



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas



Farmácia-Bioquímica

Pedro Passos Sundfeld

**Influência do receptor TLR-2 no processo de fagocitose do fungo
*Sporothrix schenckii***

Orientador: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

Araraquara
2012



Pedro Passos Sundfeld

Influência do receptor TLR-2 no processo de fagocitose do fungo
Sporothrix schenckii

Orientador: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”

Araraquara
2012

LISTA DE ABREVIATURAS	2
I. RESUMO	3
II. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	3
III. MATERIAIS E MÉTODOS	14
1. MICROORGANISMO	14
2. ANIMAIS	14
3. CULTIVO DO FUNGO <i>SPOROTHRIX SCHENCKII</i>	15
4. MACRÓFAGOS PERITONEAIS E CONDIÇÕES DE CULTURA.	15
5. AVALIAÇÃO DA FAGOCITOSE DO <i>SPOROTHRIX SCHENCKII</i> EM MACRÓFAGOS MURINOS.	18
6. VERIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS FÚNGICAS INTRACELULARES VIÁVEIS EM MACRÓFAGOS MURINOS.	18
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
1. EFICIÊNCIA DE INTERNALIZAÇÃO DAS CEPAS DE <i>SPOROTHRIX SCHENCKII</i> POR MACRÓFAGOS MURINOS.	19
2. ASPECTO MORFOLÓGICO DA INTERNALIZAÇÃO DE <i>SPOROTHRIX SCHENCKII</i> POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS C57BL/6 WT E C57BL/6 TLR-2 KO.	20
3. ANÁLISE DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS FÚNGICAS INTERNALIZADAS.	22
V. CONCLUSÃO	22
VI. REFERÊNCIAS	23

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS: Síndrome da imunodeficiência adquirida

CAA: Células apresentadoras de antígenos

CD: Citocalasina D

DMSO: Dimetilsulfóxido

IFN: Interferon

IL: Interleucina

LPS: Lipopolissacarídeos

PAMP: Padrões moleculares associados a patógenos

PRR: Receptor de reconhecimento padrão

NO: Óxido nítrico

iNOS: Óxido nítrico sintetase

TLR-2: Toll Like Receptor 2

TLR-2 KO: Toll Like Receptor 2 “*knockout*”

TNF: Fator de necrose tumoral

WT: Selvagem

I. RESUMO

A esporotricose é uma micose provocada pelo fungo *Sporothrix schenckii*, resultante da inoculação direta de conídios e hifas do fungo. A doença se desenvolve habitualmente na pele, no tecido subcutâneo, podendo através dos vasos linfáticos, comprometer órgãos internos. Nos últimos anos tem-se voltado à atenção à participação do receptor Toll Like-2 no reconhecimento e fagocitose de diversos antígenos fúngicos. A partir disto, o objetivo deste estudo foi estudar a influência do receptor Toll Like-2 no processo de fagocitose do *Sporothrix schenckii* em camundongos C57BL/6.

Este estudo avaliou o processo de internalização do *Sporothrix schenckii* por macrófagos murinos obtidos de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 TLR-2 KO. Os experimentos foram realizados através da utilização de lâminas de cultura celular e microscopia ótica. Além de analisar a viabilidade de células fúngicas internalizadas através de ensaios de sobrevivência.

Como resultados pudemos observar a significativa importância do TLR-2 no processo de internalização deste microrganismo, uma vez que o estudo evidenciou uma eficácia de internalização acima de 85% dos macrófagos obtidos de animais selvagens em relação aos obtidos de animais TLR-2 KO. Além disso, através de ensaios de sobrevivência foram obtidos resultados que sugerem a ausência de viabilidade das células fúngicas depois de fagocitadas.

II. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A esporotricose é uma micose provocada pelo fungo *Sporothrix 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 *Sporothrix schenckii* é o solo, onde vive em associação com restos vegetais, bolor e madeira, em regiões de climas temperado e tropical úmido (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 *Sporothrix 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), onde a maior parte das infecções ocorrem em áreas rurais, tendo aproximadamente um caso a cada mil indivíduos (PAPPAS et al., 2000). A infecção está associada a trauma durante o curso de trabalhos em que há contato com o solo, sendo tratamento é necessário para a maioria dos pacientes (KUSUHARA et al., 1988).

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). A disseminação em estruturas osteo-articulares e vísceras possam ocorrer tanto indivíduos em saudáveis como em indivíduos imunodeprimidos, especialmente os indivíduos com AIDS (DURDEN et al., 1997). Entretanto, formas disseminadas da doença são menos comuns e quase sempre estão 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 susceptíveis 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 em 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).

As primeiras barreiras de infecção dos 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, apenas 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 infecção. 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 *Sporothrix 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 tentando impedir a entrada de patógenos nos tecidos. Estes incluem as barreiras epiteliais e diversas componentes químicas 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 (CAA). 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). Os macrófagos estão intimamente envolvidos na resposta imune. As principais funções destas células 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 sólidas, 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 como 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, células tumorais e células senescentes e, para eliminar essas partículas ingeridas, eles produzem substâncias derivadas de oxigênio e nitrogênio (MARCINKIEWICZ, 1997; ADEREM & UNDERHILL, 1999; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Muitos microrganismos patogênicos podem invadir as células e utilizar este ambiente para se multiplicar ou escapar da resposta imune do hospedeiro. Quando os microrganismos são fagocitados, tanto podem ser destruídos, como também desenvolver diferentes estratégias que permitam sua replicação e sobrevivência no interior de células fagocíticas ou não fagocíticas (FINLAY & FALKOW, 1997). Brummer et al. (1989) verificaram a presença de *Paracoccidioides brasiliensis* no interior de macrófagos peritoneais residentes indicando que estes não são capazes de efetuar a digestão do fungo, que só ocorre após a ativação por

