pró-inflamatórias sugere uma ativação da resposta imune por este tipo celular, concordando com a elevação na expressão dos linfócitos T (Mosser & Edwards, 2008). O mesmo não foi observado nas células obtidas dos animais TLR-2^{-/-}, os quais não apresentaram níveis detectáveis de citocinas pró-inflamatórias em cultura de macrófagos e alterações relevantes nas porcentagens de linfócitos T (Figuras 16 e 17). Resultado semelhante foi verificado por Netea et al. (2002) os quais observaram que a produção de TNF- α e

IL-1 β foi inibida por células mononucleares obtidas de camundongos C3H/HeJ deficientes para TLR-4 quando bloquearam o receptor TLR-2, sugerindo que a produção dessas citocinas foi fortemente dependente de TLR-2 quando em contato com *Candida albicans*.

Villamon et al. (2004a) analisaram que a produção *in vitro* de TNF- α por macrófagos de camundongos TLR2^{-/-} em resposta a *C. albicans* foi significativamente menor nesses animais quando comparada a dos animais controle (Villamon et al., 2004a). Em outro estudo, esses mesmos autores utilizaram um modelo murino de infecção sistêmica por *C. albicans*, no qual a resistência à reinfeção foi induzida por uma exposição prévia dos camundongos a uma cepa de *C. albicans* apresentando baixa virulência. Esse estudo foi realizado para se avaliar a influência da deleção do gene de TLR-2 na capacidade de desenvolvimento de uma resposta específica após esse processo de vacinação. Os resultados indicaram que, apesar dos camundongos TLR-2^{-/-} terem apresentado uma produção muito diminuída de citocinas Th1 (IFN- γ , IL-12 e TNF- α) em comparação com os animais controle, que esses são igualmente capazes de montar uma resposta humoral específica (Villamon et al., 2004b), o que sugere que a ausência desse receptor faz com que o sistema imune desses animais utilize outras vias na tentativa de combate aos patógenos.

Além de não terem sido produzidas citocinas pró-inflamatórias, também não foi observada produção de NO nos animais TLR-2^{-/-}, situação oposta a encontrada nos animais WT nos quais foi observado que houve produção ascendente deste mediador da fase inicial (2^a semana) até a 6^a semana, e uma acentuada queda foi verificada na fase tardia do período analisado (8^a e 10^a semanas) (Figura 8). A maior

produção desse mediador nas semanas iniciais da infecção leva a crer que esse mecanismo vem a ser uma tentativa do sistema imune em eliminar o patógeno pelo hospedeiro, já que, o NO é um dos principais mediadores citotóxicos de células imunes efetoras ativadas sendo capaz de destruir microorganismos e inclusive, células tumorais (Dusse et al., 2003). Se macrófagos provenientes de animais TLR-2^{-/-} não apresentam o receptor TLR-2, pode-se sugerir que a interação receptor-fungo foi prejudicada e, conseqüentemente, estímulos menos eficientes para induzir a síntese de NO foram observados, demonstrando dependência desse receptor para sua produção.

Netea et al. (2004) demonstraram uma aumentada produção de IFN- γ pelas células do baço em resposta à infecção por *C. albicans* em camundongos deficientes para TLR-2, associado a uma menor geração de células T reguladoras e melhor eliminação das leveduras pelos macrófagos. Contrariamente, nossos resultados demonstraram aumentada produção de IFN- γ somente por linfócitos T obtidos de camundongos WT (Figura 10), principalmente na 4^a e 6^a semanas do processo infeccioso, mesmo período em que se nota aumento na porcentagem de células T CD8⁺, podendo esta subpopulação estar sendo ativada na defesa contra o fungo. Outro dado interessante a ser notado é que neste mesmo período da infecção, verificou-se produção aumentada de IL-12 (Figura 6), a qual é a principal indutora de IFN- γ pelas células T (Szabo et al., 2003). No caso dos animais TLR-2^{-/-}, de maneira oposta aos WT, não houve produção de IFN- γ nem de IL-12. Em relação a resposta encontrada nos estudos realizados em nosso laboratório com camundongos C3H/HeJ deficientes para TLR-4, verificou-se uma aumentada produção de IL-12

pelos mesmos (Sassá et al., 2009), situação oposta a verificada em nosso estudo, provavelmente pela diferença entre as linhagens dos animais e os receptores de reconhecimento testados.

Em infecções fúngicas, apesar das inúmeras investigações na tentativa de se elucidar o papel dos TLRs na produção de citocinas pró-inflamatórias *in vitro*, pouco se sabe sobre a real atuação desses receptores na contribuição da patologia inflamatória associada com a infecção *in vivo*. Apesar da inflamação ser um componente fundamental da resposta protetora frente à patógenos fúngicos, uma desregulação nesse mecanismo pode agravar o processo infeccioso (Bozza et al., 2008). Dependendo do patógeno e do receptor envolvido, podemos observar um padrão de resposta Th1, Th2 e Th17.

O padrão de resposta Th17 representa um novo subtipo de linfócitos T efetores que podem atuar em uma resposta inflamatória exacerbada, previamente atribuída a uma descontrolada resposta Th1. Os linfócitos Th17 produzem, dentre outras citocinas, IL-21, IL-22, IL-26 e as citocinas da família IL-17 as quais são potentes indutoras da inflamação, induzindo a infiltração celular e produção de outras citocinas inflamatórias (Chen et al., 2007; Mesquita Jr et al., 2010). A produção desregulada de IL-17 está associada a várias condições autoimunes como: esclerose múltipla, doença intestinal inflamatória, psoríase e lúpus eritematoso. Além de estar relacionado à doença autoimune, os linfócitos Th17 tem sido associados à proteção contra infecção causada por microrganismos (Chen et al., 2007, Mesquita Jr et al., 2010) e a produção de IL-17 também está associada a mecanismos de defesa do hospedeiro contra diversos patógenos (Ouyang et al., 2008), incluindo bactérias

Gram-negativas como *Klebsiella pneumonia* (Ye et al., 2001) e *Citrobacter rodentium* (Mangan et al., 2006) e bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* (Joshi et al., 2012). Há relatos mostrando que a IL-17 representa um papel fundamental em infecções gástricas causadas por *Helicobacter pylori*, pois proporciona a redução desse patógeno durante o curso da infecção (Kabir, 2011). Em infecções causadas pelo fungo do gênero *Coccidioides*, verificou-se que a produção de IL-17 no estágio inicial da infecção promoveu o recrutamento de neutrófilos para os pulmões e reparação tecidual (Lin et al., 2010). Recentes relatos sugerem que a produção de citocinas padrão Th17 estão envolvidas no controle de infecções causadas pelos fungos *Candida* e *Aspergillus*, particularmente em condições de deficiência de resposta Th1 (Romani, 2011).

Ao se analisar o curso da infecção no nosso estudo, além da não produção das citocinas pró-inflamatórias e NO, nossos resultados também revelaram que os animais TLR-2^{-/-} apresentaram maiores níveis de produção de IL-17 quando comparada a produção dessa citocina a dos animais WT tal como observado na literatura (Romani, 2011). Portanto nossos resultados demonstraram que a ausência de citocinas de padrão Th1 nos animais TLR2^{-/-} coincidiu com a produção de IL-17 (Figura 14).

As células Treg, por outro lado, representam uma subpopulação de linfócitos T caracterizados pela expressão da molécula CD25⁺ e do fator nuclear FoxP3 (Liu et al., 2010). Linfócitos Treg são importantes para manutenção do equilíbrio das respostas imunes, impedindo os danos que poderiam ser causados por uma resposta inflamatória exacerbada (Wing & Sakaguchi, 2012). Ao se analisar a porcentagem de

células Treg verificou-se um aumento desta subpopulação na 4^a semana após infecção na suspensão obtida do baço dos camundongos WT, comparado com os animais não infectados. Esse aumento nas células Treg, combinado com elevação na resposta pró-inflamatória, pode ser um indício da importância da manutenção do equilíbrio imune durante o combate ao fungo (Wing & Sakaguchi, 2012). Além disso, houve um aumento da produção de IL-10 nesta semana, sugerindo manutenção da resposta supressora, uma vez que a IL-10 é considerada citocina reguladora (Peterson, 2012). Já as células provenientes dos camundongos TLR-2^{-/-} não apresentaram significativa alteração na porcentagem de células Treg e também menor produção de IL-10 (Figura 13) quando comparadas com os animais WT.

Loures et al. (2009) com o objetivo de analisar o papel do TLR-2 em modelo experimental de infecção pulmonar crônica induzida pelo *Paracoccidioides brasiliensis* também observaram que macrófagos de camundongos TLR-2^{-/-} apresentaram resposta polarizada para Th17 e ausência de expansão de células Treg, tal como observado em nossos resultados. Cooke (2006) demonstrou que a inibição do desenvolvimento de Treg promove a diferenciação das células TCD4⁺ em Th17.

