

Universidade Estadual Paulista
Júlio de Mesquita Filho
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Câmpus de Araraquara

**Participação do Receptor “toll-like”4 na resposta imune
durante a esporotricose experimental**

Micheli Fernanda Sassá

**Araraquara – SP
2008**



Universidade Estadual Paulista
Júlio de Mesquita Filho
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Câmpus de Araraquara

**Participação do Receptor “toll-like”4 na resposta imune
durante a esporotricose experimental**

Micheli Fernanda Sassá

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 a obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área de concentração Imunologia Clínica

Orientadora: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

**Araraquara – SP
2008**

Ficha Catalográfica

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

Sassá, Micheli Fernanda

S252p

Participação do receptor “toll-like” 4 na resposta imune durante a esporotricose experimental / Micheli Fernanda Sassá. – Araraquara, 2008.
182 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

1.Esporotricose. 2.TLR4. 3.Citocina. 4.Apoptose. 5.Imunologia Celular.
I.Carlos, Iracilda Zeppone, orient.. II.Título.

CAPES: 40300005

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Iracilda Zeppone Carlos
Orientadora e Presidente

Profª Drª Maria Terezinha Serrão Peraçoli
Membro Titular

Profª Drª Cleni Mara Marzocchi Machado
Membro Titular

Profª Drª Luciana Simon Pereira Crott
Membro Titular

Profª Drª Beatriz Maria Machado *de* Medeiros
Membro Titular

Araraquara, novembro de 2008

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), através do auxílio à pesquisa (Processo no 2006/50989-5) e da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior) através da concessão da bolsa.

*“Jamais se desespere em meio às sombrias aflições de sua vida,
pois das nuvens mais negras cai água límpida e fecunda”*

Provérbio Chinês

Aqueles que são o alicerce da minha vida:

Meu marido Lindo, Ney

Meus pais, Lucia e Antonio Sassá

Minhas irmãs, Danieli e Anelize

Vocês são a razão da minha felicidade!

Agradecimentos

A Deus, que está sempre presente em minha vida, iluminando e guiando meus caminhos, pelos obstáculos superados e pelas bênçãos recebidas.

Ao meu marido, Ney, pela paciência, por todo incentivo, por todo amor e compreensão. Você é meu tudo!

Aos meus pais, Lucia e Antonio Sassá, e as minhas irmãs, Danieli e Anelize, por todo amor, apoio, incentivo. Obrigada por sempre acreditarem que eu seria capaz!

A Prof^a Dr^a Iracilda Zeppone Carlos, pela orientação durante todos estes anos.

A Marisa Campos Polesi Placeres, que mais que técnica e braço direito, uma grande amiga conquistada nesta jornada.

A grande amiga com quem tive o prazer de conviver durante grande parte deste trabalho, Ana Elisa Teófilo Saturi, que muito me ajudou nos meus experimentos e também nas minhas crises. Você é realmente iluminada!

A dois amigos mais recentes, mas cuja ajuda foi fundamental no final dos meus experimentos, Livia Carolina de Abreu Ribeiro e Lucas Souza Ferreira. Vocês são jóia!

A todos os amigos do laboratório: Paulinha, Djamilé, Sandra, Dani Serinoli, Marcela, Camila, Carol, Michelle, Felipe “Maraca”, Danielle “Caiçara”, Felipe Fortino, Leila, Flávia, Ana Cláudia e Oedem, pelos agradáveis momentos de descontração. Todos moram no meu coração! E vou sentir falta dos bolos!

Aos amigos que conquistei durante este doutorado, em especial minha amiga Beth Aoki, pelas conversas de desabafo e as agradáveis viagens ao Paraná.

A minha amiga Fernanda Paulin Benzatti, que me compreende muito bem, talvez porque temos um modo de pensar muito parecido, cujo ombro amigo eu abusei várias vezes. Bem muito obrigada pelo seu companheirismo!

Ao Prof. Dr. Luis Gustavo Silva Monnazzi, que me ajudou muito em meus experimentos de citometria. Sempre pronto a ajudar! Muito obrigada!

A Prof^a Dr^a Diana Bridon da Graça Sgarbi por ter fornecido os antígenos lipídicos para a realização dos experimentos.

Aos professores Dr. Paulo Inácio da Costa e Dr^a Ângela Maria Victoriano de Campos Soares, que como membros da banca de qualificação, contribuíram com valiosas sugestões.

Ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, pela oportunidade do estágio docência e pelo exemplo de farmacêutico que é. Quando eu crescer quero ser um pouco igual a você!

As funcionárias da seção de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Cláudia, Sônia e Laura, por toda atenção, paciência e carinho dispensados.

As funcionárias da biblioteca Ana Cristina Garcia Camilo Santos e Sônia Mara Alves Scutari pelo auxílio com as referências bibliográficas e elaboração da ficha catalográfica.

A FAPESP pelo auxílio financeiro à pesquisa e a Capes pela concessão da bolsa.

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

Muito obrigada a todos!

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas	10
Lista de Figuras	13
Lista de Esquemas, Quadros e Tabelas	16
Resumo	18
Abstract	20
1. Introdução	22
2. Revisão Bibliográfica	24
2.1. <i>Sporothrix schenckii</i> e esporotricose	24
2.2. Receptores “Toll-like”	29
2.3. Sistema Imune	33
2.4. Apoptose	39
3. Objetivos	43
4. Materiais e Métodos	44
1. Fluxograma de execução dos experimentos	44
2. Microorganismo e condições de cultivo	45
3. Animais de experimentação	45
4. Infecção dos animais	45
5. Preparo do exoantígeno	45
6. Preparo do extrato lipídico	46
7. Obtenção das células do exsudato peritoneal	46
8. Obtenção do soro dos camundongos	47
9. Avaliação da viabilidade celular – método MTT	47
10. Determinação de liberação de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	47
11. Determinação da produção de óxido nítrico	48
12. Determinação da liberação de citocinas	49
13. Determinação das citocinas intracelulares IL-1, IL-10, IL-12, TNF- α e TGF- β	49
14. Determinação da expressão de CD14 e MD-2	51
15. Determinação da ativação do fator de transcrição NF- κ B	51
15.1. Obtenção do extrato nuclear	52
15.2. Ensaio de ativação do fator de transcrição NF- κ B	52
16. Determinação da apoptose das células do exsudato peritoneal	53
17. Análise dos resultados	54

5. Resultados	55
5.1. Determinação da viabilidade celular	55
5.2. Determinação da produção de peróxido de hidrogênio	57
5.3. Determinação da produção de óxido nítrico	59
5.4. Determinação da produção de IL-1 β	61
5.5. Determinação da produção de TNF- α	64
5.6. Determinação da produção de IL-12	67
5.7. Determinação da produção de IL-10	70
5.8. Determinação da produção de TGF- β	73
5.9. Determinação intracelular das citocinas IL-1, TNF- α , IL-12, IL-10 e TGF- β	76
5.10. Avaliação da ativação do fator nuclear (NF- κ B)	81
5.11. Determinação da expressão de CD14 e MD-2	82
5.12. Determinação da apoptose das células do exsudato peritoneal	85
6. Discussão	90
7. Conclusões	120
8. Referências	121
Apêndice	160
Anexo	182

Lista de Abreviaturas e Siglas

µg - Micrograma

µL - microlitro

µmols – Micromols

°C – Graus Celsius

AIDS – “Acquired Immunodeficiency Syndrome” – síndrome da imunodeficiência adquirida

Ap-1 – proteína ativadora 1

Apaf-1 – Fator de ativação de protease apoptótica 1

BHI – “Brain heart infusion”

BSA – Soro albumina bovina

cNOS – Óxido nítrico sintetase constitutiva

CO₂ – Dióxido de Carbono

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DTT – Ditioneitol

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA – “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”

ExoAg – Exoantígeno do fungo *Sporothrix schenckii*

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

g - Força gravitacional

g – Grama

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

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico

Hepes – N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-ácido etano sulfônico

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

IFN-γ - Interferon gama

Ig – Imunoglobulina

IL - Interleucina

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

IRAK – “Interleukin-1 receptor associated kinase 1”

kDa – Quilodaltons

LeL – Extrato lipídico da fase leveduriforme do fungo *S. schenckii*

LeM – Extrato lipídico da fase miceliar do fungo *S. schenckii*

L-NMMA – NG-monometil L-arginina

LBP – proteína ligadora de LPS
LPS - Lipopolissacarídeo
MAF - Fator ativador de macrófagos
Mal – "MyD88 adapter-like protein"
MAPKs - Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MD-2 – Proteína mielóide de diferenciação-2
mL - Mililitro
mM - Milimolar
mRNA – ácido ribonucléico mensageiro
mtDNA – DNA mitocondrial
MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
MyD88 – "Myeloid differentiation primary response gene 88"
NaCl - Cloreto de sódio
NaNO₂ – Nitrito de sódio
NaOH - Hidróxido de sódio
NF-κB – Fator nuclear kappa B
ng – Nanogramas
NK - "Natural Killer"
nmols – Nanomols
nNOS – Óxido nítrico sintase neuronal
NO - Óxido Nítrico
PAMPs – "Pathogen-associated molecular patterns"
PBS - Solução salina tamponada de fosfatos
PBS-T – Solução salina tamponada de fosfatos contendo 0,05% Tween-20
PE – Ficoeritrina
PEC - Células do exsudato peritoneal
pg – Picogramas
PI – Iodeto de propídeo
PIC – coquetel inibidor de protease
PMA – "Phorbol 12-myristate 13-acetate"
pmol – Picomol
PMSF - "Phenylmethylsulfonyl fluoride"
pNPP – p-Nitrofenil fosfato
PRR – "Pattern recognition receptor"
RFLP – "Restriction fragment length polymorphism"
RIP1 – "Receptor interaction protein 1"
RNI – Intermediários reativos do nitrogênio

ROI – Intermediários reativos do oxigênio

SD - Desvio padrão

TGF- β - “Transforming Growth Factor β ”

Th – Linfócito T helper

TIRAP – “Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein”