linfocinas desses macrófagos. Uma situação semelhante que mostra a capacidade de um microrganismo sobreviver no interior celular depois de um processo de fagocitose foi observada por Lamberti et al. (2010). Nesse estudo, a sobrevivência de *Bordetella pertussis* no interior de macrófagos foi encontrada quarenta e oito horas após a infecção e o número de bactérias intracelulares viáveis por célula aumentou, sugerindo que *Bordetella pertussis* é capaz de replicar neste tipo de compartimento. Infecções experimentais em ratos com *Cryptococcus neoformans* demonstraram que o fungo pode sobreviver permanecendo dormente e ser reativado por um evento imunocomprometedor (ABEGG, 2003). Entretanto não há estudos que demonstrem a sobrevivência do fungo *Sporothrix schenckii* no interior de macrófagos e nem o papel dos receptores TLR-2 no reconhecimento deste microrganismo no processo de fagocitose. 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, agem contra células cancerígenas e agentes patogênicos intracelulares e atuam na resposta de hipersensibilidade do tipo tardia a antígenos virais e bacterianos 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).

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 produzem IFN- γ que ativam macrófagos e promovem a imunidade mediada por células, neste trabalho foram encontrados baixos níveis de produção de NO e baixa atividade de iNOS na fase inicial (1^a e 2^a semanas) e tardia (9^a e 10^a semanas) da infecção ao contrário da 4^a e 7^a semanas onde os níveis destas moléculas foram elevados. A produção de IFN- γ e IL-12 estava em conformidade com a detecção de NO/iNOS, mostrando a presença de resposta imune celular durante todo o processo infeccioso. A produção de IL-4 mostrou um aumento nos níveis após a 5^a e 6^a semanas o que sugere uma participação de resposta Th2 neste período. A respeito destes resultados, o estudo demonstrou que na infecção experimental a resposta imune celular participou ao longo do período analisado como um mecanismo dependente do óxido nítrico, enquanto a presença da resposta Th2 a partir da 5^a semana sugere a participação da resposta imune humoral em estágios avançados da esporotricose (MAIA et al., 2006).

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 *Sporothrix schenckii* (CARLOS et al., 1992; CARLOS et al., 1994). Em infecções experimentais, camundongos atímicos são mais suscetíveis a esporotricose, e a imunidade adquirida contra *Sporothrix schenckii* é principalmente ativada por macrófagos mediados por células T (TACHIBANA et al., 1999). O principal mecanismo de defesa contra fungos é a eliminação de 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).

O reconhecimento de microrganismos pelo sistema imune inato é o primeiro passo para a ativação de uma resposta imunológica mais acelerada. Os responsáveis por essa

resposta são receptores do tipo “Toll-like receptor” (TLR), os quais fazem parte de uma família de receptores transmembrânicos 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). Esses receptores são os principais receptores de reconhecimento padrão (PRR) envolvidos na imunidade inata. São encontrados, principalmente, nas células do sistema imunológico (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, entre outras) e são capazes de reconhecer alguns poucos padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) (AKIRA et al., 2006). TLRs e outros PRRs conferem reconhecimento de alguns PAMPs e suas sinalizações desencadeiam na maioria das vezes uma resposta inflamatória seguida pela liberação de citocinas pró-inflamatórias que induz a expressão de moléculas co-estimulatórias para promover a ativação de imunidade adaptativa durante a apresentação de antígenos. A ativação simultânea de múltiplos PRRs por um patógeno torna o sistema imunológico apto para uma efetiva resposta imune (ROEDER et al., 2004). A ativação dos macrófagos via TLR pode resultar na produção de citocinas inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF)- α , IL-1 e IL-6. Essas citocinas agem em células do sistema imunológico através da ligação aos específicos receptores de superfície celular, induzindo respostas celulares. Estas citocinas inflamatórias produzidas por macrófagos ativados próximos ao local de infecção, promovem inflamação, aumentando a permeabilidade do endotélio vascular, o que promove o deslocamento de células do sistema imune para a região afetada, sendo os neutrófilos as primeiras células a chegarem ao local da inflamação (MORESCO et al.; 2011).

Os PAMPs estão expostos geralmente 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 patógenos

(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). Alguns componentes da parede celular do fungo *Sporothrix schenckii* parecem estar relacionados à virulência deste fungo (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 *Sporothrix schenckii*, presentes tanto na fase micelial 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). Uma efetiva resposta imune depende do reconhecimento pelos macrófagos dos PAMPs que distinguem o agente infeccioso do “próprio”. Após esse reconhecimento provocam a produção de mediadores inflamatórios (AKIRA, 2006). Além disso, a sinalização via TLR é fundamental para a adaptação imunológica em resposta a patógenos infecciosos (AKIRA et al., 2001; CARLOS et al., 2009). Os receptores TLR são expressos na grande maioria das células do sistema imunológico, incluindo células T, células B, mastócitos, eosinófilos, macrófagos e células dendríticas, além de também serem expressos em células não imunes, como queratinócitos, células epiteliais, fibroblastos e células musculares. O controle da expressão destes receptores é regulado por vários fatores sendo os principais, as citocinas inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α , e IFN- γ ; além do LPS de outros componentes bacterianos e virais (HAOLI JIN et al., 2009). Recentes estudos demonstram que 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 susceptibilidade a infecções por *Candida* (NETEA et al., 2002). Entretanto, Netea et al. (2004) demonstraram que a

ausência de TLR-2 aumentou a resistência de camundongos à candidíase e que este fato está associado com a diminuição de citocinas anti-inflamatórias, mas não pró-inflamatórias, melhorando o recrutamento de leucócitos para os sítios de infecção.