O TGF- β tem sido associado com o desenvolvimento de células Treg e com a capacidade de inibir a diferenciação das células Th1 e Th2. Volpe et al. (2008) verificaram que a produção de TGF- β , IL-23, IL-1 β e IL-6 foram essenciais para a diferenciação de Th17 em humanos e que a ausência de TGF- β induziu a transformação do perfil Th17 para Th1. Portanto, os fatores que impulsionam a diferenciação de um perfil Th17 ainda permanecem controversos.

No presente estudo, somente os animais TLR-2^{-/-} produziram TGF- β sendo esta produção elevada no início (2^a semana) e nos estágios finais da infecção (8^a e 10^a semanas) (Figura 15). Interessantemente, a produção de TGF- β foi inversamente proporcional à produção de IL-17 nesses animais (Figura 14). Nossos resultados sugerem que uma alta produção de TGF- β possa inibir a diferenciação de células Th17, dado esse deduzido pelos os níveis de IL-17 encontrados durante o período experimental.

Entretanto alguns autores sugerem (Annunziato et al., 2010) que a diferenciação de Th17 é independente do TGF- β . Esse resultado foi comprovado em nosso estudo somente nos animais WT, uma vez que os mesmos produziram IL-17 independentemente da produção de TGF- β , sugerindo que a produção dessa citocina foi derivada de outro estímulo, provavelmente a IL-6 (Figura 11), mediador que tem sido descrito como um dos responsáveis por induzir a diferenciação de Th17 e, como consequência, a produção de IL-17 (Cooke, 2006).

Em relação à produção das citocinas perfil Th2, IL-4 (Figura 12) e IL-10 (Figura 13) nos sobrenadantes das culturas das células do baço, de um modo geral, foi observada uma produção ascendente desses mediadores no decorrer das semanas de infecção. Esse resultado foi verificado tanto nos animais WT infectados quanto TLR-2^{-/-} infectados. Uma vez que essas citocinas possuem um papel anti-inflamatório (Constant & Bottomly, 1997), uma produção ascendente desses mediadores sugere que no final da infecção haja uma participação da resposta Th2, tal como em estudo prévio do laboratório (Maia et al., 2006) utilizando camundongos não isogênicos, linhagem Swiss o que contribuiu para a recuperação dos animais, já que, sugere-se

que o principal efeito desses mediadores é a inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias (Fiorentino et al., 1991).

Os resultados apresentados entre a 8^a e 10^a semanas sugerem o início do declínio da resposta imune, com porcentagens de células T mais próximas as dos animais não infectados (Figuras 16 e 17).

Ao se verificar o peso do baço dos animais durante o curso da infecção, observou-se que o mesmo estava alterado quando se comparou animais infectados aos não infectados em ambas as linhagens do estudo (Figura 9). Esse dado foi mais um indicativo do modo como a infecção progrediu nesses animais demonstrando o comprometimento dos mesmos. O aumento de peso do baço, principalmente, nas semanas iniciais da infecção (2^a e 4^a) até a 6^a semana sugere que houve uma proliferação de células do baço por esses animais na tentativa de combate ao patógeno. Já na 10^a semana de infecção, foi verificado que o peso do baço dos animais infectados apresentou-se similar ao dos animais não infectados, em ambas as linhagens. Esse dado, aliado às análises de produção dos mediadores imunológicos descritas anteriormente, permite sugerir um processo de recuperação dos animais WT e TLR-2^{-/-} ao final do curso de infecção apresentadas no estudo.

É inegável que a tamanha diversidade e complexidade de antígenos do *S. schenckii* possam desencadear diferentes mecanismos de defesa do hospedeiro na tentativa de combate ao patógeno. Estudos prévios em nosso laboratório demonstraram a influência do TLR-4 na indução de uma resposta imune frente a esporotricose (Sassá et al., 2009; Sassá et al., 2012). O presente estudo demonstrou que a ausência de TLR-2 impediu que uma resposta Th1 fosse articulada na tentativa

de combate ao fungo, entretanto a ausência desse receptor proporcionou o desencadeamento de uma resposta padrão Th17. Em conjunto, nossos achados demonstram a participação dos receptores TLR-4 e TLR-2 na resposta imune frente ao fungo *S. schenckii*. Um dado interessante a ser notado é que a ausência de um receptor faz com que o sistema imune venha utilizar uma outra via de sinalização na tentativa de combater patógeno, o que não exclui a possibilidade de outros receptores estarem envolvidos na resposta induzida pelo fungo *S. schenckii*.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. O antígeno lipídico é o mais eficaz na capacidade de estimular a produção dos mediadores imunológicos, seguido do exoantígeno e do antígeno solúvel, respectivamente.
2. O TLR-2 interfere na produção dos mediadores pro-inflamatórios e NO e sua ausência a inibe totalmente.
3. A ausência do TLR-2 não interfere na produção das citocinas de perfil Th2 e sim na liberação desses mediadores imunológicos.
4. A produção de IL-17 ocorre independente da ausência de TLR-2.
5. A ausência de resposta Th1 nos animais TLR2^{-/-} coincide com a produção de IL-17 e a baixa porcentagem de Treg sugere o aumento dessa interleucina.
6. A ausência de TLR-2 interfere no curso da infecção induzida pelo fungo *S. schenckii*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS DO. Macrophages. *Methods Enzymol.* 1979; 58: 494-506.
2. ADEREM A, UNDERHILL DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol.* 1999; 17: 593-623.
3. AGARWAL S, GOPAL K, UMESH, KUMAR B. Sporotrichosis in Uttarakhand (India): a report of nine cases. *Intern J Dermatol.* 2008; 47:367-71.
4. AKIRA S, UEMATSU S, TAKEUCHI O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006; 124(4):783-801.
5. ANNUNZIATO F, COSMI L, ROMAGNANI S. Human and murine Th17. *Curr Opin HIV AIDS.* 2010;5(2):114-9.
6. APPENZELLER S, AMARAL TN, AMSTALDEN EM, BERTOLO MB, NETO JF, SAMARA AM, FERNANDES SR. *Sporothrix schenckii* infection presented as monoarthritis: report of two cases and review of the literature. *Clin Rheumatol.* 2006; 25(6): 926-8.
7. AZUMA M. Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. *J Periodontol Res.* 2006; 41: 361-73.
8. BARROS MB, DE ALMEIDA PAES R, SCHUBACH AO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clin Microbiol Rev.* 2011; 24(4): 633-54.
9. BARROS MBL, SCHUBACH AO, GALHARDO MC, SCHUBACH TMP, REIS RS, CONCEIÇÃO MJ, VALLE AC. Sporotrichosis with widespread cutaneous lesions-a report of 24 cases related to transmission by domestic cats in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Dermatol.* 2003; 42: 677-81.
10. BARROS MBL, SCHUBACH TP, COLL JO, GREMIÃO ID, WANKE B, SCHUBACH A. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. *Rev Panam Salud Publica.* 2010; 27(6): 455-60.
11. BARROS MBL, SCHUBACH TP, COLL JO, GREMIÃO ID, WANKE B, SCHUBACH A. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. *Rev Panam Salud Publica.* 2010; 27(6): 455-60.
12. BELKNAP BS. Sporotrichosis. *Dermatol Clinics.* 1989; 7(2): 193-202.
13. BOZZA S, ZELANTE T, MORETTI S, BONIFAZI P, DELUCA A, D'ANGELO C, GIOVANNINI G, GARLANDA C, BOON L, BISTONI F, PUCCHETTI P, MANTOVANI A, ROMANI L. Lack of Toll IL-1R8 Exacerbates Th17 cell responses in fungal infection. *J Immunol.* 2008; 180(6): 4022-31.

14. BRAEDEL S, RADSACK M, EINSELE H, LATGÉ JP, MICHAN A, LOEFFLER J, HADDAD Z, GRIGOLEIT U, SCHILD H, HEBART H. *Aspergillus fumigatus* antigens activate innate immune cells via toll-like receptors 2 and 4. *Br J Haematol.* 2004; 125(3):392-9.
15. CARLOS IZ, SASSÁ MF, DA GRAÇA SGARBI DB, PLACERES MC, MAIA DC. Current Research on the immune response to experimental Sporotrichosis. *Mycopathologia.* 2009; 168(1): 1-10.
16. CARLOS IZ, SGARBI DB, ANGLUSTER J, ALVIANO CS, SILVA CL. Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the systemic form of the disease. *Mycopathologia.* 1992; 117(3): 139-44.
17. CARLOS IZ, SGARBI DBG, PLACERES MCP. Host organism defense by a peptide- polysaccharide extracted from the fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia.* 1999; 144:9-14.
18. CARLOS IZ, SGARBI DBG, SANTOS GC, PLACERES MCP. *Sporothrix schenckii* lipid inhibits macrophage phagocytosis, involvement of nitric oxide and tumor necrosis factor- α . *Scandinavian J Immunol.* 2003; 57:214-20.
19. CARLOS IZ, ZINI MM, SGARBI DBG, ANGLUSTER J, ALVIANO CS, SILVA CL. Disturbances in the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor in disseminated murine sporotrichosis. *Mycopathologia.* 1994; 127:189-94.
20. CARVALHO MT, DE CASTRO AP, BABY C, WERNER B, FILUS NETO J, QUEIROZ-TELLES F. Disseminated cutaneous sporotrichosis in a patient with AIDS: report of a case. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002; 35(6): 655-9.
21. CASTILLO MC, TAPIA FJ, ARCINIEGAS E. Ultrastructural localization of specific surface antigens in the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*. *J Med Vet Mycol.* 1990; 28(1): 91-4.
22. CAVAILLON JM. Cytokines and macrophages. *Biomed Pharmacother.* 1994; 48: 445-53.
23. CHAI LY, KULLBERG BJ, VONK AG, WARRIS A, CAMBI A, LATGÉ JP, JOOSTEN LA, VAN DER MEER JW, NETEA MG. Modulation of Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 responses by *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun.* 2009; 77(5):2184-92.
24. CHEN Z, TATO CM, MUUL L, LAURENCE A, O'SHEA JJ. Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes. *Arthritis Rheum.* 2007; 56(9): 2936-46.