TLR – “Toll-like receptor”

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TRAF6 – “TNF receptor associated factor 6”

TRIF – “Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein inducing interferon beta”

UV - Ultra-violeta

Lista de Figuras

- Figura 1** – Viabilidade das células do exsudato peritoneal (PEC) de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas.....56
- Figura 2** – Produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em cultura de células do exsudato peritoneal de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas.....58
- Figura 3** – Produção de NO em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas.....60
- Figura 4** – Concentração de IL-1β liberado nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas.....62
- Figura 5** – Concentração de IL-1β liberado nos soros de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas.....63
- Figura 6** – Concentração de TNF-α liberado nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas.....65
- Figura 7** – Concentração de TNF-α liberado nos soros de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas.....66
- Figura 8** – Concentração de IL-12 liberada nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas.....68
- Figura 9** – Concentração de IL-12 liberado nos soros de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas.....69

Figura 10 – Concentração de IL- 10 liberada nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados e não infectados com o fungo <i>S. schenckii</i> durante dez semanas.....	71
Figura 11 – Concentração de IL-10 liberado nos soros de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados e não infectados com o fungo <i>S. schenckii</i> durante dez semanas.....	72
Figura 12 – Concentração de TGF- β liberada nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados não infectados com o fungo <i>S. schenckii</i> dez semanas.....	74
Figura 13 – Concentração de TGF- β liberado nos soros de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados e não infectados com o fungo <i>S. schenckii</i> durante dez semanas.....	75
Figura 14 – Produção de citocinas IL-1, TNF- α , IL-12, IL-10 e TGF- β intracelulares pelos macrófagos peritoneais de camudongos C3H/HePas e (C3H/HeJ) infectados e não infectados com o fungo <i>S. schenckii</i> durante dez semanas.....	78
Figura 15 - Histogramas representativos da produção de citocinas IL-1, TNF- α , IL-12, IL-10 e TGF- β pelos macrófagos peritoneais de camudongos C3H/HePas infectados e não infectados durante dez semanas de infecção com o fungo <i>S. schenckii</i>	79
Figura 16 - Histogramas representativos da produção de citocinas IL-1, TNF- α , IL-12, IL-10 e TGF- β pelos macrófagos peritoneais de camudongos C3H/HeJ infectados e não infectados durante dez semanas de infecção com o fungo <i>S. schenckii</i>	80
Figura 17 – Determinação de NF-kB nos extratos nucleares de macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados ou não infectados com o fungo <i>S. schenckii</i> durante 10 semanas.....	81
Figura 18 – Determinação da expressão de CD14 e MD2 na superfície das células do exsudato peritoneal de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados e não infectados com o fungo <i>S. schenckii</i> durante dez semanas.....	83

Figura 19 – Gráficos “dot plots” representativos da expressão de CD14 e MD-2 nos macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados ou não infectados com o fungo *S. schenckii*.....84

Figura 20– Determinação de apoptose nas células do exsudato peritoneal de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii* durante 10 semanas.....86

Figura 21 – Gráficos “dot plots” representativos da detecção de apoptose/necrose nas células do exsudato peritoneal de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii*.....87

Lista de Esquemas, Quadros e Tabelas

Esquema 1 - Via de Sinalização do Receptor Toll-like 4 (TLR4).....	31
Quadro 1 - Representação dos resultados observados na esporotricose experimental em camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados frente ao ExoAg.....	88
Quadro 2 - Representação dos resultados observados na esporotricose experimental em camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados frente ao LeL.....	88
Quadro 3 - Representação dos resultados observados na esporotricose experimental em camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados frente ao LeM.....	88
Quadro 4 - Representação dos resultados observados na esporotricose experimental em camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados.....	89
Tabela 1 – Médias e desvio padrão dos valores de viabilidade celular (%) para os grupos testados.....	161
Tabela 2 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂ – em nmols/2x10 ⁵ células) para os grupos testados.....	162
Tabela 3 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de NO (em µmol/5x10 ⁵ células) para os grupos testados.....	163
Tabela 4 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de IL-1β (em pg/mL) para os grupos testados.....	164
Tabela 5 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de IL-1β (em pg/mL) nos soros dos camundongos para os grupos testados.....	165
Tabela 6 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de TNF-α (em pg/mL) para os grupos testados.....	166
Tabela 7 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de TNF-α (em pg/mL) nos soros dos camundongos para os grupos testados.....	167
Tabela 8 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de IL-12p70 (em pg/mL) para os grupos testados.....	168

Tabela 9 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de IL-12p70 (em pg/mL) nos soros dos camundongos para os grupos testados.....	169
Tabela 10 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de IL-10 (em pg/mL) para os grupos testados.....	170
Tabela 11 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de IL-10 (em pg/mL) nos soros dos camundongos para os grupos testados.....	171
Tabela 12 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de TGF- β (em pg/mL) para os grupos testados.....	172
Tabela 13 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de TGF- β (em pg/mL) nos soros dos camundongos para os grupos testados.....	173
Tabela 14 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de IL-1 intracelular (MIF) para os grupos testados.....	174
Tabela 15 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de TNF- α intracelular (MIF) para os grupos testados.....	175
Tabela 16 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de IL-12 intracelular (MIF) para os grupos testados.....	176
Tabela 17 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de IL-10 intracelular (MIF) para os grupos testados.....	177
Tabela 18 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de TGF- β intracelular (MIF) para os grupos testados.....	178
Tabela 19 – Médias e desvio padrão dos valores de NF- κ B nos extratos nucleares (ng/mL) para os grupos testados.....	179
Tabela 20 – Médias e desvio padrão dos valores de CD14/MD-2 (%) grupos testados.....	180
Tabela 21 – Médias e desvio padrão dos valores de apoptose e necrose (%) grupos testados.....	181

Resumo

Os receptores “toll-like” (TLR) são importantes no reconhecimento de patógenos por um hospedeiro e conseqüentemente para a ativação da resposta imune inata. Evidências clínicas e experimentais mostram que defeitos nesses receptores ou em suas vias de sinalização deixam o hospedeiro suscetível a vários tipos de infecção. Já foi demonstrado que o TLR2 e o TLR4 estão envolvidos no reconhecimento de vários fungos, como *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* e *Saccharomyces cerevisiae*, entretanto não há informações disponíveis sobre a participação dos TLRs no reconhecimento do *Sporothrix schenckii*. O *S. schenckii* é um fungo termodimórfico causador da esporotricose, uma infecção micótica caracterizada pelo comprometimento da pele e tecidos subcutâneos; em algumas ocasiões, como em pacientes imunocomprometidos, pode induzir lesões em órgãos. Os mecanismos de defesa, principalmente a imunidade mediada por células, são importantes na resistência à infecção. O objetivo deste trabalho foi verificar o papel do TLR4 na resposta dos macrófagos ao *S. schenckii*, empregando camundongos defectivos na expressão de TLR4 (C3H/HeJ) e camundongos controle (C3H/HePas), através da avaliação de mediadores imunológicos produzidos pelas células peritoneais dos camundongos, da expressão de proteínas acessórias ao TLR4 e da avaliação da apoptose destas células durante dez semanas. A produção dos intermediários reativos do oxigênio, determinada através da técnica de redução do vermelho de fenol, revelou que os camundongos defectivos na expressão do TLR4 produziram menores concentrações de H₂O₂ que os camundongos TLR4 normais. Nestes, as maiores concentrações de H₂O₂ foram induzidas pela presença do extrato lipídico da fase miceliar do *S. schenckii*. No entanto, a produção de óxido nítrico (NO) e das citocinas ocorreu em maiores níveis quando estimulados pelo antígeno lipídico da fase leveduriforme, uma vez que quando o fungo se instala no hospedeiro permanece na forma de levedura. A produção de NO e das citocinas IL-1, TNF- α e IL-10 secretadas nos sobrenadantes das culturas celulares também foi menor nos camundongos C3H/HeJ, sugerindo um papel para este receptor na sinalização destas citocinas. Entretanto, a produção de IL-12p70 e TGF- β secretadas nos sobrenadantes das culturas celulares foi maior nos camundongos C3H/HeJ, sugerindo que o TLR não medeia esta via de sinalização ou que a célula dispõe de outros mecanismos para estes mediadores, a fim de compensar a baixa produção de NO, IL-1, TNF- α e IL-10. Resultados diferentes, porém, foram encontrados na determinação das citocinas intracelulares, em que todos os mediadores testados (IL-1, IL-12, TNF- α , IL-10 e TGF- β) foram observados em menores concentrações nos camundongos defectivos na expressão do TLR4, reforçando a participação deste receptor no reconhecimento do *S. schenckii*. Concordando com estes resultados, a determinação da translocação do NF- κ B, que é o fator de transcrição que

sinaliza para a produção das citocinas, também foi menor nos camundongos deficientes no TLR4. A translocação para o núcleo e a ativação do NF- κ B também são resultados do reconhecimento de antígenos pelo TLR4. A expressão das proteínas acessórias para a sinalização através do TLR4, o MD-2 e CD14, também foi menor nos camundongos deficientes no TLR4, como era esperado. Embora a expressão destas proteínas nos camundongos TLR4 normais não tenha sido muito alta, foi suficientemente maior para que houvesse uma maior produção dos mediadores imunológicos nestes animais do que nos TLR4 deficientes. Além das funções no sistema imune inato, a sinalização via TLR4 pode ativar também a apoptose dos macrófagos. Um agente infeccioso pode induzir apoptose nas células de defesa do hospedeiro a fim de minimizar os efeitos deletérios destas células sobre ele. Assim, avaliamos a apoptose nas células peritoneais dos camundongos durante o estudo e foi observado que as células dos camundongos defectivos na expressão do TLR4 também sofrem menos apoptose que as células dos camundongos controle, o que pode ser devido à menor produção de H₂O₂, NO e TNF- α , que são mediadores imunológicos com papel conhecido na indução de apoptose. De forma geral, os resultados aqui apresentados sugerem fortemente um papel do TLR4 no reconhecimento e indução de uma resposta imune ao *S. schenckii*.