Foi também observado por Levitz (2004) e Netea (2002) que a ação de anticorpos dirigidos contra TLR-2, atua prejudicando a produção de TNF- α estimulada pela *C. albicans*, o que pode afetar o recrutamento de macrófago. Já J.E.Wang et al. (2001) observaram a produção de TNF- α estimulada por hifas de *A. fumigatus* foi inibida por anticorpos monoclonais dirigida contra TLR-4 ou CD14, mas não por anticorpos anti-TLR-2. Outro resultando interessante foi encontrado por Villamon et al. (2004) e Netea et al (2004), onde camundongos deficientes para TLR-2 apresentaram maior sobrevida em infecções por *C.albicans* que os animais controle, que apresentavam esse receptor. A provável ocorrência deste resultado se dá pela liberação prejudicada de IL-10 no TLR-2 KO, o que resultou em uma diminuição de células T reguladoras CD4 + e CD25 +. No entanto, em outros estudos como o de Bellocchio et al., (2004) utilizando-se camundongos TLR-2 KO infectados por *C. albicans*, os animais tiveram sua sobrevivência significativamente alterada. Além disso, TLR-2 está envolvido nos mecanismos de resposta do hospedeiro a outros microrganismos como *Staphylococcus*, *Mycobacterium* e *Pneumococcus* (KRUTZIK et al., 2003; KOEDEL et al., 2003). Netea et al. (2008) analisou o papel dos receptores TLR-1 e TLR-6 no reconhecimento de *Candida albicans* e verificou o não envolvimento de TLR-1. Em contraste, demonstrou que TLR-6 modula o balanço na produção de citocinas dos perfis Th1 e Th2, já que, camundongos “Knock-out” TLR-6 foram defectivos para produção de IL-10 e eficientes para a produção de IFN- γ . Assim, pôde-se demonstrar que o TLR-2 colabora com TLR-1 para discriminar patógenos que expressam lipoproteínas na superfície, enquanto o TLR-4 atua individualmente discriminando patógenos que expressam lipopolissacarídeos (LPS) em sua superfície (JIANZHONG ZHU et al.; 2011; MORESCO et al.; 2011) (Figura 1).



Receptor	TLR2/1 ou TLR2/6	TLR4
Ligante	Lipoproteínas	LPS
Fonte da resposta	Bactérias Gram positivas e Fungos	Bactérias Gram negativas
Exemplos de ligantes	 Pam ₂ CSK ₄	 LPS

Figura 1. Fonte de resposta e exemplos de ligantes dos receptores TLR-2 e TLR-4.

No trabalho realizado em nosso laboratório, Sassá et al. (2009) avaliou-se a participação dos TLR-4 no reconhecimento do fungo *Sporothrix schenckii*, os resultados demonstraram que tanto mediadores pró-inflamatórios (NO e TNF- α) quanto anti-inflamatórios (IL-10) estavam reduzidos nos camundongos deficientes do receptor TLR-4 sugerindo um envolvimento do mesmo no reconhecimento do agente infeccioso. Estudos recentes com *A. fumigatus* mostraram que este é capaz de modular as respostas imunes mediadas por TLR, diminuindo diretamente a capacidade das células hospedeiras responderem a ligação TLR-2 e TLR-4 (CHAI et al., 2011), mecanismo esse que oferece uma vantagem inicial ao fungo melhorando suas chances de sobrevivência. 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)(Figura 2). Com isso a capacidade de TLRs discriminar micro-organismos patogênicos diversos por reconhecer especificamente PAMPs tem sido amplamente demonstrada por diversos estudos durante na última década.

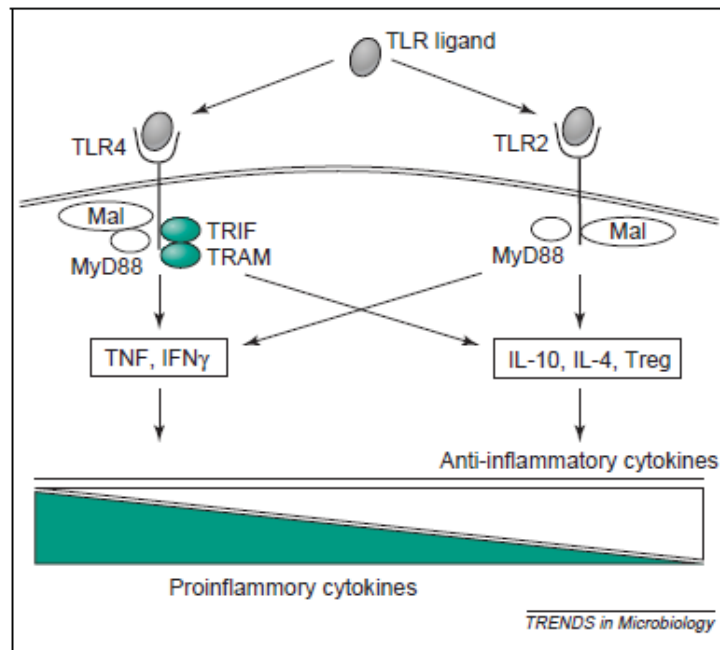


Figura 2. Reconhecimento de antígeno e ativação da cascata de citocinas pelos receptores TLR-2 e TLR-4.