25. CONSTANT SL, BOTTOMLY K. Induction of Th1 and Th2 cd4c T cell responses: The alternative approaches. *Annu Rev Immunol.* 1997; 15: 297–322.
26. COOK MT, HAYBALL PJ, HUTCHINSON W, NOWAK B, HAYBALL JD. The efficacy of a commercial β -glucan preparation, EcoActiva, on stimulating respiratory burst activity of head-kidney macrophages from pink snapper (*Pagrus auratus*), Spararidae. *Fish Shellfish Immunol.* 2001; 11: 661-72.
27. COOKE A. Th17 Cells in Inflammatory Conditions. *Rev Diabetic Stud.* 2006; 3: 72-5.
28. DA ROSA AC, SCROFERNEKER ML, VETTORATO R, GERVINI RL, VETTORATO G, WEBER A. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. *J Am Acad Dermatol.* 2005; 52(3 Pt 1): 451-9.
29. DONADEL KW, REINOSO YD, OLIVEIRA JC, AZULAY RD. Esporotricose: revisão. *An bras Dermatol.* 1993, 68(1): 45-52.
30. DRAPER DW, BETHEA HN, HE YW. Toll-like receptor 2-dependent and -independent activation of macrophages by group B streptococci. *Immunol Lett.* 2006; 102(2): 202-14.
31. DUSSE LMS, VIEIRA LM, CARVALHO MG. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.* 2003; 39(4): 343-50.
32. FERNANDES GF, AMARAL CC, SASAKI A, GODOY PM, CAMARGO ZP. Heterogeneity of proteins expressed by Brazilian *Sporothrix schenckii* isolates. *Medical Mycology.* 2009; 47: 855–61.
33. FERNANDES KS, NETO EH, BRITO MM, SILVA JS, CUNHA FQ, BARJA-FIDALGO. Detrimental role of endogenous nitric oxide in host defence against *Sporothrix schenckii*. *Immunology.* 2008; 123(4): 469-79.
34. FERNANDES KSS, COELHO ALJ, BEZERRA LML, BARJA-FIDALGO C. Virulence of *Sporothrix schenckii* conidia and yeast cells, and their susceptibility to nitric oxide. *Immunology.* 2000; 101: 563-69.
35. FIORENTINO DF, ZLOTNIK A, MOSMANN TR, HOWARD MH, O'GARRA A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol.* 1991; 147(11): 3815- 22.
36. GAY NJ, KEITH FJ. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature.* 1991; 351(6325):355-6.

37. GORI S, LUPPETI A, MOSCATO G, PARENTI M, LOFARO A. Disseminated sporotrichosis in patients with AIDS: case report and review of the literature. *Acta Cytol.* 1997; 41(2): 519-521.
38. GREEN LC, WAGNER DA, GLOGOWSKI J, SKIPPER PL, WISHNOK JS, TANNENBAUM SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982; 126(1): 131-8.
39. HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Free radicals reactive species and toxicology. In: Halliwell B, Gutteridge, editors. *Free Radic Biol Med.* New York. 1999; 544-616.
40. HARDMAN S, STEPHENSON I, JENKINS DR, WISELKA MJ, Johnson EM. Disseminated *Sporothrix schenckii* in a patient with AIDS. *J Infect.* 2005; 51(3): 73-7.
41. HOWELL SJ, TOOHEY JS. Sporotrichal arthritis in south central Kansas. *Clin Orthop Relat Res.* 1998; (346): 207-14.
42. JANEWAY CAJR, MEDZHITOV R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20: 197-216.
43. JOSHI A, PANCARI G, COPE L, BOWMAN EP, CUA D, PROCTOR RA, MCNEELY T. Immunization with *Staphylococcus aureus* iron regulated surface determinant B (IsdB) confers protection via Th17/IL17 pathway in a murine sepsis model. *Hum Vaccin Immunother.* 2012; 8(3): 336-46.
44. JUTRAS I, DESJARDINS M. Phagocytosis: At the crossroads of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005; 21: 511-27.
45. KABIR S. The role of interleukin-17 in the *Helicobacter pylori* induced infection and immunity. *Helicobacter.* 2011; 16(1): 1-8.
46. KASPERKOVITZ PV, KHAN NS, TAM JM, MANSOUR MK, DAVIDS PJ, VYAS JM. Toll-like receptor 9 modulates macrophage antifungal effector function during innate recognition of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Infect Immun.* 2011; 79(12): 4858-67.
47. KAUFFMAN CA. Sporotrichosis. *Clin Infect Dis.* 1999; 29(2): 231-6.
48. KAWAI T, AKIRA S. Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *TRENDS Mol Med.* 2007; 13: 460-69.
49. KAWAI T, AKIRA S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010; 11(5): 373-84.

50. KOEDEL U, ANGELE B, RUPPRECHT T, WAGNER H, ROGGENKAMP A, PFISTER HW, KIRSCHNING CJ. Toll-like receptor 2 participates in mediation of immune response in experimental pneumococcal meningitis. *J Immunol.* 2003;170(1):438-44.
51. KONDO T, KAWAI T, AKIRA S. Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. *TRENDS IMMUNOL.* 2012; 33(9): 449-58.
52. KORN T, OUKKA M, KUCHROO V, BETTELLI E. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Seminars in Immunology.* 2007; 19: 362-371.
53. KRUTZIK SR, OCHOA MT, SIELING PA, UEMATSU S, NG YW, LEGASPI A, LIU PT, COLE ST, GODOWSKI PJ, MAEDA Y, SARNO EN, NORGDARD MV, BRENNAN PJ, AKIRA S, REA TH, MODLIN RL. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med.* 2003; 9(5):525-32.
54. LAMM ME. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu Rev Microbiol.* 1997; 51: 311-40.
55. LEE HJ, CHO JW, KIM SC, KANG KH, LEE SK, PI SH, LEE SK, KIM EC. Roles of p38 and ERK MAP kinases in IL-8 expression in TNF-alpha- and dexamethasone-stimulated human periodontal ligament cells. *Cytokine.* 2006; 35(1-2): 67-76.
56. LI M, CHEN Q, SUN J, SHEN Y, LIU W. Inflammatory response of human keratinocytes triggered by *Sporothrix schenckii* via Toll-like receptor 2 and 4. *J Dermatol Sci.* 2012; 66(1): 80-2.
57. LIEW FY, XU D, BRINT EK, O'NEILL LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5(6):446-58.
58. LIN Y, SLIGHT SR, KHADER SA. Th17 cytokines and vaccine-induced immunity. *Semin Immunopathol.* 2010; 32(1): 79-90.
59. LIU G, ZHANG L, ZHAO Y. Modulation of immune responses through direct activation of Toll-like receptors to T cells. *Clin Exp Immunol,* 2010; 160: 168-75.
60. LOPES JO, ALVES SH, MARI CR, BRUM LM, WESTPHALEN JB, ALTERMANN MI, PRATES FB. Epidemiology of sporotrichosis in the central region of Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999; 32: 541-45.
61. LOPES-BEZERRA LM, SCHUBACH A, COSTA RO. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *An Acad Bras Cienc.* 2006; 78: 293-308.