Palavras chave: esporotricose, TLR4, resposta imune, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico, citocinas, apoptose

Abstract

Toll-like receptors (TLR) are important to pathogen recognition by a host and to the subsequent triggering of an innate immune response. Experimental and clinical evidence show that defects in TLR or in signaling pathways downstream from these receptors render hosts susceptible to various types of infection. TLR2 and TLR4 are involved in recognition of several fungi, such as *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* and *Saccharomyces cerevisiae*. However, no information is available about TLR recognition of *Sporothrix schenckii*. *S. schenckii* is a thermally dimorphic fungus, the causative agent of sporotrichosis, a mycotic infection characterized by frequent involvement of the skin and subcutaneous tissues; occasionally, it may also produce lesions of the internal organs mostly reported among immunocompromised hosts. Immune defense mechanisms, particularly cell-mediated immunity have been reported to be important in infection resistance. The aim of this study was to assess the role of TLR4 in the response of macrophages to *S. schenckii*, using TLR4-deficient mice (C3H/HeJ) and control mice (C3H/HePas), evaluating immunological mediators produced by exudate peritoneal cells, TLR4 accessory protein expression, and apoptosis of these cells over a period of ten weeks. Reactive oxygen intermediates production was determined through phenol red oxidation method and has revealed that TLR4-defective mice produced lower levels of H₂O₂ than TLR4 normal mice. In these animals, higher H₂O₂ concentrations were seen when lipid extract obtained from *S. schenckii* mycelium was used. However, nitric oxide (NO) and cytokine production occurred in higher levels when cells were challenged with lipid extract from *S. schenckii* yeast cells, which is the morphotype found in the host during infection. NO and cytokines such as IL-1, TNF- α and IL-10 production in culture supernatants were also lower in C3H/HeJ mice, suggesting a role for TLR4 through cytokine signalization. Nevertheless, IL-12p70 and TGF- β produced in culture supernatants were higher in C3H/HeJ mice, suggesting TLR4 is not involved in these cytokine signaling or cells may have other mechanisms to induce the production of these mediators, in order to compensate low production of NO, IL-1, TNF- α and IL-10. Different results were found when these cytokines were detected intracellularly. All cytokines (IL-1, IL-12, TNF- α , IL-10 and TGF- β) were seen in lower levels in TLR4 deficient mice cells, reinforcing a role of this receptor in *S. schenckii* recognition. In agreement to these results, NF- κ B (a nuclear transcription factor that mediates cytokine production) translocation into the nucleus was also lower in TLR4-deficient mice. NF- κ B translocation into the nucleus and activation are also results from antigen recognition by TLR4. Expression of CD14 and MD-2, accessory proteins to TLR4 signaling pathway, was also lower in TLR4-deficient mice, as expected. Although CD14 and MD-2 expression have not been so high, it was sufficient to induce higher production of immunological mediators in C3H/HePas mice. In

In addition to innate immune functions, TLR4 signaling can also trigger macrophage apoptosis. An infectious agent may induce cell apoptosis in order to reduce/inhibit the injurious effect over them. Thus, we evaluated peritoneal cells apoptosis during *S. schenckii* infection and we found that TLR4-deficient mice cells are less susceptible to apoptosis than control mice cells. This may be due to the lower H₂O₂, NO and TNF- α production, that are immunological mediators known to have a role in apoptosis induction. These results strongly suggest TLR4 involvement in recognition and immune response stimulation to *S. schenckii*.

Key words: sporotrichosis, TLR4, immune response, hydrogen peroxide, nitric oxide, cytokines, apoptosis

1. Introdução

A esporotricose é uma infecção subaguda ou crônica causada pelo fungo termodimórfico *Sporothrix schenckii*. A infecção normalmente ocorre devido à inoculação do fungo na pele ou tecido subcutâneo, através de pequenos ferimentos ou traumas. O fungo pode permanecer restrito ao local da inoculação, pode disseminar para os linfonodos adjacentes ou, ocasionalmente, disseminar via hematogênica causando doença multifocal ou disseminada. A infecção envolvendo outros órgãos ocorre normalmente em indivíduos imunocomprometidos, que favorece a disseminação hematogênica do fungo (RIPPON, 1988; KAUFFMAN, 1999).

O primeiro evento durante a resposta imune inata nos mamíferos é a ativação dos macrófagos, que fagocitam os patógenos invasores e secretam citocinas que medeiam outros eventos da resposta imune.

Está bem estabelecido que os receptores “toll-like” (TLRs) são capazes de discriminar entre uma variedade de patógenos e são como sentinelas do sistema imune inato (BEUTLER et al., 2006). Entre esta família, o TLR4 tem sido extensivamente estudado. Ao ligar-se ao seu ligante protótipo, o lipopolissacarídeo (LPS), ele induz uma cascata de sinalização que envolve os adaptadores MyD88 (“myeloid differentiation primary response gene 88”) (KAWAI et al., 1999) e Mal (“MyD88 adapter-like protein”, também chamado de TIRAP - “Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein”) (FITZGERALD et al., 2001; YAMAMOTO et al., 2002), terminando na ativação do fator de transcrição NF- κ B e na produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina (IL)-6 (YU et al., 1997; POLTORAK et al., 2000; ALEXANDER e RIETSCHER, 2001; BEUTLER et al., 2001). A produção destas moléculas, que são essenciais para o início da resposta imune, deve ser rigorosamente controlada, pois qualquer excesso pode levar a um resultado indesejável, como a síndrome do choque séptico no caso do TNF- α (BEUTLER et al., 1985; LIU e MALIK, 2006).

Após a estimulação antigênica, o TLR ativa a célula a fim de produzir mediadores inflamatórios. Este processo é mediado por uma via dependente da sinalização intracelular através do MyD88, levando à translocação do NF- κ B do citoplasma para o núcleo. Este por sua vez induz a transcrição de moléculas de adesão, citocinas como IL-1 β , IL-6, TNF- α e interferon gama (IFN- γ), quimiocinas e peptídeos antimicrobianos importantes para o processo inflamatório, direcionando assim a eliminação do microorganismo invasor (MAY e GHOSH, 1998; AKIRA, 2003).

Seguindo a ativação do sistema imune, fortes sinais pró-inflamatórios são gerados, induzindo inflamação e ativação das defesas do hospedeiro. Após a eliminação do

microorganismo invasor, sinais anti-inflamatórios subseqüentes são responsáveis pela resolução do processo inflamatório estabelecido anteriormente (DE WAAL MALEFYT et al., 1991). Estes sinais são cruciais, não somente para o retorno do sistema imune ao balanço homeostático, mas também para a proteção do organismo hospedeiro contra os efeitos deletérios da inflamação exagerada e para o subseqüente reparo tecidual.

A sinalização dependente do TLR4 requer a presença de proteínas ligadoras de LPS (LBP), que atuam como opsoninas, e da molécula acessória CD14 solúvel ou de membrana, que atua como um receptor desta opsonina (ADEREM e ULEVITCH, 2000; AKASHI et al., 2000a; FAURE et al., 2000; LANDMANN et al. 2000; MEDZHITOV e JANEWAY Jr., 2000). Outra molécula importante para o complexo de sinalização do TLR4 é o MD-2, uma proteína secretada (SHIMAZU et al., 1999), que se liga ao domínio extracelular do TLR4 e facilita a ativação do NF- κ B mediada pelo LPS (AKASHI et al., 2000b; YANG et al., 2000).

Alguns estudos têm sugerido também que a estimulação do TLR2 pode resultar na indução de apoptose por ativar sinais pró-apoptóticos (ALIPRANTIS et al., 2000; LOPEZ et al., 2003; INTO et al., 2004).

A apoptose é um processo de morte celular programada que é essencial na manutenção da homeostase dos tecidos dos mamíferos (STELLER, 1995), sendo que o seu papel nas doenças infecciosas tem sido amplamente estudado. Trabalhos com células mononucleares de pacientes com malária ou esquistossomose, quando desafiadas *in vitro* com antígenos do parasita, levam à apoptose destas células (TOURE-BALDE et al., 1996; TOURE-BALDE et al., 2000; CARNEIRO-SANTOS et al., 2000).

Os macrófagos desempenham papel importante no início, manutenção e resolução das respostas inflamatórias no hospedeiro. Entretanto, nem sempre os macrófagos desempenham um papel positivo, algumas vezes podem ser perigosos, principalmente nas situações em que produzem quantidades excessivas de radicais livres, enzimas líticas e citocinas inflamatórias (NATHAN et al., 1980). Isso sugere que os macrófagos devem ser alvo de um controle regulatório rigoroso. A apoptose poderia ser um mecanismo bastante eficiente para este controle, como pode ser observado no controle de células T (RADVANYI et al., 1993), células B (NISITANI et al., 1993) e granulócitos (HASLETT, 1992)

Os camundongos C3H/HeJ são defectivos na expressão do TLR4 devido a uma mutação pontual na porção citoplasmática do TLR4, onde houve a troca de uma prolina por uma histidina na posição 712 da cadeia peptídica (POLTORAK et al., 1998; HOSHINO et al., 1999), o que resulta em uma resposta defectiva ao LPS (HOSHINO et al. 1999). Assim, empregamos estes camundongos em nossos experimentos e também camundongos não deficientes no TLR4 (C3H/HePas) infectados com células leveduriformes do *Sporothrix schenckii* cepa 1099-18 para avaliarmos o papel deste receptor na esporotricose experimental.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. *Sporothrix schenckii* e esporotricose

O primeiro caso de esporotricose foi descrito por Benjamin Schenck em 1898, que isolou a amostra de um paciente com abscesso de tecido subcutâneo no Hospital John Hopkins em Baltimore (SCHENCK, 1898) e enviou para o micologista Erwin F. Smith que identificou o microorganismo como pertencente ao gênero *Sporotrichum*. O segundo relato desta micose foi feito por Hektoen e Perkins em 1900 que classificaram o agente etiológico como *Sporothrix schenckii*. Em 1907, Lutz e Splendore registraram o primeiro caso de infecção natural pelo *S. schenckii* em animais e também demonstraram que era possível cultivar a levedura *in vitro* (LUTZ e SPLENDORE, 1907). Porém, o dimorfismo apresentado por este fungo só foi demonstrado mais tarde, em 1961, por Howard.