Considerando a importância e dando continuidade ao estudo dos receptores do tipo “Toll-like” na resposta imunológica contra o fungo *Sporothrix schenckii*, buscaremos no presente projeto avaliar a participação dos receptores TLR-2 na resposta do hospedeiro utilizando animais “knock-out” da linhagem C57BL/6. Poderemos com isso analisar qual a influência desses receptores na eliminação ou favorecimento da infecção, o que permitirá a elaboração de estratégias mais eficazes de tratamento e/ou imunização contra *Sporothrix schenckii*, já que, pouco se conhece sobre a participação do sistema imune no combate a esse fungo, que permitirá a elaboração de estratégias mais eficazes de tratamento e/ou imunização contra esse patógeno.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Microorganismo

No presente projeto está sendo utilizada amostra do fungo *Sporothrix schenckii*, cepa 1099-18, isolada 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.

2. Animais

Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 (“Wild type” – WT) e C57BL/6 (TLR-2 “Knock-out” – KO), 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 separados de acordo com as linhagens, em grupos de igual número e mantidos em gaiolas plásticas em um ambiente com temperatura controlada ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade (65-75%), ciclos de luz (12h claro-12h escuro) e mantidos em um ambiente “germ-free”. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário de Araraquara – UNIARA (nº 940) e foi realizado de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3. Cultivo do fungo *Sporothrix schenckii*

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 1100 x g por 10 min (Figura 3) e o *pellet* obtido foi ressuspendido em 1mL de PBS para a contagem em câmara de Neubauer (Boeco, Germany). A suspensão foi ajustada como descrito no item 4.



Figura 3. Método de cultivo do fungo *Sporothrix schenckii*

4. Macrófagos peritoneais e condições de cultura.

Foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 com idade entre 6 e 8 semanas. Os macrófagos foram obtidos após injeção intraperitoneal de solução aquosa de tioglicolato de sódio a 3% nos camundongos, quatro dias antes do experimento (Figura 4). Após este período, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e, para a remoção dos macrófagos, foi realizada a exposição da cavidade peritoneal com o auxílio de pinças “dente

de rato”, injeção intraperitoneal de 5mL de PBS (pH 7,4) gelado e estéril, massagem vigorosa da cavidade (permitindo a liberação dos macrófagos aderidos ao tecido para o líquido) e a re-suspensão das células peritoneais por meio de aspiração do líquido intraperitoneal (Figura 5). Em seguida, essas células foram imediatamente centrifugadas a 710 x g por 5 min. Após o descarte do sobrenadante, foi realizada a re-suspensão do pellet em 3mL de PBS gelado, centrifugação a 710 x g por 5 min, aspiração do PBS e re-suspensão do pellet em 1mL de RPMI com 100 U/mL de penicilina- estreptomicina, 1mM L- glutamina, 10% de soro fetal bovino e β -mercaptoetanol (Gibco).

Para padronização do número de células a serem utilizadas em cada experimento, foi realizada a contagem de macrófagos com o auxílio de uma Câmara de Neubauer. Desta forma, 10 μ L da suspensão em RPMI foram diluídos em 90 μ L de PBS e, desta solução, 10 μ L foram adicionados a 90 μ L do corante Líquido de Lázarus. A contagem do número de células foi realizada em microscópio óptico (Diastar, Reichert, Buffalo, NY), utilizando-se o aumento de 400x (Figura 6).

Para os ensaios de internalização, um total de 100.000 macrófagos por volume de 500 μ L de RPMI (determinado em estudo piloto) foram distribuídos por poço em lâminas de cultura Lab Tek (Nunc, Naperville IL) (1,8 cm²/poço). Depois da distribuição de 500 μ L de suspensão/poço, as lâminas foram incubadas a 37°C em 5% CO₂ (estufa ThermoForma, HEPA) por 2 horas, para a formação de uma camada única de macrófagos aderentes (Figura 7). Após esse período, essas células foram submetidas ao contato com as suspensões fúngicas.

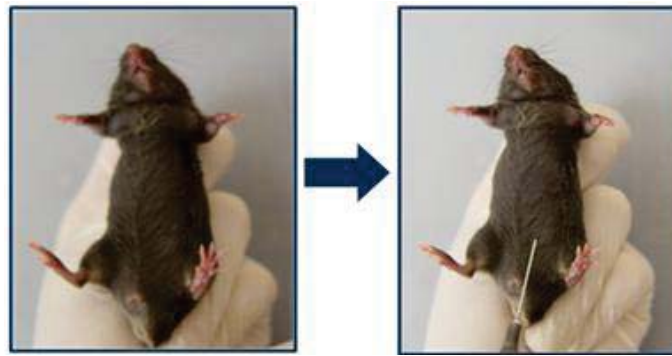


Figura 4. Procedimento de inoculação de 3mL de tioglicolato de sódio (3%) na cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6.



Figura 5. 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.