62. LOURES FV, PINA A, FELONATO M, CALICH VL. TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. *J Immunol.* 2009; 183(2): 1279-90.
63. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1): 265-75.
64. LUTZ A, SPLENDORE A. Sobre uma micose observada em homens e ratos. *Rev Med São Paulo.* 1907; 21: 433-50.
65. MADRID IM, MATTEI AS, FERNANDES CG, NOBRE MO, MEIRELES MCA. Epidemiological findings and laboratory evaluation of Sporotrichosis: A Description of 103 cases in cats and dogs in Southern Brazil. *Mycopathologia.* 2012; 173: 265-73.
66. MAIA DC, SASSÁ MF, PLACERES MC, CARLOS IZ. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia.* 2006; 161(1): 11-9.
67. MANGAN PR, HARRINGTON LE, O'QUINN DB, HELMS WS, BULLARD DC, ELSON CO, HATTON RD, WAHL SM, SCHOEB TR, WEAVER CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature.* 2006; 441: 231-34.
68. MARCINKIEWICZ J. Nitric oxide and antimicrobial activity of reactive oxygen intermediates. *Immunopharmacol.* 1997; 37: 35-41.
69. MARQUES AS, FRANCO, SRVS, CAMARGO RMP, DIAS LDF, JÚNIOR VH, FABRIS VE. Esporotricose do gato doméstico (*Felis catus*): transmissão humana. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1993; 35(4): 327-30.
70. MARSHALL RI. Gingival defensins: linking the innate and adaptive immune responses to dental plaque. *Periodontol 2000.* 2004; 35: 14-20.
71. MCGETTRICK AF, O'NEILL LA. Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. *Curr Opin Immunol.* 2010; 22(1): 20-7.
72. MEIER A, KIRSCHNING CJ, NIKOLAUS T, WAGNER H, HEESEMANN J, EBEL F. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. *Cell Microbiol* 2003; 5(8):561-70.
73. MÉNDEZ-TOVAR LJ, ANIDES-FONSECA AE, PEÑA-GONZÁLEZ G, MANZANO-GAYOSSO P, LÓPEZ-MARTÍNEZ R, HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ F, ALMEIDA-ARVIZU VM. Unknown fixed cutaneous sporotrichosis. *Rev Iberoam Micol.* 2004; 21(3): 150-2.

74. MENDOZA M, DIAZ E, ALVARADO P, ROMERO E, BASTARDO DE ALBORNOZ MC. Isolation of *Sporothrix schenckii* from environmental samples in Venezuela. *Rev Iberoam Micol.* 2007; 24(4): 317-9.
75. MESQUITA JR D, CRUVINEL WM, CÂMARA NO, KÁLLAS EG, ANDRADE LE. Autoimmune diseases in the TH17 era. *Braz J Med Biol Res.* 2009; 42(6): 476-86.
76. MORITA Y, YAMAMURA M, KAWASHIMA M, HARADA S, TSUJI K, SHIBUYA K, MARUYAMA K, MAKINO H. Flow cytometric single-cell analysis of cytokine production by CD4+ T cells in synovial tissue and peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1998; 41(9): 1669-76.
77. MORRIS-JONES R, YOUNGCHIM S, GOMEZ BL, AISEN P, HAY RJ, NOSANCHUK JD, CASADEVALL A, HAMILTON AJ. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. *Infect Immun.* 2003; 71: 4026-33.
78. MOSELEY TA, HAUDENSCHILD DR, ROSE L, REDDI AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003; 14(2): 155-74.
79. MOSSER DM, EDWARDS JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8(12): 958-69.
80. MUTHUKURU M, JOTWANI R, CUTLER CW. Oral mucosal endotoxin tolerance induction in chronic periodontitis. *Infect Immun.* 2005; 73(2): 687-94.
81. NASCIMENTO RC, ALMEIDA SR. Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005; 43(2): 241-7.
82. NEGRINI TC, FERREIRA LS, ARTHUR RA, SUNDFELD PP, MAIA DCG, ALEGRANCI P, SPOLIDORIO LC, CARLOS IZ. Role of TLR-2 and fungal surface antigens on innate immune response against *Sporothrix schenckii*. *Immunol Invest.* 2012; x:xxx. (in press).
83. NETEA MG, SUTMULLER R, HERMANN C, VAN DER GRAAF CA, VAN DER MEER JW, VAN KRIEKEN JH, HARTUNG T, ADEMA G, KULLBERG BJ. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol.* 2004a; 172(6):3712-8.
84. NETEA MG, VAN DE VEERDONK F, VERSCHUEREN I, VAN DER MEER JW, KULLBERG BJ. Role of TLR1 and TLR6 in the host defense against disseminated candidiasis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008; 52(1):118-23.

85. NETEA MG, VAN DER GRAAF CA, VONK AG, VERSCHUEREN I, VAN DER MEER JW, KULLBERG BJ. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis.* 2002; 185: 1483-9.
86. NETEA MG, WARRIS A, VAN DER MEER JW, FENTON MJ, VERVER TJ, JACOBS LE, ANDRESEN T, VERWEIJ PE, KULLBERG BJ. *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition during germination through loss of toll-like receptor-4-mediated signal transduction. *J Infect Dis.* 2003; 188: 320-26.
87. NETEA MG, WARRIS A, VAN DER MEER JW, FENTON MJ, VERVER TJ, JACOBS LE, ANDRESEN T, VERWEIJ PE, KULLBERG BJ. *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition during germination through loss of toll-like receptor-4-mediated signal transduction. *J Infect Dis.* 2003; 188: 320-26.
88. NOBEN-TRAUTH N. Conventional naive CD4+ T cells provide in initial source of IL-4 during Th2 differentiation. *J Immunol.* 2000; 165: 3620-25.
89. ODA LM, KUBELKA CF, ALVIANO CS, TRAVASSOS LR. Ingestion of yeast forms of *Sporothrix schenckii* by mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun.* 1983; 39(2) : 497-504.
90. OUYANG W, KOLLS JK, ZHENG Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity.* 2008; 28: 454-67.
91. PETERSON RA. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicol Pathol.* 2012; 40(2): 186-204.
92. PLUSS JL, OPAL SM. Pulmonary sporotrichosis: review of treatment and outcome. *Medicine (Baltimore).* 1986; 65(3): 143-53.
93. POLONELLI L, MORACE G. Exoantigen Studies of *Sporothrix schenckii*, *Ceratocystis minor*, and *Graphium penicilliodes* cultures. *J Clin Microbiol.* 1982; 15(3): 362-5.
94. POPOV SV, POPOVA GY, OVODOVA RG, BUSHNEVA OA, OVODOV YS. Effects of polydactharide from *Silene vulgaris* on phagocytes. *Int J Immunopharmacol.* 1999; 21: 617-24.
95. ROCHA MM, DASSIN T, LIRA R, LIMA EL, SEVERO LC, LONDERO AT. Sporotrichosis in patient with AIDS: report of a case and review. *Rev Iberoam Micol.* 2001; 18(3): 133-6.
96. ROMANI L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4: 1-23.

97. ROMANI L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11(4): 275-88.
98. ROMERO-MARTINEZ R, WHEELER M, GUERRERO-PLATA A, RICO G, TORRES-GUERRERO H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect Immun*. 2000; 68(6): 3696-703.
99. SASSÁ MF, FERREIRA LS, RIBEIRO LC, CARLOS IZ. Immune response against *Sporothrix schenckii* in TLR-4-deficient mice. *Mycopathologia*. 2012; 174(1): 21-30.
100. SASSÁ MF, SATURI AE, SOUZA LF, RIBEIRO LC, SGARBI DB, CARLOS IZ. Response of macrophage Toll-like receptor 4 to a *Sporothrix schenckii* lipid extract during experimental sporotrichosis. *Immunology*. 2009; 128(2): 301-9.
101. SCHUBACH A, BARROS MB, WANKE B. Epidemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2008; 21(2): 129-33.
102. SGARBI DBG, SILVA AJR, CARLOS IZ, SILVA CL, ANGLUSTER J, ALVIANO CS. Isolation of ergosterol peroxide and its reversion to ergosterol in the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*. 1997; 139: 9-12.
103. SILVA MBT. Distribuição sócio-espacial da esporotricose humana de pacientes atendidos no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas no período de 1997 a 2007, residentes no Estado do Rio de Janeiro. Dissertação apresentada em Ciências de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, 2010.
104. SOUZA LL, NASCENTE PS; NOBRE MO; MEINERZ ARM; MEIRELES MCA. Isolation of *Sporothrix Schenkii* from the nails of healthy cats. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2006; 37: 372-74.
105. SWASON JA, HOPPE AD. The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol*. 2004; 76: 1093-1103.
106. SZABO SJ, SULLIVAN BM, PENG SL, GLIMCHER LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21: 713-58.
107. TABORDA CP, DA SILVA MB, NOSANCHUK JD, TRAVASSOS LR. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a mini review. *Mycopathologia*. 2008; 165(4-5): 331-39.
108. TAKEDA K, AKIRA S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 2005; 17(1): 1-14.