Sendo um fungo termodimórfico o *S. schenckii* apresenta duas formas: a de micélio e a de levedura. No meio ambiente ou em laboratório, em temperaturas variando de 25°C a 30°C, o fungo *S. schenckii* cresce na forma de micélio ou bolor. O organismo cresce prontamente em meios de cultura padrão, como o ágar dextrose Sabouraud, em alguns dias até semanas, formando colônias de cor branca ao creme, que se tornam escuras a negras e subseqüentemente enrugadas com o passar das semanas (KAUFFANN, 1999). A forma micelilar saprofítica é caracterizada por hifas delgadas, hialinas, septadas e hifas ramificadas, contendo conidióforos estreitos, cujo ápice forma uma pequena vesícula, com os conídios organizados em grupos, lembrando pétalas de uma flor (LOPES-BEZERRA et al., 2006). *In vivo*, a 37°C, *S. schenckii* está presente como levedura. Nesta forma o organismo se reproduz por brotamento e não forma conídios. Tipicamente a forma de levedura tem de 4 a 6µm de diâmetro e freqüentemente apresenta forma de charuto. *In vitro*, a 37°C, é convertido à forma de levedura em meios suplementados, como o caldo infusão de cérebro e coração ou ágar sangue suplementado com glicose e cisteína (KAUFFMAN, 1999).

O dimorfismo no *S. schenckii* é dependente das vias de sinalização transmembrana que respondem à densidade celular (BETANCOURT et al., 1985; RESTO e RODRIGUEZ-DEL VALLE, 1985), pH do meio, temperatura (RODRIGUEZ-DEL VALLE et al., 1983), concentração de cálcio intracelular (ALSINA e RODRIGUEZ-DELL VALLE, 1984; RIVERA-RODRIGUEZ e RODRIGUEZ-DEL VALLE, 1992; SERRANO e RODRIGUEZ-DEL VALLE, 1992, RODRIGUEZ-DEL VALLE e RODRIGUEZ-MEDINA, 1993), nucleotídeos cíclicos (RODRIGUEZ-DEL VALLE et al., 1984) e efetores da proteína quinase C, como os forbol ésteres (COLON-COLON et al., 1993).

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).

O agente etiológico da esporotricose está presente na natureza, especialmente no solo, e na maioria das vezes penetra no hospedeiro através da pele, por meio de alguns incidentes traumáticos como cortes, espetadas, abrasões ou picada de insetos (URABE e HONBO, 1986). O solo, plantas e matéria vegetal em decomposição são usualmente reservatórios do fungo infecção. A esporotricose não precisa de fatores predisponentes para se desenvolver, pode afetar qualquer idade, sexo ou raça, sendo mais comum, entretanto, em homens adultos, principalmente devido à exposição ocupacional e recreacional. Esta micose foi relatada em vários trabalhadores, como fazendeiros, horticultores, jardineiros, floristas, trabalhadores de florestas, manufatura de papel, mineradores, tratadores de animais, veterinários e trabalhadores de laboratório (BELKNAP, 1989; MORRIS-JONES, 2002). A esporotricose em criança é rara, sendo a frequência relatada variando de 3% a 60% (CARRADA-BRAVO, 1988; PAPPAS et al., 2000).

A transmissão zoonótica também tem sido relatada na literatura, através de picadas ou arranhões de roedores, papagaios, cães, gatos, cavalos e tatus (SCHUBACH et al., 2001; MORRIS-JONES, 2002). Além disso, a inalação, a aspiração ou a ingestão do fungo pode induzir uma infecção sistêmica nos hospedeiros suscetíveis (BELKNAP, 1989). Há uma crescente incidência das formas disseminadas da esporotricose no Brasil, principalmente devido à transmissão zoonótica da doença (LIMA BARROS et al., 2003; WELSH, 2003; SCHUBACH et al., 2005; LOPES-BEZERRA et al., 2006).

A esporotricose tem várias formas de manifestação clínica: 1) linfática, 2) localizada cutânea fixa, 3) multifocal (disseminada) cutânea, e 4) extracutânea (RIPPON, 1982; BELKNAP, 1989; DA ROSA et al., 2005). A forma clínica mais freqüente (cerca de 80% dos casos) é a linfocutânea. Inicia-se como uma lesão nodular ou ulcerada no local da inoculação do fungo e segue via vasos linfáticos regionais caracterizada por lesões nodulares que ulceram (LOPES BEZERRA et al., 2006). Na forma cutânea fixa, o fungo permanece confinado ao local de inoculação, o que geralmente reflete alta imunidade do hospedeiro e é mais comum em áreas endêmicas (BELKNAP, 1989). As formas cutânea disseminada e extracutânea têm sido observadas principalmente em pacientes imunocomprometidos, com doenças hematológicas, diabetes mellitus, uso de drogas imunossupressoras, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou em indivíduos com histórico de abuso do álcool. Entre as formas extracutâneas, as mais comuns são a

osteointerarticular e a pulmonar, mas há relatos de disseminação hematogênica com envolvimento de múltiplos órgãos, como os olhos e o sistema nervoso central (RIPPON, 1982; BIBLER et al., 1986; BELKNAP, 1989; KAUFFMAN, 1999; KAUFFMAN et al., 2000; ROCHA et al., 2001; CARVALHO et al., 2002; SILVA-VERGARA et al., 2005; LOPES-BEZERRA et al., 2006).

A variedade de apresentações clínicas da esporotricose bem, como a regressão espontânea da doença em alguns casos, sugere que a patogenia da infecção está intimamente ligada aos mecanismos de defesa do hospedeiro (RAMOS-ZEPEDA e GONZALEZ-MENDONZA, 1986); no entanto, ainda se conhece muito pouco sobre os aspectos da interação parasita-hospedeiro (TORRES-MENDONZA et al., 1997).

Além do estado imunológico do hospedeiro, outros fatores como a via de infecção, carga fúngica inoculada e fatores de virulência do fungo têm sido relacionados ao desenvolvimento das diversas formas clínicas (TACHIBANA et al., 1998). O tamanho do inóculo *in vivo* desempenha um importante papel (RIPPON, 1988). Um pequeno inóculo implantado através de pequenas lesões envolvendo contato com solo, plantas e vegetais em decomposição, pode induzir imunidade e permitir ao hospedeiro controlar a infecção. Um inóculo maior e mais profundo poderia resultar em infecção localizada ou linfática, dependendo de ter ou não havido contato prévio com o fungo (CHAROENVIT e TAYLOR, 1978; TRAVASSOS e LLOYD, 1980; RESTREPO-GUTIERREZ et al., 1993).

Algumas características do fungo também são responsáveis pelo desenvolvimento das formas clínicas. Kong et al. (2006) demonstraram que cepas de *S. schenckii* isoladas de esporotricose disseminada, quando inoculadas em camundongos, levam ao início da doença mais cedo e lesões mais graves do que as cepas isoladas de esporotricose linfocutânea. Estes isolados de lesões linfocutâneas, por sua vez, induzem a doença mais cedo e lesões mais graves do que as cepas isoladas de esporotricose cutânea fixa. Fernandes et al. (1999) observaram diferenças na composição da parede celular fúngica de acordo com o tempo de cultura em ágar dextrose Saboraud; essas diferenças podem contribuir para as diferentes formas clínicas. Os conídios de culturas mais recentes foram mais virulentos e induziram doença sistêmica aguda; foi observado que essas culturas apresentaram maior teor de ramnose na parede celular. Isso sugere que as diferenças na composição da parede celular podem influenciar o desencadeamento da infecção. A variação na proporção ramnose:manose na parede celular fúngica indica diferenças na expressão de glicoconjugados na superfície celular. Os resíduos de ramnose no peptídeo-polissacarídeo do *S. schenckii* são conhecidos por serem os principais epítomos antigênicos presentes na superfície da célula fúngica (LLOYD e TRAVASSOS, 1975; LOPES-ALVES et al., 1994). Diferenças na composição da parede celular parecem influenciar também em

outras infecções fúngicas clinicamente importantes como aquelas causadas pela *Candida albicans* (MENCACCI et al., 1994) e *Cryptococcus neoformans* (KOZEL, 1995).

Embora tenha sido observada uma clara correlação entre a patogênese do fungo *S. schenckii* e a composição de açúcares da parede celular, outros fatores ou outros componentes da parede celular podem também influenciar o curso da infecção (FERNANDES et al., 1999).

O componente lipídico da superfície celular do fungo também desempenha papel importante na patogênese desta micose, inibindo o processo fagocítico e induzindo a liberação de NO e de TNF- α em cultura de macrófagos (CARLOS et al., 2003). O ergosterol isolado da membrana do fungo *S. schenckii* na forma de levedura pode estar relacionado à sua virulência, como um mecanismo de evasão das espécies reativas do oxigênio durante a fagocitose, formando o ergosterol peróxido (SGARBI et al., 1997).

Além dos polissacarídeos, as enzimas extracelulares também podem contribuir para a virulência do *S. schenckii*. A capacidade do *S. schenckii* de invadir a pele e tecidos cutâneos sugere a presença de proteases como fatores para a invasão dos tecidos. Neste sentido, Tsuboi et al. (1987) observaram que duas proteases (protease I e II) são secretadas pelo *S. schenckii* no meio de cultura, e são capazes de hidrolisar o extrato córneo humano, colágeno tipo I e elastina, que são componentes naturais da pele. Do mesmo modo, o tratamento tópico das lesões murinas com os inibidores de proteases, Chymostatin e Pepstatin, levou à supressão da formação do nódulo e também a sua regressão mais rápida (LEI et al., 1993). Também foi observada uma resposta de anticorpos dirigidos contra estas duas proteases (YOSHIKI et al., 1993).