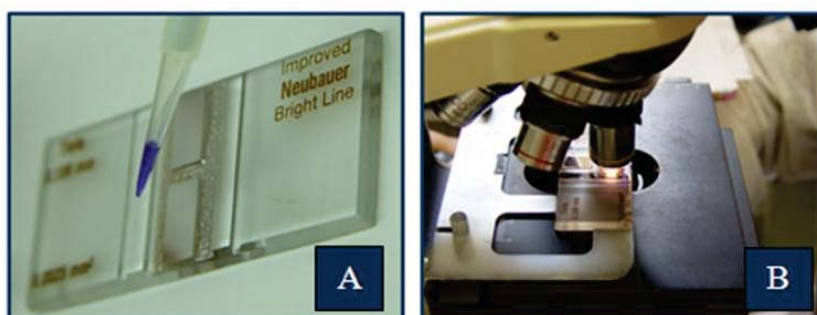


Figura 6. A. Distribuição da amostra diluída (10x em PBS pH 7,4 e 10x em Líquido de Lázarus) em Câmara de Neubauer. B. Contagem das células em microscópio óptico.

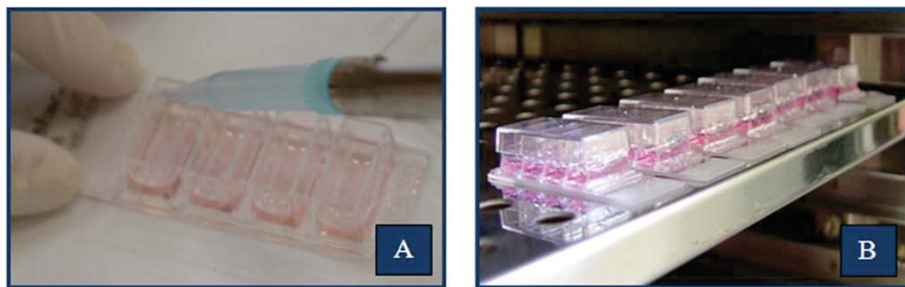


Figura 7. A. Distribuição de 500µL de suspensão/poço em lâminas de cultura Lab Tek. B. Incubação das lâminas a 37°C em 5% CO₂ por 2 horas para a formação de uma camada única de macrófagos aderentes.

5. Avaliação da fagocitose do *Sporothrix schenckii* em macrófagos murinos.

A avaliação do processo de fagocitose do *Sporothrix schenckii* por macrófagos murinos foi realizada através da contagem de 200 macrófagos por poço, separando-se as células que apresentavam o micro-organismo em seu interior das que não apresentavam. Esta contagem foi realizada utilizando-se o aumento de 1000x. Depois de contabilizadas as células de cada grupo, foram calculadas as médias de macrófagos com a levedura internalizada para a elaboração do gráfico (Figura 8) e obtenção das análises estatísticas, as quais foram realizadas no GraphPad Prism 5.

6. Verificação do número de células fúngicas intracelulares viáveis em macrófagos murinos.

Para análise de eventuais células fúngicas viáveis após a internalização por macrófagos previamente incubados com suspensões fúngicas, foram inicialmente obtidos os macrófagos como descrito no item 4. Um total de 200.000 macrófagos por volume de 500µL de RPMI foram distribuídos por poço em lâminas de cultura Lab Tek (Nunc, Naperville IL) (1,8 cm³/poço). Depois da distribuição de 500µL de suspensão/poço, as lâminas foram incubadas a 37°C em 5% CO₂ (estufa ThermoForma, HEPA) por 2 horas, para a formação de uma camada única de macrófagos aderentes. Após esse período, o meio de cultura foi

removido e foi adicionado aos macrófagos aderidos, a suspensão fúngica em meio de cultura RPMI livre de soro fetal bovino. Dessa forma, como realizado nos ensaios de internalização, foi mantida a mesma proporção de macrófagos/células fúngicas, ou seja, exposição de aproximadamente 5 células fúngicas por macrófago em 500 μ L de volume por poço.

A incubação dos macrófagos com as suspensões fúngicas foi realizada durante os períodos de 1, 6, 12 e 24 horas. Decorridos os tempos descritos, o meio de cultura presente nos poços foi removido e a presença de eventuais células fúngicas intracelulares viáveis, foi verificada após lise dos macrófagos (previamente lavados em meio sem antibióticos) com 0,025% de Triton X-100 e plaqueamento dos lisados em ágar sabouraud para análise da viabilidade do *Sporothrix schenckii* internalizado. As placas foram incubadas a 37°C em 5% CO₂ (estufa ThermoForma, HEPA) pelo período de 7 dias. Após incubação das mesmas, o número de unidades formadoras de colônias foi determinado (Valentin-Weigand et al., 1996).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Eficiência de internalização das cepas de *Sporothrix schenckii* por macrófagos murinos.

A Figura 8 mostra os índices de internalização do fungo *Sporothrix schenckii* por macrófagos murinos, após período de 2h de contato fungo-macrófago. As células fúngicas foram mais internalizadas por macrófagos dos animais WT (90,6%) quando comparados aos macrófagos de animais TLR-2 KO (5,6%), detectando-se diferença significativa no número de macrófagos com fungos internalizados entre as linhagens testadas ($p < 0,01$). A CD foi capaz de interferir no processo de internalização fúngica. Comparando-se os resultados obtidos entre os testes de internalização com o uso do inibidor e ausência do mesmo, podemos melhor analisar os processos de internalização entre as linhagens. Isso porque a inibição da fagocitose

permite observar se o macrófago sobreposto à célula fúngica aparenta tê-la internalizado. O que nos permite checar a presença de resultados “falso positivo”.