109. TAKEDA K, KAISHO T, AKIRA S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21: 335-76.
110. TEIXEIRA MM, ALMEIDA IC, GAZZINELLI RT. Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. *Microbes Infect.* 2002; 4(9):883-6.
111. TORRE D, SPERANZA F, MARTEGANI R. Role of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in the immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet Infect Dis.* 2002;2(12):719-20.
112. UNDERHILL DM, OZINSKY A, HAJJAR AM, STEVENS A, WILSON CB, BASSETTI M, ADEREM A. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature.* 1999;401(6755):811-5.
113. VADIVELLO PK, VAIRO G, HERTZOG P, KOLA I, HAMILTON JA. Role of type I interferons during macrophage activation by lipopolysaccharide. *Citokine Res.* 2000; 12(11): 1639-46.
114. VERDAN FF, FALEIROS JC, FERREIRA LS, MONNAZZI LG, MAIA DC, TANSINE A, PLACERES MC, CARLOS IZ, SANTOS-JUNIOR RR. Dendritic cell are able to differentially recognize *Sporothrix schenckii* antigens and promote Th1/Th17 response in vitro. *Immunobiology.* 2012; 217(8): 788-94.
115. VILLAMÓN E, GOZALBO D, ROIG P, O'CONNOR JE, FERRANDIZ ML, FRADELIZI D ET AL. Toll-like receptor-2 is dispensable for acquired host immune resistance to *Candida albicans* in a murine model disseminated candidiasis. *Microbes Infect.* 2004b; 6: 542-8.
116. VILLAMÓN E, GOZALBO D, ROIG P, O'CONNOR JE, FRADELIZI D, GIL ML. Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections. *Microbes Infect.* 2004a; 6: 1-7.
117. VOLPE E, SERVANT N, ZOLLINGER R, BOGIATZI SI, HUPÉ P, BARILLOT E, SOUMELIS V. A critical function for transforming growth factor- β , interleukin-23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human Th17 responses. *Nat Immunol.* 2008; 9(6): 650-7.
118. WEAVER CT, HATTON RD, MANGAN PR, HARRINGTON LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:821-52.
119. WING ED, Remington JS. In: Basic and clinical Immunology. 1980; 129-143.

120. WING JB, SAKAGUCHI S. Multiple treg suppressive modules and their adaptability. *Front Immunol.* 2012; 3: 178.
121. YE P, RODRIGUEZ FH, KANALY S, STOCKING KL, SCHURR J, SCHWARZENBERGER P, OLIVER P, HUANG W, ZHANG P, ZHANG J et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med.* 2001; 194: 519–27.
122. ZHANG Z, LIU X, LV X, LIN J. Variation in genotype and higher virulence of a strain of *Sporothrix schenckii* causing disseminated cutaneous sporotrichosis. *Mycopathologia.* 2011; 172(6): 439-46.

CAPÍTULO II

Artigo aceito para publicação

Open Access is available for your article

Entrada x

UNESP x



Robert.Joy@informausa.com

para carlosiz

inglês
português

[Traduzir mensagem](#)

[Desativar para: inglês](#)

Iracilda Carlos
carlosiz@fctar.unesp.br
08 Aug 2012

Your article listed below is currently in production with Informa Healthcare.

Journal: LImm **Immunological Investigations**

Manuscript ID: 719982

Manuscript Title: Role of TLR-2 and fungal surface antigens on innate immune response against *Sporothrix schenckii*

By: Negrini; Ferreira; Alegranci; Arthur; Sundfeld; Maia; Spolidorio; Carlos

Articles in **Immunological Investigations** are eligible for Open Access. Electing this option allows the article to be made freely available online under a Creative Commons License. The Open Access service requires registration with Rightslink, and payment of a fee. Selection of Open Access is strictly at the author's discretion, and is not required for publication.

Full details of our Open Access program are available by clicking the link below. Please click the link below to learn more about Open Access and to select this service for your article:

<http://cats.informa.com/PTS/go?t=rl&o=oa&m=719982>

If you have questions about Open Access please contact iopenaccess@taylorandfrancis.com

Yours sincerely,
Robert Joy
Production Editor
Email: Robert.Joy@informausa.com
Phone: [212-520-2725](tel:212-520-2725)
Fax: [646-666-9851](tel:646-666-9851)

Informa Healthcare
52 Vanderbilt Avenue, 7th Floor
New York
NY
10017
USA

Role of TLR-2 and fungal surface antigens on innate immune response against *Sporothrix schenckii*

Running Head: TLR-2 and immune response against *S. schenckii*

Thais de C. Negrini¹; Lucas S. Ferreira¹; Pâmela Alegranci¹; Rodrigo A. Arthur²; Pedro P. Sundfeld¹; Danielle C. G. Maia¹; Luis C. Spolidorio³; Iracilda Z. Carlos¹

¹Department of Clinical Analysis, Araraquara School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University, SP, Brazil, ²Department of Preventive and Community Dentistry, Indiana University School of Dentistry, Indiana, USA, ³Department of Physiology and Pathology, Araraquara School of Dentistry, São Paulo State University, SP, Brazil.

Keywords: *Sporothrix schenckii*, macrophages, TLR-2, cytokines, phagocytosis, mice.

Correspondence: Iracilda Z. Carlos, Department of Clinical Analysis, Araraquara School of Pharmaceutical Sciences, Sao Paulo State University, Rua Expedicionários do Brasil, nº 1621, Araraquara, SP, CEP 14.801-902. Brazil. Tel: +55 16 33015713; Fax: +55 16 33016945 e-mail: carlosiz@cfar.unesp.br

Abstract

Sporotrichosis is an infection caused by the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*. Toll-like receptors (TLRs) play an important role in immunity, since they bind to pathogen surface antigens and initiate the immune response. However, little is known about the role of TLR-2 and fungal surface antigens in the recognition of *S. schenckii* and in the subsequent immune response. This study aimed to evaluate the involvement of TLR-2 and fungal surface soluble (SolAg) and lipidic (LipAg) antigens in phagocytosis of *S. schenckii* and production of immune mediators by macrophages obtained from WT and TLR-2^{-/-} animals. The results showed that TLR-2^{-/-} animals had statistical lower percentage of macrophages with internalized yeasts compared to WT. SolAg and LipAg impaired phagocytosis and immunological mediator production for both WT and TLR-2^{-/-}. The absence of TLR-2 led to lower production of the cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-12 and IL-10 compared to WT animals. These results suggest a new insight in relation to how the immune system, through TLR-2, recognizes and induces the production of mediators in response to the fungus *S. schenckii*.

Introduction

Sporotrichosis is a chronic granulomatous mycosis caused by dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*. It is well known that in the host tissue this fungus grows as yeast, whereas it grows as conidia or hyphae in the environment (Gori et al., 1997, Méndez Tovar et al., 2004). The traumatic inoculation of conidia and hyphae of *S. schenckii* into the skin results in the development of a subcutaneous mycosis that could disseminate to other organs through lymphatic vessels (Nascimento and Almeida, 2005, Appenzeller et al., 2006).

Recognition of microorganisms by innate immune system is the first line of host defense (Underhill and Ozinsky, 2002). Therefore, the contact between pathogen and host cell is the first step in the activation of a rapid immunological response. Toll-like receptors

(TLRs), found in the cell membranes of phagocytes, such as macrophages, are one of the structures responsible for the initial recognition of pathogens and preventing their infection into host tissues. These receptors activate the innate immune response due to the recognition of specific pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). These receptors are able to recognize different pathogens (Romani, 2004, Akira et al., 2006, Kawai and Akira, 2007) and, in addition, distinguish infectious agents from host constituents. PAMPs are found on the surface of microorganisms, such as lipopolysaccharides and peptidoglycan present in gram-negative and gram-positive bacteria, respectively, and β -glucan present on the surface of fungi (Liew et al., 2005). The presence of PAMPs on pathogen cell surface might be related, to some extent, to the virulence of these microorganisms. This suggests that an effective immune response is directly related to the recognition of PAMPs by TLRs of macrophages.

In this context, it has been demonstrated that the recognition of several fungi is TLR-mediated. Studies show that TLR-2 and TLR-4 are crucial for the recognition of PAMPs of *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* (Underhill et al., 1999, Meier et al., 2003, Braedel et al., 2004). Netea et al., showed that mice TLR-4 deficient had an increased susceptibility to *Candida albicans* infection (Netea et al., 2002). On the other hand, Netea et al., also showed that the absence of TLR-2 on phagocytes increased the resistance to candidiasis (Netea et al., 2004). The authors suggested that this increased resistance could be the result of a reduced production of anti-inflammatory cytokines (but not pro-inflammatory cytokines). This might have led to an enhanced recruitment of leukocytes to sites of infection, increasing activity against *Candida* and decreasing the number of cells CD4 + CD25 + Treg. However, previous results of our research group suggest a reduction in the synthesis of pro- and anti-inflammatory mediators in mice TLR-4 deficient in relation to the recognition of *S. schenckii* indicating their involvement in the immune response against this fungus (Sassá et

al., 2009). Nevertheless, there are no reports on the involvement of TLR-2 in the recognition of this fungus and in the subsequent immune response.

Additionally, past studies state that cell-surface-antigens present on the cell-wall of *S. schenckii* (either as hyphae or as yeast) might induce host-antibodies production (Polonelli and Morace, 1982, Castillo et al., 1990, Sgarbi et al., 1997, Carlos et al., 1999, Fernades et al., 2000). Interestingly, our research group has showed a decreased production of IL-1 β and TNF- α by macrophages pre-incubated with extracted soluble cell-surface antigen of *S. schenckii* (Carlos et al., 1994). Other studies suggest that fungal cell surface lipids might inhibit phagocytosis by peritoneal macrophages as well presenting a possible fungal escape mechanism against the host immune response during infection (Oda et al., 1983, Carlos et al., 2003).

Therefore, the present study sought to evaluate the involvement of TLR-2 and fungal surface soluble and lipidic antigens in phagocytosis of *S. schenckii* by macrophages. This was carried out to clarify the role of this particular receptor and antigens in the immunity against that fungus. The results suggest that TLR-2 is important in phagocytosis of *S. schenckii* and induces production of inflammatory mediators in response to this fungus. Also, it seems that both cell surface antigens impair phagocytosis and the production of immunological mediators. This knowledge contributes to a better understanding of the innate immune response mechanisms against this pathogen.