Moléculas de ácido siálico também podem contribuir para a virulência do *S. schenckii*. 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. Estes resíduos podem ainda ser liberados, formando agregados que interagem com os anticorpos e outros elementos do sistema imune, deixando o fungo livre para proliferar e invadir os tecidos (ODA et al., 1983).

A presença de melanina também tem sido relacionada à virulência de vários fungos patogênicos. No *S. schenckii* a melanina parece proteger os conídios de danos oxidativos por radicais livres e luz ultravioleta e também confere alta resistência à fagocitose pelos macrófagos (ROMERO-MARTINEZ et al., 2000). As células leveduriformes também podem produzir pigmentos semelhantes à melanina *in vivo* e *in vitro*, o que também pode estar relacionado à virulência (MORRIS-JONES et al., 2003). A presença de melanina no *C. neoformans* reduz a sua suscetibilidade à anfotericina B (VAN DUIN et al., 2002). No *S. schenckii* também pode reduzir a eficácia do tratamento (MORRIS-JONES et al., 2003).

A termo-tolerância também parece ser um fator importante para o desenvolvimento de algumas forma clínicas. Alguns trabalhos demonstraram que cepas de *S. schenckii* isolados de lesões extracutâneas parecem ter algum(ns) fator(es) de virulência que os permite causar lesão visceral, uma vez que estes isolados extracutâneos crescem muito bem *in vitro* a 37°C, enquanto muitos dos isolados de lesões cutâneas e linfocutâneas não foram capazes de crescer a 37°C *in vitro* (KWON-CHUNG, 1979; DE ALBORNOZ et al., 1986; TACHIBANA et al., 2001)

Diferenças nos genótipos do *S. schenckii* também podem estar associadas à distribuição geográfica, à virulência e às diferentes formas clínicas da infecção (ISHIZAKI et al., 1996; ISHIZAKI et al., 1998).

A análise do DNA mitocondrial (mtDNA), por RFLP (“restriction fragment length polymorphism”), é um método útil para a identificação, taxonomia, e epidemiologia do *S. schenckii* e tem sido empregada no Japão e Costa Rica (SUZUKI et al., 1988; TAKEDA et al., 1991; ISHIZAKI et al., 1996). Estes estudos permitiram classificar amostras clínicas de *S. schenckii* em dois grandes grupos, os quais são divididos num total de 24 tipos e 9 subtipos (LIN et al., 1999). Os resultados destes estudos demonstraram que os isolados do grupo A são predominantemente da América do Norte, América Central e América do Sul, enquanto que todos os isolados do grupo B pertencem à China, assim como a maioria das amostras obtidas do Japão, Austrália, Coreia e Espanha (SUZUKI et al., 1988; TAKEDA et al., 1991; KAWASAKI et al., 1997; ISHIZAKI et al., 2004).

Os mecanismos imunológicos envolvidos na prevenção e controle da esporotricose micose ainda não estão completamente elucidados. Estudos anteriores demonstraram que a imunidade celular, seja mediada por neutrófilos ou por monócitos, desempenha um importante papel na proteção do hospedeiro contra este fungo (CUNNINGHAM et al., 1979). Tachibana et al. (1999) demonstraram que a imunidade adaptativa contra o fungo *S. schenckii* é expressa por macrófagos ativados pelas células T. O papel desempenhado pela imunidade humoral na esporotricose continua incerto, a caracterização dos antígenos fúngicos ativos durante a infecção poderão permitir melhor compreensão da importância da resposta de anticorpos (NASCIMENTO e ALMEIDA, 2005).

Alguns dos antígenos do fungo podem estar relacionados à resposta imune gerada durante a infecção, como os exoantígenos, que são antígenos celulares liberados no meio de cultura (POLONELLI e MORACE, 1982) e os antígenos de superfície celular do fungo *S. schenckii*, que induzem também a produção de anticorpos e são antígenos presentes tanto na forma micelial quanto na de levedura (CASTILLO et al., 1990).

A interação direta do *S. schenckii* com os macrófagos foi demonstrada em modelo experimental de esporotricose crônica, na qual houve formação de nódulos testiculares após a infecção intraperitoneal dos camundongos. Estes nódulos continham grupos de células

polimorfonucleares e macrófagos com fungos fagocitados. As leveduras permaneceram viáveis nestes nódulos por até de 6 meses (HIRUMA et al., 1988). Porém ainda não se sabe que fator(es) das leveduras possa(m) ser responsável(eis) pela longa sobrevivência das leveduras nesta infecção crônica.

Schubach et al. (2001) demonstraram que os estudos histopatológicos de 70 biópsias de pele revelaram infiltrado inflamatório consistindo de células mononucleares e polimorfonucleares, predominantemente macrófagos e neutrófilos. Em 2,8% dos casos, os agregados de macrófagos estavam bem definidos e circundados por linfócitos e células polimorfonucleares, formando granulomas bem desenvolvidos.

Trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório com esporotricose experimental disseminada demonstraram a existência de um período em que a resposta imune celular do hospedeiro fica mais comprometida com conseqüente agravamento da doença, devido à redução da produção das citocinas IL-1 e TNF- α por macrófagos estimulados com o antígeno solúvel do *S. schenckii* (CARLOS et al., 1992; CARLOS et al., 1994). Estudos mais recentes (MAIA et al., 2006) demonstraram também a participação dos linfócitos Th1 e Th2, sendo estes últimos envolvidos na resposta humoral a essa infecção micótica.

2.2. Receptores “Toll-like”

As células do sistema imune apresentam em sua superfície receptores responsáveis pelo reconhecimento dos produtos microbianos, conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões (“*pattern-recognition receptor*” - PRR), que são componentes importantes da imunidade inata (JANEWAY, 1992). Estes receptores reconhecem padrões moleculares conservados (“*pathogen-associated molecular patterns*” – PAMPs), comuns entre grandes grupos de microorganismos (AKIRA et al., 2001).

Nos últimos anos vários PRRs foram identificados. Entre eles, a família de receptores “Toll-like” (TLR) foi identificada em humanos e camundongos (MEDZHITOV et al., 1997).

A proteína Toll foi inicialmente descrita nas moscas das frutas, a *Drosophila melanogaster*, como um receptor transmembrana tipo I com um papel importante no desenvolvimento dorso-ventral dos embriões dessas moscas. Já a associação de Toll com a defesa antimicrobiana foi inicialmente observada em *Drosophila sp.* por Lemaitre et al. (1996). As moscas deficientes em Toll sucumbiram rapidamente à infecção através de agulhas contaminadas com uma suspensão contendo conídios de *Aspergillus fumigatus*. Em seguida, um homólogo deste receptor Toll (conhecido como “Toll-like receptor 4” – TLR4) foi

demonstrado em mamíferos, estando relacionado à indução da expressão de genes envolvidos nas respostas inflamatórias (MEDZHITOV et al., 1997).

Os TLRs desempenham papel importante na imunidade contra vários agentes infecciosos. Até agora, pelo menos 11 TLRs foram identificados em humanos e 13 em camundongos, sendo fundamentais no reconhecimento dos PAMPs (HURST e VON LANDENBERG, 2008).

Quando são ativados pelos patógenos os TLRs iniciam uma cascata de sinalização intracelular que resulta na produção de várias citocinas pró-inflamatórias e fatores imunomodulatórios podendo inclusive em alguns casos induzir também uma resposta imune adaptativa (O'NEILL e BOWIE, 2007).

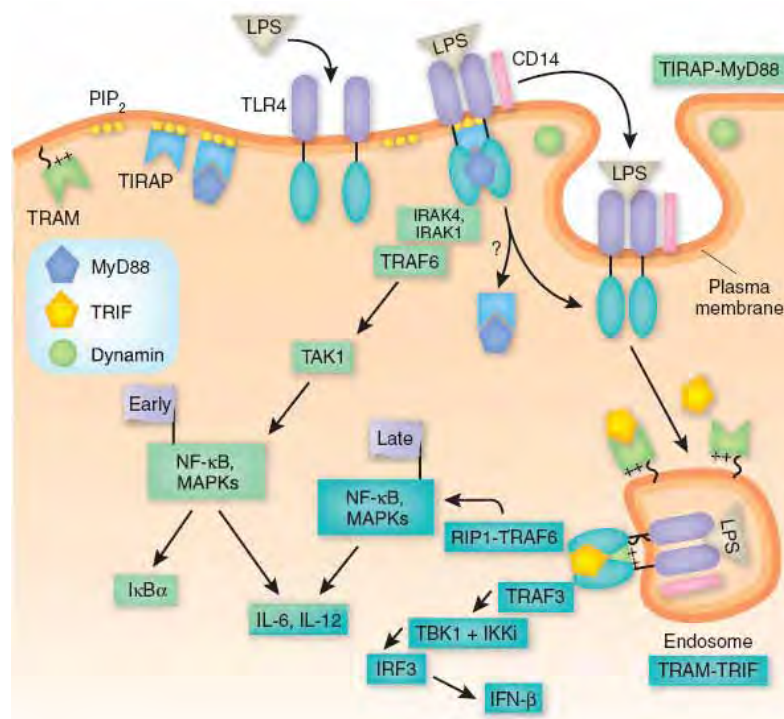
Nos mamíferos os TLRs reconhecem padrões específicos dos componentes microbianos que são conservados entre os patógenos e não estão presentes nos mamíferos, percebendo assim a invasão de vários microorganismos estranhos como bactérias, fungos, protozoários e vírus (TAKEDA e AKIRA, 2004).