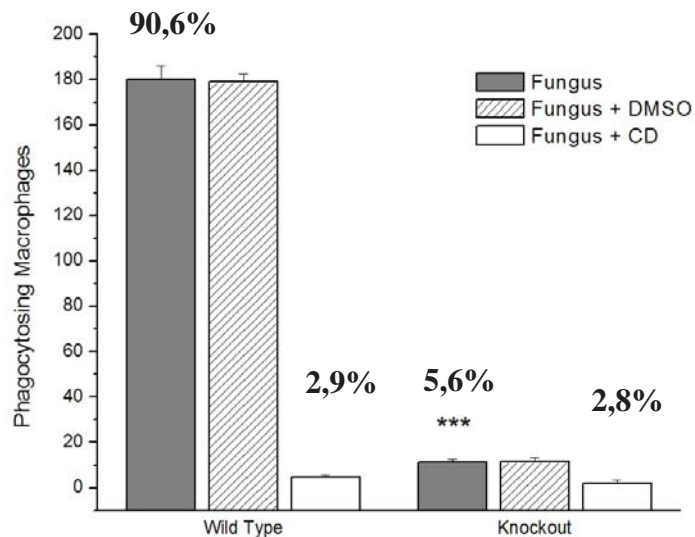


Figura 8. Comparação da eficiência de internalização de *Sporothrix schenckii* por macrófagos dos animais WT e TLR-2 KO, após período de 2h de contato fungo-macrófago. Os valores das colunas correspondem às médias de macrófagos com fungos internalizados (um total de 200 macrófagos analisados por campo), obtidas a partir dos valores de dois experimentos independentes. As barras sobre as colunas indicam os desvios padrão.

2. Aspecto morfológico da internalização de *Sporothrix schenckii* por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 TLR-2 KO.

Nos ensaios de internalização do fungo *Sporothrix schenckii* as análises por microscopia de luz evidenciaram que nos animais WT, foram encontradas um grande número de células fúngicas internalizadas no interior dos vacúolos dos macrófagos, (Figura 9A). Já nos animais TLR-2 KO, foram verificados na maioria dos macrófagos, um elevado número de vacúolos com ausência de células fúngicas internalizadas (Figura 9B).

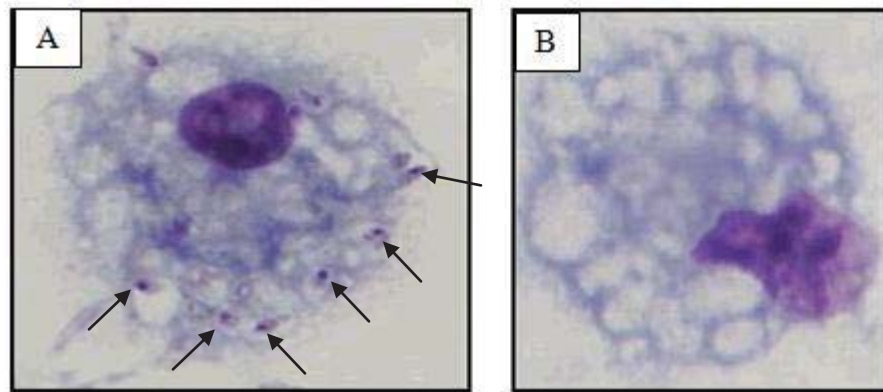


Figura 9. Imagem representativa do teste de fagocitose por macrófagos murinos corados (Giemsa) e observados ao microscópio óptico. A. Macrófago de camundongo WT. B. Macrófago de camundongo TLR-2 KO. As setas indicam grande número de vacúolos e ausência de internalização. (aumento de 100x)

As maiores porcentagens de macrófagos com leveduras fagocitadas foram encontradas naqueles apenas expostos à suspensão fúngica, independente da linhagem analisada (90,6% WT; 5,6% TLR-2 KO) ($p < 0,01$).

Os resultados obtidos mostram que a ausência de TLR-2 leva a uma expressiva redução na capacidade de fagocitose do fungo pelos macrófagos. Esses resultados estão de acordo com os de Tessarolli et al.(2010), que demonstraram que macrófagos provenientes camundongos TLR-2 KO apresentaram menor atividade fagocítica frente a *Candida albicans* quando comparados aos macrófagos obtidos de camundongos WT. Além disso, há relatos da participação desse receptor no processo de fagocitose de outros patógenos. Gelani et al. (2009), verificando a importância da sinalização via TLR-2 durante a resposta imune contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, encontraram uma menor taxa de fagocitose deste microrganismo por macrófagos e neutrófilos de animais TLR-2 KO quando comparados aos WT.

Esses resultados podem contribuir para maior compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta imune a esta micose, já que, tanto os componentes do fungo como os receptores dos fagócitos envolvidos nesta interação são pouco conhecidos.

3. Análise da viabilidade das células fúngicas internalizadas.

Em um total de três experimentos independentes para cada um dos tempos utilizados no ensaio de sobrevivência, não houve crescimento de unidades formadoras de colônia em nenhuma das condições testadas. O que sugere que depois de fagocitadas, as células fúngicas podem perder sua viabilidade.

V. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos pudemos observar a importância do receptor TLR-2 no processo de fagocitose do *Sporothrix schenckii*, uma vez que a partir dos estudos realizados pudemos observar que um número maior de células fúngicas foram internalizadas por macrófagos dos animais WT (90,6%) quando comparados aos macrófagos de animais TLR-2 KO (5,6%), fato que nos leva a acreditar na participação fundamental do receptor TLR-2 no processo de internalização deste fungo. O grande número de vacúolos encontrados nos macrófagos de animais TLR-2 KO sugere também que existe uma ativação dos macrófagos, porém a fagocitose não é realizada, o que reforça que o TLR-2 é de grande importância para a fagocitose do *Sporothrix schenckii*.