Materials and methods

Microorganism and culture conditions

Sporothrix schenckii, strain 1099-18, isolated from a human clinical case of sporotrichosis from section of the Mycology Department of Dermatology, Columbia University, New York,

NY, USA, was used in all experiments. This strain was provided by Dr. Celuta Sales Alviano, Institute of Microbiology, Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil. The fungus was grown at 37°C for 8 days in Brain–Heart Infusion broth (BHI; Difco Laboratories, Detroit, MI) under constant agitation at 150 cycles/min, in order to result in a suspension of yeast cells.

Lipid and soluble antigens extraction

Soluble (SolAg) and lipid (LipAg) antigens were extracted from yeast cells resuspended in 10 mL of sterile Phosphate Buffered Saline (pH 7.4). The suspension was sonicated at 50 W (MSE Ultrasonic Disintegrator; kenosis AVE, Danbury, USA) during 10 cycles of 20 minutes each with intervals of 2 minutes between each cycle. The suspension was centrifuged for 1 hour at 700 x g and 5°C (Hettich Zentrifugen, D-78532, Germany). SolAg was obtained from the supernatant, which was collected and sterilized by filtration (0.22 µm)(Carlos et al., 1992). The protein concentration in the supernatant was determined by method of Lowry (Lowry et al., 1951). LipAg was obtained from the pellet by soaking in chloroform: methanol (2:1 v/v), with stirring at room temperature for 2h. The extract was separated by centrifugation at 5000 x g for min, and the insoluble residue was re-extracted three more times as described. The component was called LipAg (Carlos et al., 2003). Both SolAg e LipAg were diluted in RPMI-1640C medium (containing 2β-mercaptoethanol 0.02 mM, penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 U/ml, L-glutamine 2 mM and 5% fetal bovine serum). The cytotoxicity effect of these antigens concentrations tested on cultured macrophages was assessed by the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay, as described by Mosman, 1983 and provided rate of cell viability above 70% for both concentrations of antigens.

Animals

Female mice of C57BL/6 Wild type (WT) and C57BL/6 TLR-2 Knockout (TLR-2^{-/-}) lineages (6 to 8 weeks-old; weight from 20 to 25 grams) were obtained from School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo-USP (Brazil). The animals were kept in plastic cages in a room with temperature (21 ± 1°C), humidity (65 -75%) and light cycle (12 h light – 12 h dark) controlled. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee in Research of the University Center of Araraquara (# 940/2009) and was conducted in conformity with the standards of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA).

Macrophages and culture conditions

Macrophages were obtained from peritoneal exudates of WT and TLR-2^{-/-} animals. Briefly, aqueous solution of 3% of sodium thioglycollate (Difco) was inoculated into the abdominal cavity of those animals. Three-days later, the peritoneal exudates was collected, washed with 5 ml of sterile PBS (pH 7,4) and resuspended in RPMI-1640C medium. The macrophages were then counted in a Neubauer chamber (Boeco, Germany).

Analysis of phagocytosis by macrophages

For phagocytosis assays, 500 uL of RPMI-1640C (containing approximately 10⁵ macrophages) were transferred to 4-well chamber slides (1.8 cm²/well; LabTek: Nunc, Naperville IL) and incubated at 37°C, 5% CO₂ for 2 hours. The medium was removed and the same volume of fungal suspension (containing approximately 2 x 10⁷ yeasts) was added to the layer of adherent macrophages and additionally incubated for 2 hours. The suspension was then collected and the slides were stained with Giemsa (Sigma) and analyzed under an optical microscope (100 x magnification; Axiostar plus) by a single examiner. The percent of phagocytosis of *S. schenckii* by macrophages was expressed as the percentage of macrophages

with internalized yeast within a total of 200 macrophages analyzed per well. As a negative control of phagocytosis, macrophages were incubated with 10 μ M of cytochalasin D (CD) (Sigma) in RPMI-1640C containing 0.1% DMSO (Synth). As a control for cytotoxicity, macrophages were cultured with RPMI-1640C containing only 0.1% DMSO. Macrophages were also pre-exposed to SolAg and LipAg for further evaluation of the percent of phagocytosis. Prior to incubation with a fungal suspension, macrophages were pre-incubated with 500 μ L of SolAg (37.2 mg/mL) or LipAg (115.2 mg/mL) in RPMI-1640C for 1 h at 37°C and 5% CO₂. The RPMI-1640C was removed from each well and the same volume of fungal suspension (containing approximately 2×10^7 yeasts) was added to the layer of adherent macrophages and additionally incubated for 2 hours. The percent of phagocytosis was determined as described above. All the assays were performed in duplicate in three independent experiments.

Measurement of cytokines

Cytokines IL-1 β , IL-12, IL-10 and TNF- α were quantified in supernatants of macrophage cultures of all tested conditions using ELISA assay (BD Opt™, BD Pharmigen). The analysis was performed in duplicate in three independent experiments and the results were expressed in pg/ml.

Statistical analysis

The results of the percent of phagocytosis and cytokine production by macrophages incubated only with fungal suspension and by those pre-incubated with antigens or CD were statistically analyzed. All data were ranked and submitted to two-way analysis of variance (ANOVA) on ranks, considering animals at two levels (WT and TLR-2^{-/-}) and treatments at 4 levels (fungus only, fungus + SolAg, fungus + LipAg, CD). Bonferroni test was applied. The statistical

program used was GraphPad Prism 5 for Windows (San Diego, USA). The level of significance was 5%.

Results

Analysis of phagocytosis by macrophages of WT and TLR-2^{-/-} animals

Considering a total of 200 macrophages per well, the highest percentage of macrophages with internalized yeasts were found in those exposed only to fungal suspension (90.1% of macrophages of WT and 5.6% of macrophages of TLR-2^{-/-} animals) ($p < 0.001$) (Figure 1). However, there was no statistically significant difference in percentage of macrophages with internalized yeasts when pre-incubated with the antigens (7% in the presence of SolAg and 7.5% in the presence of LipAg for WT; 3.25% in the presence of SolAg and 2.5% in the presence of LipAg for TLR-2^{-/-}). The lowest percentage of macrophages with internalized yeasts were found in those pre-treated with CD (Figure 1). In addition, for macrophages pre-incubated only with fungus and with antigens the percent of phagocytosis was statistically higher in WT animals compared to animals TLR-2^{-/-}. A statistically significant interaction between the factors animal and treatment was found ($p < 0.001$). In both animals, internalized yeasts were clearly found inside the vacuoles in the cytoplasm of macrophages (Figure 2). No cytotoxic effect was found due to incubation of macrophages in DMSO solution (data not shown).

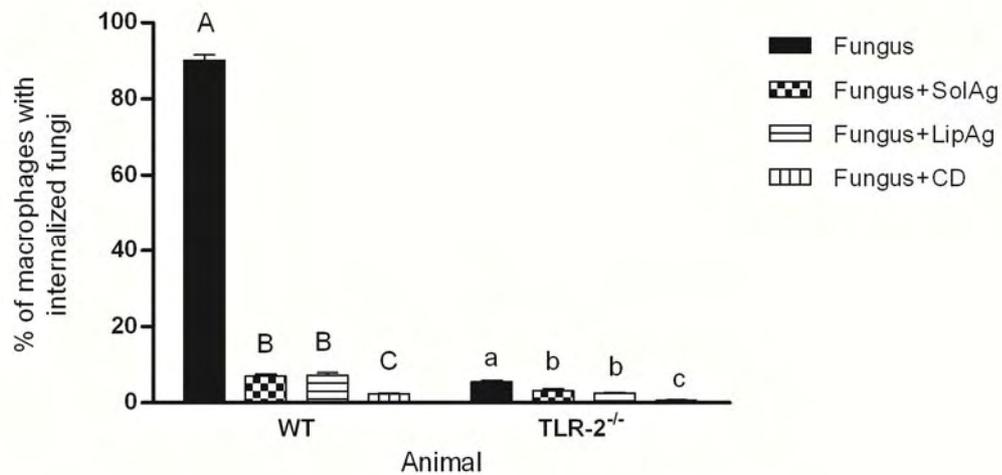


Figure 1. Analysis of the percent of phagocytosis of *S. schenckii* by macrophages isolated from WT and TLR-2^{-/-} animals. Macrophages were incubated for 2 hours with fungal suspension (Fungus). In addition, inhibition of phagocytosis was evaluated in macrophages incubated with SolAg, LipAg or CD prior to incubation with a fungal suspension (groups Fungus + SolAg, Fungus +LipAg, and Fungus + CD). Samples were stained with Giemsa and analyzed by optical microscopy under 100x magnification. The efficiency of *S. schenckii* internalization was expressed as the mean \pm standard deviation of the percentage of macrophages with internalized fungus, considering 200 macrophages per well, in each of the tested conditions. Results were obtained from three distinct experiments. Distinct capital letters mean statistical difference among each tested condition within WT animals. Distinct lower case letters mean statistical difference among each tested condition within TLR-2^{-/-} animals.