Em 1998 Poltorak et al. demonstraram que o TLR4 está envolvido no reconhecimento do LPS, o principal componente da parede celular das bactérias Gram-negativas. O gene TLR4 está localizado na mesma região em que o locus *Lps* (locus gênico da irresponsividade à endotoxina) está mapeado, assim, o TLR4 é o produto gênico que regula a resposta ao LPS (HOSHINO et al., 1999). Porém, trabalhos mais recentes têm demonstrado que tanto o TLR4 quanto o TLR2 estão relacionados à defesa do hospedeiro contra fungos como *Candida albicans* (ROEDER et al., 2004), *A. fumigatus* e *A. niger* (MEIER et al., 2003), e também no reconhecimento do polissacarídeo do fungo *Cryptococcus neoformans* (SHOHAM et al., 2001). Outros membros da família TLR são essenciais para o reconhecimento de uma variedade de componentes microbianos (TAKEDA et al., 2003) como lipoproteínas e peptidoglicanos (TLR2 em combinação com o TLR1 e TLR6)(HIRSCHFELD et al., 2000; ALIPRANTIS et al., 1999; HAJJAR et al., 2001), flagelina (TLR5), RNA (viral) dupla fita (TLR3) e DNA bacteriano (motivos CpG, pelo TLR9). O TLR4 também permite a sinalização em resposta a estímulos inflamatórios não-infecciosos como HSP60 (“heat shock protein”) (OHASHI et al., 2000) e peptídeos de fibrinogênio (SMILEY et al., 2001). O reconhecimento do LPS requer outras moléculas além do TLR4. O LPS liga-se às proteínas ligadoras de LPS (LBP – LPS “binding protein”) presentes no soro, e este complexo LPS-LBP é subsequente reconhecido pelo CD14, uma molécula ancorada pelo glicosilfosfatidilinositol expressa preferencialmente em monócitos/macrófagos e neutrófilos, que reconhece uma variedade de produtos microbianos, inclusive aqueles de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, vírus e fungos, desempenhando um papel essencial na resposta celular aos patógenos (LANDMANN et al., 2000). A estimulação pelo LPS é seguida pela aproximação física entre

CD14 e TLR4, sugerindo que o CD14 e o TLR4 possam interagir na sinalização do LPS (JIANG et al., 2000; DA SILVA CORREIA et al., 2001). CD14 participa do reconhecimento dos microorganismos, no entanto não é essencial para ativação celular (DELUDE et al., 1995). A proteína mielóide de diferenciação-2 (MD-2) foi identificada como uma molécula que se associa à porção extracelular do TLR4 e aumenta a responsividade ao LPS (SHIMAZU et al., 1999; AKASHI et al., 2000). Os macrófagos, as células dendríticas e as células B de camundongos deficientes em MD-2 apresentam respostas ao LPS bastante prejudicadas (NAGAI et al., 2002).

Após o reconhecimento dos PAMPs, uma cascata de eventos de sinalização intracelular é ativada, o que culmina na indução de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-12 (MIGGIN e O'NEILL, 2006).

Como mostrado no Esquema 1, a via de sinalização intracelular do TLR4 inicia-se com a interação com uma proteína adaptadora MyD88 que recruta outras proteína-quinases levando à ativação do NF- κ B (MUZIO et al., 1997; BURNSM et al., 1998, MEDZHITOV et al., 1998).



Esquema 1: Via de Sinalização do Receptor Toll-like 4 (TLR4). O TLR4 reconhece padrões específicos dos componentes microbianos levando a ativação seqüencial de MyD88 e TRIF. MyD88 é um adaptador essencial para a resposta inflamatória. O LPS pode induzir também a ativação das moléculas de sinalização, MAP quinase e NF- κ B, em uma via independente de MyD88. A segunda fase da sinalização através de MAPK e NF- κ B é necessária para a produção de citocinas pro-inflamatórias. (Esquema extraído de WATTS, C. Location, location, location: identifying the neighborhoods of LPS signaling. *Nature*, v. 9, p. 343-345, 2008)

Após a ativação pelo ligante, o MyD88 recruta membros da família de quinases associadas ao receptor de IL-1 (IRAK) e do fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6). Estes adaptadores iniciam uma seqüência de reações de fosforilações que levam a ativação do fator de transcrição NF- κ B, proteino-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e fatores de resposta ao interferon (IRFs). O TLR4 pode se ligar a duas proteínas adaptadoras distintas: o MyD88, que é recrutado pelo “Toll-/IL-1 receptor (TIR)-domain containing adapter protein” (TIRAP – também chamado de Mal) e leva a produção de citocinas pro-inflamatórias; e “TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF), que é recrutado pelo adaptador “TRIF-like receptor adaptor molecule” (TRAM) e ativa a produção de interferons tipo I bem como de citocinas pro-inflamatórias (WATTS, 2008).

O NF- κ B é um fator de transcrição que foi originalmente identificado como um fator nuclear necessário para a transcrição da cadeia leve de imunoglobulinas nas células B. Subseqüentemente, verificou-se que o NF- κ B é expresso em uma grande variedade de tipos celulares, regulando a produção de várias citocinas, moléculas de adesão, fatores anti-apoptóticos, quimiocinas, fatores de crescimento e enzimas induzíveis, como a ciclooxygenase 2 e a óxido nítrico sintase induzível – iNOS (KARIN e LIN, 2002; BALDWIN, 1996; WANG et al., 1996; LIU et al., 1996; CHU et al., 1997; WANG et al. 1998). Nos mamíferos cinco membros da família foram identificados: RelB, c-Rel, p65 (RelA), p100/p52, and p105/p50 (GHOSH et al., 1998). Cada membro da família NF- κ B desempenha um papel importante na resposta mediada pelo LPS.

A capacidade dos TLR de reconhecerem múltiplos alvos em um único agente infeccioso significa que a contribuição de um único TLR na detecção do patógeno pode não ser essencial para a proteção. Em muitos casos dois TLRs diferentes colaboram entre si, ou com outro co-receptor, havendo um sinergismo entre eles, o que leva a uma resposta apropriada para o tipo de microorganismo detectado (OZINSKY et al., 2000; ZAMBONI et al., 2004).

Embora os PRRs que reconheçam o *S. schenckii* ainda não tenham sido identificados, é plausível que o TLR2 e o TLR4 estejam envolvidos, uma vez que vários fungos como *C. albicans*, *A. niger*, *A. fumigatus* e *S. cerevisiae* são reconhecidos por TLR2 e TLR4 (SHOHAM e LEVITZ, 2005).

O TLR4 é expresso principalmente em monócitos, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. Após a ativação do TLR4 pelo seu ligante, os macrófagos podem se tornar células efetoras que liberam citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas do oxigênio para eliminar os antígenos estranhos (MUZIO et al., 2000)

Atualmente muitos estudos, utilizando modelo murino estão focados em determinar o papel dos TLRs em infecções específicas, como pneumonia bacteriana (DESSING et al.,

2007; POWER et al., 2007), doenças fúngicas (NETEA et al., 2006) e infecções virais (HEER et al., 2007; LE GOFFIC et al., 2006).

2.3. Sistema Imune

As doenças fúngicas ocorrem tanto em hospedeiros imunocompetentes quanto em imunocomprometidos, entretanto, o advento do vírus da imunodeficiência humana e síndrome da imunodeficiência adquirida, o emprego de transplantes de órgãos específicos, e o desenvolvimento de terapias imuno- e mielo-supressivas para doenças auto-imunes e neoplásicas, tem resultado em uma maior incidência de infecções fúngicas oportunistas (PATTERSON, 2005).

Os fungos, ou os seus componentes, quando introduzidos num hospedeiro, induzem uma resposta antígeno-específica, que pode ser expressa tanto como uma resposta positiva, que vai levar à eliminação do patógeno, ou supressora (DOMER et al., 1992).

O sistema imune inato desempenha papel importante nas defesas naturais do hospedeiro contra os microorganismos. O reconhecimento de microorganismos patogênicos, seja nos tecidos em contato com o ambiente ou na circulação sistêmica após invasão da circulação sanguínea, é feito pelos macrófagos, células dendríticas, células “natural killer” (NK), granulócitos e monócitos, que atuam como sentinelas do sistema imune inato (BOCHUD et al., 2007). Este processo envolve a ação coordenada de várias famílias de proteínas, entre elas a dos receptores “Toll-like” (AKIRA et al., 2006).

Tanto os fatores inerentes às cepas de *S. schenckii* quanto o estado imunológico do hospedeiro podem determinar as manifestações clínicas da esporotricose. Entretanto, os fatores envolvidos na patogênese do *S. schenckii* e os mecanismos que determinam a virulência permanecem obscuros. A imunidade mediada por células contra os antígenos do *S. schenckii* é o principal mecanismo imunológico da defesa que controla a infecção (CARLOS et al., 1992). Tanto as células T CD4+ quanto os macrófagos são necessários para o desenvolvimento do granuloma, que é um componente importante na resposta normal de defesa contra o patógeno (TACHIBANA et al., 1999; KOGA et al., 2002). Geralmente, escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro é o principal fator para a sobrevivência e/ou a multiplicação de microorganismos no hospedeiro, como observado no *S. schenckii* (UENOTSUCHI et al., 2006).

O sistema imune inato também desenvolveu um sofisticado mecanismo para reconhecer microorganismos invasores, fazer a diferenciação entre diferentes patógenos e iniciar a produção e secreção de moléculas inflamatórias, que contribuem para o

desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa e para a resistência do hospedeiro à infecção (JANEWAY e MEDZHITOV, 2002; TAKEDA et al., 2003).

Durante a infecção fúngica, a geração de uma resposta inflamatória, a morte do fungo e a sobrevivência do hospedeiro dependem de múltiplas vias dependentes ou não de TLR (ROMANI, 2004; LEVITZ, 2004; BROWN, 2006). Constituintes purificados da parede celular fúngica podem ativar mais de uma via de sinalização dependente de TLR; por exemplo, a produção de TNF- α por macrófagos *in vitro* em resposta à fosfolipomana de *Candida albicans* é dependente de TLR2, TLR4 e TLR6 (JOUAULT et al., 2003).