Neste estudo também pode-se sugerir a inviabilização das células fúngicas depois de internalizadas por macrófagos murinos, uma vez que as células fúngicas obtidas a partir da lise do macrófago não foram capazes de crescer quando cultivadas nas condições analisadas.

Com o presente estudo pudemos evidenciar a fundamental participação do TLR-2 no processo de fagocitose do *Sporothrix schenckii*. A participação desse receptor na resposta

imune ao fungo *Sporothrix schenckii* poderá originar novas estratégias de estudo na tentativa de se combater esse patógeno.

VI. REFERÊNCIAS

1. ABEGG, MA. Isolamento e caracterização de *Cryptococcus neoformans* a partir de potenciais reservatórios ambientais inexplorados no Rio Grande do Sul. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.
2. ADAMS DO. Macrophages. *Methods Enzymol.* 1979; 58: 494-506.
3. ADEREM A, UNDERHILL DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol.* 1999; 17: 593-623.
4. AGARWAL S, GOPAL K, UMESH, KUMAR B. Sporotrichosis in Uttarakhand (India): areport of nine cases. *Intern J Dermatol.* 2008; 47:367-71.
5. AKIRA S, UEMATSU S, TAKEUCHI O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006; 124(4):783-801.
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 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.
9. BELKNAP BS. Sporotrichosis. *Dermatol Clinics.* 1989; 7(2):193-202.
10. 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(3):392-9.
11. BRUMMER E, RESTREPO A, HANSON LH, STEVENS DA. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: The influence of in vitro passage and storage. *Mycopathologia.* 1990; 109(1): 13-8.

12. CARLOS IZ, SASSÁ MF, DA GRAÇA SGARBI DB, PLACERES MC, MAIA DC. Current Research on the Immune Response to Experimental Sporotrichosis. *Mycopathologia*. 2009 Feb 25. [Epub ahead of print].
13. 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.
14. CARLOS IZ, SGARBI DBG, PLACERES MCP. Host organism defense by a peptide- polysaccharide extracted from the fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*. 1999; 144:9-14.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. CAVAILLON JM. Cytokines and macrophages. *Biomed Pharmacother*. 1994; 48: 445-53.
19. 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.
20. 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.
21. DONADEL KW, REINOSO YD, OLIVEIRA JC, AZULAY RD. Esporotricose: revisão. *An bras Dermatol*. 1993, 68(1): 45-52.
22. 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.
23. DURDEN, F. M., B. ELEWSKI. 1997. Fungal infections in HIV patients. *Semin. Cutan. Med. Surg.* 16:200–212.
24. EVA MARIE Y. MORESCO, DIANTHA LAVINE, AND BRUCE BEUTLER.; 2011Current Biology Vol 21 No 13.

25. 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.
26. 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.
27. FINLAY BB, FALKOW S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1997; 61 (2), 136 - 69.
28. GAY NJ, KEITH FJ. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature*. 1991; 351(6325):355-6.
29. 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.
30. HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Free radicals reactive species and toxicology. In: Halliwell B, Gutteridge, editores. *Free Radic Biol Med*. New York. 1999; 544-616.
31. HAOLI JIN, LALIT KUMAR, CLINTON MATHIAS, et al. Toll-like receptor 2 is important for the TH1 response to cutaneous sensitization. *J Allergy Clin Immunol*, April 2009.
32. 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.
33. HOWELL SJ, TOOHEY JS. Sporotrichal arthritis in south central Kansas. *Clin Orthop Relat Res*. 1998; (346): 207-14.
34. J.E.WANG, A.WARRIS, E.A. ELLINGSEN, et al., Involvement of CD14 and Toll-like receptors in activation of human monocytes by *Aspergillus fumigatus* hyphae, *Infect. Immun*. 69 (2001) 2402–2406.
35. JANEWAY CAJR, MEDZHITOV R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002; 20: 197-216.
36. JIANZHONG ZHU, GOWDAHALLI KRISHNEGOWDA, GUANGFU LI, D. CHANNE GOWDA. Proinflammatory responses by glycosylphosphatidylinositols (GPIs) of *Plasmodium falciparum* are mainly mediated through the recognition of TLR2/TLR1. *Experimental Parasitology*. 2011; 205–211.
37. JUTRAS I, DESJARDINS M. Phagocytosis: At the crossroads of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005; 21: 511-27.
38. KAWAI T, AKIRA S. Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *TRENDS Mol Med*. 2007; 13: 460-69.
39. 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.

40. KRUTZIK SR, OCHOA MT, SIELING PA, UEMATSU S, NG YW, LEGASPI A, LIU PT, COLE ST, GODOWSKI PJ, MAEDA Y, SARNO EN, NORGARD 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.
41. KUSUHARA, M., H. HACHISUKA, AND Y. SASAI. 1988. Statistical survey of 150 cases of sporotrichosis. *Mycopathologica* 102:129–133.
42. LAEMMELI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227:680-85.
43. LAMBERTI YA, HAYES JA, PEREZ VIDAKOVICS ML, HARVILL ET, RODRIGUEZ ME. Intracellular trafficking of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect Immun.* 2010; 78(3):907-13.
44. LAMM ME. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu Rev Microbiol.* 1997; 51: 311-40.
45. 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.
46. 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.
47. LOUIS Y.A. CHAI, JOS W.M. VAN DER MEER, MIHAI G. NETEA, et al. *Aspergillus fumigatus* cell wall components differentially modulate host TLR2 and TLR4 responses. *Microbes and Infection.* 2011; 151 -159.
48. 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.
49. MARCINKIEWICZ J. Nitric oxide and antimicrobial activity of reactive oxygen intermediates. *Immunopharmacol.* 1997; 37: 35-41.
50. MARSHALL RI. Gingival defensins: linking the innate and adaptive immune responses to dental plaque. *Periodontol 2000.* 2004; 35: 14-20.
51. 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.
52. 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.
53. 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.