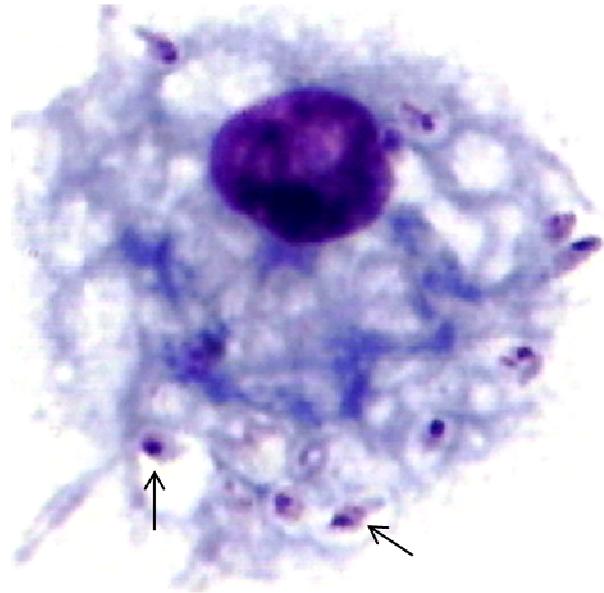


Figure 2. Phagocytosis of *S. schenckii* by macrophages. Adherent macrophages were incubated with *S. schenckii* for 2 hours, stained with Giemsa and analyzed by optical microscope under 100x magnification. Macrophage from WT animal. Arrows indicate internalized yeasts.

Analysis of cytokines release by macrophages of WT and TLR-2^{-/-} animals

For the WT animals, the production of TNF- α , IL-1 β , IL-12 by macrophage pre-incubated with SolAg and LipAg was lower when compared to that of macrophages incubated only with a fungal suspension (Figure 3a, 3b and 3c). For the TLR-2^{-/-} animal, the production of TNF was statistically higher in macrophages pre-incubated only with fungus and soluble antigen compared to those incubated with lipidic antigen (Figure 3a). For IL-1 β , statistically higher production was found in macrophages pre-incubated only with fungus and lipid antigen compared to those incubated with soluble antigen (Figure 3b). In addition, there was no production of IL-12 by macrophages of TLR-2^{-/-} animals in any of the conditions evaluated (Figure 3c). For both WT and TLR-2^{-/-} animals, there was IL-10 production by macrophages incubated only with the fungal suspension (Figure 3d). Additionally, cytokine production was statistically higher in WT animals compared to TLR-2^{-/-} animals both by macrophages

incubated with a fungal suspension only and those pre-incubated with antigens (Figure 3). A statistically significant interaction between the factors animal and treatment was found for all the cytokines evaluated ($p < 0.001$).

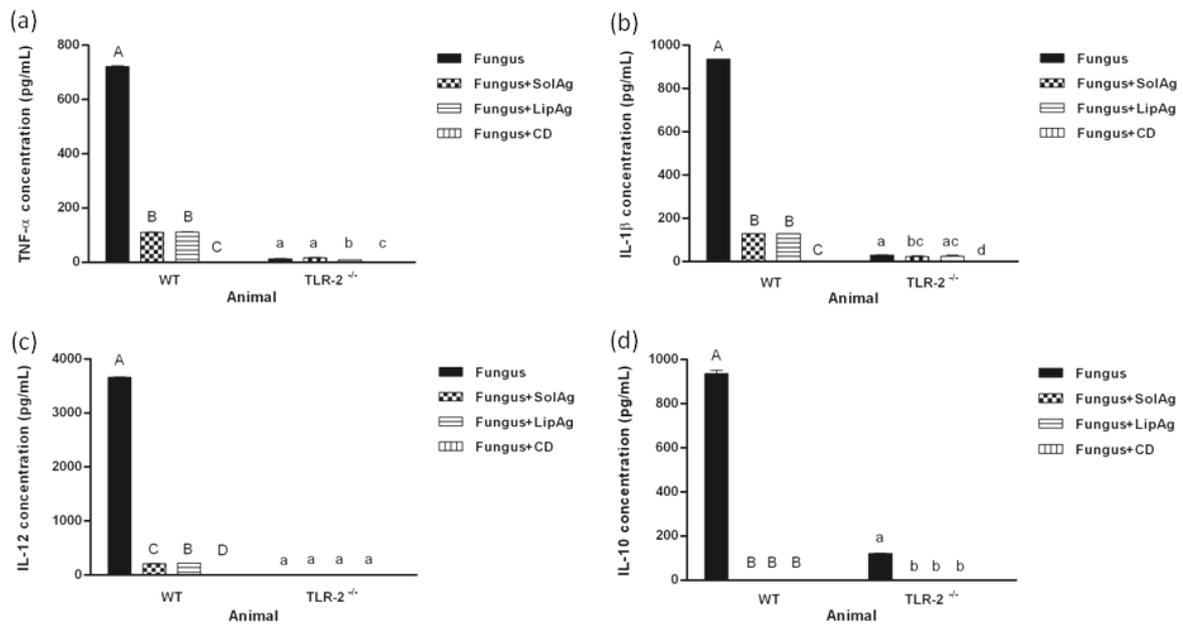


Figure 3. Production of TNF- α (a), IL-1 β (b), IL-12 (c) and IL-10 (d) by macrophages of WT and TLR-2^{-/-} animals. The production of cytokines was analyzed by ELISA in the supernatants of cultures of adherent macrophages obtained from each of the lineages. Macrophages were incubated with SolAg, LipAg or CD prior to incubation with a fungal suspension (groups Fungus + SolAg, Fungus + LipAg and Fungus + CD) or only incubated with a fungal suspension (Fungus). The results are expressed in pg/mL and represent the mean \pm standard deviation of the cytokine dosage of three independent experiments. Distinct capital letters mean statistical difference among each tested condition within WT animals. Distinct lower case letters mean statistical difference among each tested condition within TLR-2^{-/-} animals.

Discussion

The aim of this study was to evaluate the role of TLR-2 and fungal cell surface antigens in phagocytosis and production of immune mediators by macrophages exposed to the fungus *S. schenckii*. The results suggest that the absence of TLR-2 leads to a significant reduction in phagocytosis (Figures 1 and 2). These results agree with those of Tessarolli et al., who demonstrated that macrophages from TLR-2^{-/-} animals had lower phagocytic activity against *Candida albicans* when compared to macrophages obtained from WT animals (Tessarolli et al., 2010). In addition, Gelani et al., studying the role of TLR-2 in the signaling pathway during the immune response against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* found a lower percent of phagocytosis by macrophages and neutrophils of TLR2^{-/-} animals compared to WT ones (Gelani et al., 2009). Moreover, Li et al., sought to clarify whether human keratinocytes play immunological roles in the inflammatory response during the early phase of *S. schenckii* infection through TLR2 and TLR4. Keratinocytes obtained from neonatal foreskin were treated by conidia and yeast of *S. schenckii*. Real-time RT-PCR was used to determine the mRNA expression of IL-6, 8, and TLR2, 4 and the results indicated that conidia and yeast of *S. schenckii* triggered the inflammatory responses characterized by production of cytokine and chemokine (IL-6 and IL-8) and activation of the TLR2 and TLR-4 (Li et al., 2012).

Cells of the innate immune system express receptors (found in their cell wall) that stimulate the production of cytokines by phagocytes when certain molecular patterns associated with pathogens (PAMPs) are recognized. The recognition of PAMPs might drive the adaptive response. Several fungal surface components can be recognized by cells of the innate immune system through different receptors leading as a consequence to different immune responses. The results of the present study suggest that SolAg and LipAg might impair the process of phagocytosis for both WT and TLR-2^{-/-} animals (Figure 1). We

hypothesized that these fungal surface antigens might block the binding of the fungus to macrophages which explains the reduced percentage of cells with internalized yeasts in macrophages pre-exposed to antigens in comparison to those only exposed to fungus. It is unclear at this point which receptor is blocked by the antigens, but the results suggest that the absence of TLR-2 enhanced this effect, since the percentage of cells with internalized yeasts was lower in TLR-2^{-/-} animals compared to WT.

The evaluation of cytokines released by macrophages during phagocytosis assays show that the contact between TLR-2 and pathogen is also required for the release of TNF- α , IL-1 β , IL-12 and IL-10 (Figure 3). However, it seems that the production of IL-10 is not exclusively dependent on the TLR-2, since this cytokine was also detected in TLR-2^{-/-} animals (Figure 3d). This result could indicate that other macrophage surface-receptors, such as mannose receptor and dectin-1 (van de Veerdonk et al., 2008), might be involved in fungus recognition leading to the production of anti-inflammatory cytokines including IL-10. Besides, as macrophages were obtained from animals not infected with *S. schenckii* our results suggest a direct and primary effect of *S. schenckii* on the production of these cytokines. In addition to that, as a consequence of their effect on phagocytosis both antigens inhibited the production of all four cytokines by macrophages of WT and TLR-2^{-/-} animals.