Os macrófagos desempenham importante papel na proteção do hospedeiro contra muitos microorganismos patogênicos e também contra o desenvolvimento de tumores. Sua atividade é regulada através da produção de vários mediadores (HIBBS et al., 1977; LASKIN e PENDINO, 1995). São células efetoras importantes que podem eliminar patógenos, seja através da fagocitose, por ingeri-las diretamente e matá-los e/ou indiretamente pela produção de citocinas, como parte das respostas montadas pelo sistema imune inato e pela apresentação de antígenos que ativa os linfócitos T CD4+ a iniciar uma resposta imune adaptativa. Os macrófagos ativados possuem grande atividade fagocítica e produzem elevadas concentrações de vários mediadores contra os patógenos como as citocinas, intermediários reativos de nitrogênio e oxigênio.

Os intermediários reativos do oxigênio (ROI) e do nitrogênio (RNI) são moléculas altamente tóxicas produzidas em grandes quantidades pelos macrófagos ativados, durante a resposta imune (BOGDAN et al., 2000).

O termo “burst” oxidativo se refere a uma série coordenada de eventos metabólicos, que está dormente nas células em repouso, e acontece quando as células fagocíticas são expostas a estímulos adequados. Sua função é produzir um grupo de agentes microbicidas pela redução parcial do oxigênio, responsável pela morte dependente de oxigênio (BABIOR, 1978).

A morte de patógenos intra- e extracelulares pelos fagócitos é devida em parte à produção de radicais livres do oxigênio. Sob condições fisiológicas normais, a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ocorre em pequenas quantidades e é rapidamente utilizada ou degradada; este balanço intracelular de oxi-redução é importante no sentido de manter a homeostase celular. O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio no estado de oxi-redução da célula, pela produção excessiva de ROI. Longos períodos de exposição ao H₂O₂ em elevadas concentrações pode levar à destruição de estruturas biológicas e a danos celulares irreversíveis. Estes ROI são normalmente produzidos durante o processo inflamatório, estão envolvidos na transdução de sinal e na ativação de genes, podendo também contribuir para o dano celular ou de órgãos do hospedeiro (RAMASARMA, 1990; ADLER et al., 1999).

Muitos agentes, sejam particulados (como bactérias opsonizadas ou zimosan) ou solúveis (como o PMA – “phorbol 12-myristate 13-acetate”), podem ativar o “burst” oxidativo. A ativação, que normalmente se segue à exposição ao estímulo por 30 a 60 segundos, não requer fagocitose nem degranulação, mas simplesmente o contato do estímulo com a superfície do fagócito (BABIOR, 1978).

Além dos ROI, a produção de RNI, particularmente o óxido nítrico (NO), junto com o H₂O₂, medeia a morte ou a inibição do crescimento de células tumorais, bactérias, fungos e parasitas (BREDT e SNYDER, 1992; LORSBACH et al., 1993; SCHMIDT e WALTER, 1994). O NO e os ROI exercem muitos efeitos modulatórios na resposta inflamatória e desempenham papel importante na regulação das respostas imunes. Baixas concentrações de NO produzidas pela enzima óxido nítrico sintase constitutiva (cNOS) e neuronal (nNOS) inibem a expressão de moléculas de adesão, a síntese de quimiocinas e citocinas e a adesão e migração de leucócitos (IGNARRO, 1991a e b). Elevadas concentrações de NO, geradas principalmente pela NOS induzível (iNOS), podem ser tóxicas e pró-inflamatórias. O NO formado pela iNOS nos macrófagos e outras células desempenha muitos papéis na resposta inflamatória. As ações do NO não são, entretanto, dependentes da fonte enzimática, mas do contexto celular, da concentração de NO (dependendo da distância da fonte de NO) e da ativação inicial das células imunes. A inflamação é uma resposta do organismo a lesões relacionadas a estímulos nocivos, físicos ou químicos, ou toxinas microbianas, que estão envolvidas em muitas patologias. O objetivo da resposta inflamatória é desativar ou destruir os microorganismos invasores, fatores irritantes e desencadear os mecanismos de reparo tecidual (MICHEL e FERON, 1997).

Em alguns casos as enzimas cNOS e nNOS podem assumir funções imunológicas previamente associadas a iNOS, como a indução da morte apoptótica das células (WILLIAMS et al., 1998) e o controle de vírus (KOMATSU et al., 1996; BARNA et al., 1996).

A regulação da resposta imune pelos macrófagos pode também ser mediada pela produção de vários outros mediadores como o TNF- α e a IL-6 (MARIN et al., 1997). Da mesma forma, dever haver regulação destes mediadores para a manutenção da homeostasia do sistema imune, uma vez que medeiam papéis importantes, também são capazes de lesar os tecidos do hospedeiro (SARIH et al., 1993; FUKUO et al., 1995; LASKIN e PENDINO, 1995).

As citocinas são produzidas pelas células do sistema imune, como os linfócitos T e células apresentadoras de antígenos, entre elas os macrófagos, e são parte importante da resposta imune contra muitos organismos. Elas contribuem para a proliferação e diferenciação de linfócitos T virgens no seu tipo efetor e também coordenam o mecanismo inflamatório. A IL-10 e a IL-4 convertem as células T na subpopulação Th2 (SWAIN et al.,

1990; FIORENTINO et al., 1991), enquanto que a IL-12 direciona as células T para o subgrupo Th1 (MANETTI et al., 1993).

Algumas citocinas são claramente promotoras da inflamação e sendo assim são chamadas de citocinas pró-inflamatórias, enquanto que outras têm por função suprimir a atividade das citocinas pró-inflamatórias e são chamadas de citocinas anti-inflamatórias. Por exemplo, IL-4, IL-10 e IL-13 são potentes ativadoras dos linfócitos B e também importantes agentes anti-inflamatórios, assim como o fator de crescimento transformante beta (TGF- β). São assim chamadas devido a sua capacidade de suprimir os genes para as citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, TNF- α , quimiocinas, como a IL-8, e moléculas de adesão (DINARELLO, 2000).

As citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β ativam várias proteíno-quinases, o que resulta na translocação ao núcleo do NF- κ B, que afeta a expressão de genes, ativando vários passos da resposta inflamatória (BARNES e KARIN, 1997; FLOHE et al., 1997).

A IL-1 é um mediador importante das respostas de fase aguda no organismo contra a invasão microbiana, reações imunológicas e lesão tecidual. Existem várias evidências relacionando a IL-1 como uma das primeiras e mais significativas moléculas sintetizadas durante a resposta de fase aguda, sendo que seus efeitos biológicos podem se manifestar localmente ou de forma sistêmica. Foi originalmente descrita como um pirogênio endógeno, aumenta as respostas mediadas pelas células T aos mitógenos e antígenos (GERY e WAKSMAN, 1972) devido à sua propriedade de atuar como um fator ativador de linfócitos (MURPHY et al., 1980; ROSENWASSER et al., 1979).

O TNF- α é outro produto dos monócitos/macrófagos, sintetizado e liberado como consequência da estimulação microbiana e lesão tecidual. Medeia uma ampla variedade de atividades biológicas (VASSALLI, 1992), muitas delas coincidentes com as funções da IL-1. No entanto, apesar das semelhanças com a IL-1, o receptor para o TNF é específico e distinto, e a ligação do receptor não é afetada pela IL-1. Ainda assim, muitas das propriedades biológicas do TNF e IL-1 são sobrepostas, particularmente aquelas funções envolvidas com a resposta de fase aguda e atuando de forma sinérgica, participando do processo inflamatório para combater a infecção e lesão (DINARELLO, 1988).

O TNF desempenha um papel central no início e na regulação da cascata de citocinas durante a resposta inflamatória, e ainda está envolvido em eventos locais e sistêmicos mantendo o processo inflamatório. Estudos em camundongos deficientes em TNF (MARINO et al., 1997) mostraram que o TNF também desempenha um papel na homeostasia ou como anti-inflamatório, limitando a extensão e a duração da inflamação, promovendo reparo e recuperação de tecidos lesionados pela presença de agentes infecciosos ou tóxicos. O TNF desempenha um papel importante nas respostas de defesa

do hospedeiro devido as suas múltiplas atividade biológicas, mas pode causar danos graves ao hospedeiro quando produzido em excesso, ou quando o balanço entre as citocinas pró- e anti-inflamatórias está desequilibrado (MAKHATADZE, 1998).

As células apresentadoras de antígenos, inclusive os macrófagos, têm sido relacionadas ao direcionamento no desenvolvimento das células Th1 pela secreção de IL-12 (HSIEH et al., 1993; MACATONIA et al., 1993). Esta citocina é heterodimérica e composta por dois produtos gênicos não relacionados. As subunidades protéicas glicosiladas de 40kDa (p40) e 35kDa (p35) devem estar unidas covalentemente para que a IL-12 biologicamente ativa (IL-12p70) seja secretada (KOBAYASHI et al., 1989; STERN et al., 1990); nenhuma atividade biológica parece ser mediada por cada cadeia recombinante separadamente (WOLF et al., 1991). A IL-12 aumenta a citotoxicidade mediada pelas células NK e pelas células T e estimula a produção de IFN- γ , além de aumentar a produção de células T e NK (KOBAYASHI et al., 1989; GATELY et al., 1991; CHAN et al., 1992; GATELY et al., 1992) por si só ou em cooperação com a IL-2 (CHAN et al., 1992). Gazzinelli et al. (1993) demonstraram que a produção simultânea de IL-12 e TNF- α pelos macrófagos é um evento essencial para a produção de IFN- γ pelas células NK. Além disso, a IL-12 é importante para a indução de NO em macrófagos e é responsável pela imunossupressão que segue a infecção por *Salmonella* (SCHWACHA e EISENSTEIN, 1997). O tratamento das células esplênicas com IL-12 aumenta a capacidade imunossupressora das células, e esta imunossupressão é mediada pelo NO (AL-RAMADI et al., 1992), uma vez que o tratamento destas células com inibidor de NO, bloqueou a supressão.