54. 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.
55. MUTHUKURU M, JOTWANI R, CUTLER CW. Oral mucosal endotoxin tolerance induction in chronic periodontitis. *Infect Immun.* 2005; 73(2): 687-94.
56. NASCIMENTO RC, ALMEIDA SR. Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005; 43(2): 241-7.
57. NASCIMENTO RC, ESPÍNDOLA NM, CASTRO RA, TEIXEIRA PA, LOUREIRO Y PENHA CV, LOPES-BEZERRA LM, ALMEIDA SR. Passive immunization with monoclonal antibody against a 70-kDa putative adhesin of *Sporothrix schenckii* induces protection in murine sporotrichosis. *Eur J Immunol.* 2008; 38(11):3080-9.
58. NEGRINI TC, DUQUE C, HOFLING JF, GRANER E, MATTOS-GRANER RO. Tese: Análise dos padrões de internalização de cepas de *Streptococcus mutans* por macrófagos murinos.
59. 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.
60. 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(6):3712-8.
61. 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.
62. 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(10):1483-9.
63. NOBEN-TRAUTH N. Conventional naive CD4+ T cells provide in initial source of IL-4 during Th2 differentiation. *J Immunol.* 2000; 165: 3620-25.
64. NUSBAUM BP, GULBAS N, HORWITZ SN. Sporotrichosis acquired from a cat. *J Am Acad Dermatol.* 1983; 8(3): 386-91.
65. 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.

66. PAPPAS, P. G., I. TELLEZ, A. E. DEEP, D. NOLASCO, W. HOLGADO, AND B. BUSTAMANTE; 2003. Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity *Clin. Infect. Dis.* 30:65–67.
67. PLUSS JL, OPAL SM. Pulmonary sporotrichosis: review of treatment and outcome. *Medicine (Baltimore)*. 1986; 65(3): 143-53.
68. 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.
69. PROCOP GW, HADDAD S, QUINN J, WILSON ML, HENSHAW NG, RELLER LB, ARTYMYSHYN RL, KATANIK MT, WEINSTEIN MP. Detection of *Pneumocystis jiroveci* in respiratory specimens by four staining methods. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(7): 3333-5.
70. 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.
71. S. BELLOCCHIO, C. MONTAGNOLI, S. BOZZA, et al., The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo, *J. Immunol.* 172 (2004) 3059–3069.
72. SASSÁ MF, SATURI AET, SOUZA LF, RIBEIRO LCA, SGARBI DBG, CARLOS IZ. Response of macrophage's TLR4 to a *Sporothrix schenckii* lipid extract during experimental sporotrichosis. *Immunology*. 2009; x:xxx. (*in press*).
73. SCOTT EN, MUCHMORE HG. Immunoblot analysis of antibody responses to *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol.* 1989; 27(2):300-4.
74. 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.
75. STUART M. LEVITZ, Interactions of Toll-like receptors with fungi, *Microbes and Infection* 6 (2004) 1351–1355.
76. SWASON JA, HOPPE AD. The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol.* 2004; 76: 1093-1103.
77. SZABO SJ, SULLIVAN BM, PENG SL, GLIMCHER LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21: 713-58.
78. TACHIBANA T, MATSUYAMA T, MITSUYAMA M. Involvement of CD4+ T cells and macrophages in acquired protection against infection with *Sporothrix schenckii* in mice. *Med Mycol.* 1999; 37(6): 397-404.
79. TEIXEIRA MM, ALMEIDA IC, GAZZINELLI RT. Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. *Microbes Infect.* 2002; 4(9):883-6.

80. TEIXEIRA PA, DE CASTRO RA, NASCIMENTO RC, TRONCHIN G, TORRES AP, LAZÉRA M, DE ALMEIDA SR, BOUCHARA JP, LOUREIRO Y PENHA CV, LOPES-BEZERRA LM. Cell surface expression of adhesins for fibronectin correlates with virulence in *Sporothrix schenckii*. *Microbiol.* 2009, 155(Pt 11):3730-8.
81. TRINCHIERI G, SHER A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(3):179-90.
82. 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.
83. UNIS G, PÊGAS KL, SEVERO LC. Pulmonary histoplasmosis in Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005; 38(1): 11-4.
84. VADIVÉLOO 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.
85. VALENTIN-WEIGAND P, BENKEL P, ROHDE M, CHHATWAL GS. Entry and intracellular survival of group B streptococci in J774 macrophages. *Infect Immun.* 1996; 64: 2467-73.
86. VILLAMÓN ED, GOZALBO P, ROIG JE, O'CONNOR D, FRADELIZI ML. Toll-like receptor 2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections. *Microb Infect.* 2004; 1-7.
87. WING ED, Remington JS. In: Basic and clinical Immunology. 1980; 129-143.