Netea et al., investigating the role of TLRs on immune response, showed that macrophages of TLR-4 deficient animals produced less proinflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β when compared to WT animals when stimulated with conidia of the fungus *Aspergillus fumigatus* (Netea et al., 2003). Biondo et al., investigated the role of TLR-2, TLR-4 and MyD88 protein in immune response to *Cryptococcus neoformans* and found a reduced production of TNF- α , IL-12 and IFN- γ in several organs during infection in TLR-2^{-/-} and MyD88^{-/-} animals compared to WT ones, suggesting the involvement of TLR-2 and MyD88 protein in the anti-cryptococcal immune response. However, Biondo et al., also verified that

there was no involvement of TLR-4 in the immune response against this pathogen Biondo et al., 2005. van de Graff et al., studying blastoconidia and hyphae of *Candida albicans*, demonstrated that TLR-2 and TLR-4 participate in the immune response against this fungus in different ways: TLR-4 induces the production of inflammatory cytokines IFN- γ and TNF- α when stimulated by blastoconidia. However, hyphae were not recognized by this receptor but have induced higher production of IL-10 through TLR-2. The phenotypic change during the germination of this organism might suggest a mechanism of evading this pathogen since it results in a neutralization of the host response (van der Graff et al., 2005).

In addition, in a previous study conducted in our laboratory, Sassá et al., demonstrated the involvement of TLR-4 in the production of proinflammatory (NO, IL-1 β and TNF- α) and anti-inflammatory (IL-10) mediators during infection by *S. schenckii* (Sassá et al., 2009). On the other hand, and in addition to the findings of Sassá et al., the results of the present study suggest that the recognition of the fungus by TLR-2 is critical for the release of proinflammatory and anti-inflammatory mediators. Altogether, these results contribute to a better understanding of the mechanisms involved in the immune response to this fungal infection, considering both fungal surface components and phagocyte receptors involved in this interaction are poorly understood.

Overall, recent studies have suggested that pathogenic fungus can modulate or interfere in the mechanisms of recognition of immune system, either by inducing TLR-mediated immunosuppression or simply by evading recognition by these classes of receptors, preventing the development of an effective immune response. Netea et al., demonstrated that *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition by germination into hyphae, with subsequent loss of TLR4-recognition, while the TLR2-mediated IL-10 pathways remain intact, thus shifting the balance towards a permissive Th2-type profile (Netea et al., 2003). In another evaluation, Netea et al., showed that *Candida albicans* induces immunosuppression

through TLR2-mediated IL-10 release, and this leads to generation of CD4⁺ CD25⁺ T-regulatory cells with immunosuppressive potential (Netea et al., 2004). Thus, signals mediated by TLRs are not only beneficial to the host, but in certain instances can be used as a defense mechanism favoring the pathogen (Netea et al., 2006). The results of the present study suggest that fungal surface soluble and lipidic antigens might impair phagocytosis and the production of immunological mediators. It seems that these effects are enhanced in the absence of TLR-2. In addition, the results also suggest a new insight about how the immune system, through TLR-2, recognizes and induces the production of immunological mediators in response to the fungus *S. schenckii*. Further investigations are needed to detail the impact of this receptor in the infection itself.

Acknowledgments

The authors are grateful to Marisa Campos Polesi Placeres for technical support. This work was supported by grants from the The State of Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) (grants number 2009/07529-1 and 2009/11999-3).

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006; 124:783-801.

Appenzeller S, Amaral TN, Amstalden EM, Bertolo MB, Neto JF, Samara AM, Fernandes SR. *Sporothrix schenckii* infection presented as monoarthritis: report of two cases and review of the literature. *Clin Rheumatol*. 2006; 25:926-928.

Biondo C, Midiri A, Messina L, Tomasello F, Garufi G, Catania MR, Bombaci M, Beninati C, Teti G, Mancuso G. MyD88 and TLR2, but not TLR4, are required for host defense against *Cryptococcus neoformans*. *Eur J Immunol*. 2005; 35:870-878.

Braedel S, Radsak M, Einsele H, Latgé JP, Michan A, Loeffler J, Haddad Z, Grigoleit U, Schild H, Hebart H. *Aspergillus fumigatus* antigens activate innate immune cells via toll-like receptors 2 and 4. *Br J Haematol*. 2004; 125:392-399.

Bustamente B, Campos PE. Endemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2001; 14:145-149.

Carlos IZ, Sgarbi DBG, Santos GC, Placeres MCP. *Sporothrix schenckii* lipid inhibits macrophage phagocytosis, involvement of nitric oxide and tumor necrosis factor- α . *Scandinavian J Immunol*. 2003 ; 57:214-220.

Carlos IZ, Sgarbi DBG, Placeres MCP. Host organism defense by a peptide- polysaccharide extracted from the fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*. 1999; 144:9-14.

Carlos IZ, Zini MM, Sgarbi DBG, Angluster J, Alviano CS, Silva CL. Disturbances in the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor in disseminated murine sporotrichosis. *Mycopathologia*. 1994; 127:189-194.

CARLOS IZ, SGARBI DB, ANGLUSTER J, ALVIANO CS, SILVA CL. Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the systemic form of the disease. *Mycopathologia*. 1992; 117:139-144.

Conti Díaz IA. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. *Mycopathologia*. 1989; 108:113-116.

da Rosa AC, Scroferneker ML, Vettorato R, Gervini RL, Vettorato G, Weber A. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. *J Am Acad Dermatol*. 2005; 52:451-459.

Gelani V, Fernandes AP, Gasparoto TH, Garlet TP, Cestari TM, Lima HR, Ramos ES, de Souza Malaspina TS, Santos CF, Garlet GP, da Silva JS, Campanelli AP. The role of toll-like receptor 2 in the recognition of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Periodontol*. 2009 ; 80:2010-2019.

Gori S, Luppeti A, Moscato G, Parenti M, Lofaro A. Disseminated sporotrichosis in patients with AIDS: case report and review of the literature. *Acta Cytol*. 1997; 41:19-521.

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and ¹⁵N nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982; 126:131-138.

Kawai T, Akira S. Signaling to NF-κB by Toll-like receptors. *TRENDS Mol Med*. 2007; 13:460-469.

Li M, Chen Q, Sun J, Shen Y, Liu W. Inflammatory response of human keratinocytes triggered by *Sporothrix schenckii* via Toll-like receptor 2 and 4. *J Dermatol Sci*. 2012; 66(1):80-2.

Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5:446-458.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193:265-275.

Meier A, Kirschning CJ, Nikolaus T, Wagner H, Heesemann J, Ebel F. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. *Cell Microbiol*. 2003; 5:561-570.

Méndez Tovar LJ, Anides-Fonseca AE, Peña-González G, Manzano-Gayosso P, López-Martínez R, Hernández-Hernández F, Almeida-Arvizu VM. Unknown fixed cutaneous sporotrichosis. *Rev Iberoam Micol.* 2004; 21:150-152.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1-2):55-63.

Nascimento RC, Almeida SR. Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005; 43:241-247.

Netea MG, Van der Meer JW, Kullberg BJ. Role of the dual interaction of fungal pathogens with pattern recognition receptors in the activation and modulation of host defence. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12:404-409.

Netea MG, Sutmuller R, Hermann C, van der Graaf CA, van der Meer JW, van Krieken JH, Hartung T, Adema G, Kullberg BJ. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol.* 2004; 172:3712-3718.

Netea MG, Warris A, Van der Meer JW, Fenton MJ, Verver-Janssen TJ, Jacobs LE, Andresen T, Verweij PE, Kullberg BJ. *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition during germination through loss of toll-like receptor-4-mediated signal transduction. *J Infect Dis.* 2003; 188:320-326.

Netea MG, van Der Graaf CA, Vonk AG, Verschueren I, van Der Meer JW, Kullberg BJ. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis.* 2002; 185:1483-1489.

Oda LM, Kubelka CF, Alviano CS, Travassos LR. Ingestion of yeast forms of *Sporothrix schenckii* by mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun.* 1983 ; 39:497-504.

Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4:1-23.

Sassá MF, Saturi AE, Souza LF, Ribeiro LC, Sgarbi DB, Carlos IZ. Response of macrophage Toll-like receptor 4 to a *Sporothrix schenckii* lipid extract during experimental sporotrichosis. *Immunology*. 2009; 128:301-309.

Tessarolli V, Gasparoto TH, Lima HR, Figueira EA, Garlet TP, Torres SA, Garlet GP, Da Silva JS, Campanelli AP. Absence of TLR2 influences survival of neutrophils after infection with *Candida albicans*. *Med Mycol*. 2010; 48:129-140.

Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol*. 2002; 20:825-852.

Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*. 1999; 401:811-815.

van de Veerdonk FL, Kullberg BJ, van der Meer JW, Gow NA, Netea MG. Host-microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens. *Curr Opin Microbiol*. 2008; 11:305-312.

van der Graaf CA, Netea MG, Verschueren I, van der Meer JW, Kullberg BJ. Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae. *Infect Immun*. 2005; 73:7458-746.