Além das citocinas pró-inflamatórias, os macrófagos também sintetizam citocinas anti-inflamatórias, a fim de controlar o processo inflamatório gerado pelo agente infeccioso. A IL-10 é um potente inibidor da ativação de monócitos/macrófagos, que inibe a produção de TNF- α , IL-1 e também de IFN- γ de linfócitos, atuando em células acessórias, e também é um potente inibidor da produção de IL-12 pelas células mononucleares ativadas por *Staphylococcus aureus* ou LPS (D'ANDREA et al., 1993). A IL-10 também suprime a liberação de ROI pelos macrófagos, mas somente fracamente a liberação de RNI. Assim, a IL-10 pode ser permissiva para o crescimento dos patógenos microbianos e células tumorais, uma vez que TNF- α , ROI e RNI são os principais produtos antimicrobianos e antitumorais dos macrófagos (BOGDAN et al., 1991).

O TGF- β é uma citocina multifuncional que desempenha um papel na patogênese de várias doenças infecciosas crônicas. Uma variedade de propriedades desativadoras de macrófagos tem sido atribuída ao TGF- β (TSUNAWAKI et al., 1988). Particularmente, a capacidade do TGF- β em interferir com a ativação e mecanismos oxidativos dos macrófagos (TSUNAWAKI et al., 1988; DING et al., 1990) tem sido relacionada à promoção de infecção

persistente por gerar vantagens para a sobrevivência dos patógenos (SHAO et al., 2005). O TGF- β atua também prevenindo a liberação de TNF- α (VODOVOTZ et al., 1993) e RNI pelos macrófagos (BOGDAN et al., 1991; NELSON et al., 1991).

A expressão de genes envolvidos no processo inflamatório, e também a proliferação celular e apoptose, são regulados pela família de fatores de transcrição NF- κ B/Rel (BALDWIN, 1996; BARNES e KARIN, 1997). O membro protótipo desta família é o NF- κ B, que é composto de um dímero de p50 e p65/RelA. O NF- κ B está presente no citoplasma das células em repouso e entra no núcleo em resposta a múltiplos estímulos, como infecção viral, radiação ultravioleta e exposição às citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e IL-1 (BALDWIN, 1996).

Os fatores de transcrição foram as primeiras proteínas de sinalização identificadas como sensíveis à oxi-redução. A família NF- κ B/Rel é o protótipo delas e é composta por vários reguladores importantes na transcrição de muitos genes envolvidos no processo inflamatório e na resposta antioxidante (FORMAN e TORRES, 2001). Outros estudos mostraram que, *in vivo*, a ativação do NF- κ B por peróxido de hidrogênio exógeno foi célula-específica e que a necessidade de geração intracelular de ROI não foi universal, mas estímulo-específica (BOWIE e O'NEIL, 2000).

A ativação do NF- κ B é essencial para a expressão de um grande número de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, que são importantes mediadores da reação inflamatória. O peróxido de hidrogênio e outras espécies reduzidas do oxigênio têm sido propostas como ativadores do NF- κ B em várias células. Em experimentos realizados em ratos observou-se que o peróxido de hidrogênio produzido durante o "burst" oxidativo estimulado pelo PMA em macrófagos alveolares ou em células da linhagem monocítica/macrofágica J77.4 induz a ativação do NF- κ B. No entanto, a produção endógena máxima de peróxido de hidrogênio estimulada pelo PMA durante 30 minutos nos macrófagos alveolares foi $\leq 1,3\text{nmol}/10^6$ células. Isto sugere que a geração relativamente baixa de H₂O₂ endógeno é necessária para a ativação do NF- κ B (KAUL e FORMAN, 1996).

As manifestações clínicas da esporotricose podem ser reguladas tanto pelas diferenças entre cepas do fungo como também do estado imunológico do hospedeiro. Pode haver diferenças na expressão de moléculas de superfície do fungo que são reconhecidas pelos PRRs, ativando o sistema imune, a liberação de citocinas pró-inflamatórias e modulando a resposta imune adaptativa (NETEA et al., 2004; UENOTSUCHI et al., 2006).

Os polissacarídeos da parede celular do *S. schenckii* influenciam a função dos macrófagos. A fagocitose das leveduras *in vitro* pelos macrófagos peritoneais foi inibida pelas galactomananas e ramnomanas purificadas da superfície do *S. schenckii* (ODA et al., 1983). Diferenças na virulência entre cepas de *S. schenckii* parecem ser derivadas de

diferenças na proporção ramnose:manose na superfície celular, que parece se alterar durante a cultura (FERNANDES et al., 1999), o que pode contribuir para diferenças na ativação da resposta imune (UENOTSUCHI et al., 2005).

A resposta do hospedeiro ao antígeno peptídeo-polissacarídeo da superfície celular do *S. schenckii* pode contribuir para a imunidade (TRAVASSOS, 1989). O peptídeo-ramnomanana é o principal componente da parede celular do *S. schenckii* e estimula reações de hipersensibilidade do tipo tardio, bem como respostas de anticorpos (TAKATA e ISHIZAKI, 1983; TRAVASSOS, 1989). O peptídeo-ramnomanana que foi isolado da parede celular do *S. schenckii* foi extremamente reativo com o soro de pacientes com esporotricose (LLOYD e BITOON, 1971). O papel destes polímeros de superfície celular na modulação da resposta imune do hospedeiro não está completamente compreendido, mas sabe-se que a camada externa da parede celular das leveduras e conídios do *S. schenckii* é liberada no meio de cultura (TRAVASSOS, 1985).

A resposta humoral também está presente nos pacientes com esporotricose, como demonstrado pela presença de anticorpos contra antígenos do *S. schenckii* (DE ALBORNOZ et al., 1980) e pela presença de IgG, IgA e IgM (MELENDEZ-RUIZ et al., 1983) nos pacientes com esporotricose.

A variedade da resposta clínica do hospedeiro, a presença de curas espontâneas (MELENDEZ-RUIZ et al., 1983; RAMOS-ZEPEDA e GONZÁLEZ-MENDOZA, 1986) e a evidência de infecção sistêmica nos casos de imunodeficiência celular (HELLER e FUHRER, 1991) sugere a participação da imunidade celular nos mecanismos fungicidas e na eliminação do fungo (HACHISUKA e SASAI, 1981).

2.4. Apoptose

A apoptose, ou morte celular programada tem um papel importante tanto em tecidos normais como nos tecidos em desenvolvimento ou diferenciação. Esta é necessária para a adequada evolução embrionária, assim como para a manutenção da homeostasia nos tecidos adultos. Está presente também na etiologia e patologia de uma variedade de doenças, como o câncer, doenças neurodegenerativas, auto-imunes, infecciosas e/ou inflamatórias, doenças do coração e AIDS (FELLSTRÖN e ZEZINA, 2001), eliminando células desnecessárias ou lesadas sem a indução de um processo inflamatório (VAN OOSTVELDT et al., 1999). A apoptose é caracterizada por uma série de eventos morfológicos, como redução do tamanho da célula, condensação nuclear, segregação da cromatina, brotamento da membrana, fragmentação em corpos apoptóticos, seguida de rápida fagocitose pelas células vizinhas (SARASTE e PULKKI, 2000; FELLSTRÖN e ZEZINA, 2001). A característica bioquímica da apoptose é a degradação do DNA por

DNases endógenas, que cortam as regiões internucleossomais em fragmentos de DNA dupla-fita com 180-200 pares de bases (pb) (HAANEN e VERMES, 1996; SARASTE e PULKKI, 2000).

O processo apoptótico não é um evento raro, e a grande maioria da morte celular que ocorre durante a vida de um organismo envolve esse processo, porém ela é raramente vista *in situ* devido à rápida remoção das células apoptóticas, através de fagocitose, pelas células vizinhas (AMARANTES-MENDES e GREEN, 1999).

Uma célula pode morrer por mecanismos apoptóticos e não-apoptóticos. Se o dano é muito violento (patológico), a célula não tem escolha a não ser sofrer uma morte necrótica, não geneticamente controlada – em que ocorre a perda imediata da integridade da membrana, com agrupamento irregular da cromatina, aumento do volume celular, devido ao acúmulo de água e eletrólitos, e ruptura da membrana plasmática e das organelas celulares, liberando o conteúdo intracelular. Este processo induz a uma reação inflamatória secundária em resposta aos restos celulares liberados, resultando em lesão contendo grupos de células necróticas e, mais tarde, de leucócitos inflamatórios. Por outro lado, se o dano é mais sutil (fisiológico), a morte normalmente ocorre por apoptose. Na apoptose a membrana citoplasmática permanece intacta. Em seus estágios precoces ocorrem mudanças na superfície celular, uma destas alterações é a translocação da fosfatidilserina, um fosfolípido negativamente carregado, do interior para o exterior da membrana citoplasmática (HAANEN e VERMES, 1996; VAN OOSTVELDT et al., 1999; AMARANTES-MENDES e GREEN, 1999; SARASTE e PULKKI, 2000).

As caspases são cisteíno-proteases que atuam em vários níveis de sinalização durante a apoptose, variam na resposta a estímulos externos à membrana celular, em nível de receptores, até a atuação como efetoras na quebra dos componentes celulares. Em resposta a eventos apoptóticos, pré-caspases são processadas por clivagem enzimática gerando enzimas ativas que clivam seus substratos protéicos especificamente através de um resíduo de aspartato (SARASTE e PULKKI, 2000; RISS, 2001). Com exceção da enzima interleucina-1 β -convertase (caspase 1), que está envolvida com inflamação, as enzimas caspases ativas são vistas como marcadores característicos da apoptose (FELLSTRÖN e ZEZINA, 2001). Proteases caspases também têm sido implicadas na translocação da fosfatidilserina para a porção externa da membrana citoplasmática, que medeia o reconhecimento e fagocitose dos corpos apoptóticos pelas células vizinhas (SARASTE e PULKKI, 2000).

A apoptose de macrófagos tem sido reconhecida como um importante mecanismo para a resolução do processo inflamatório (MATSUNAGA e ITO, 2000). Alguns estudos sugerem que fatores derivados dos macrófagos do hospedeiro como intermediários reativos do oxigênio ou o fator de necrose tumoral (TNF)- α sejam responsáveis por induzir apoptose

em macrófagos infectados por micobactérias (ALIPRANTIS et al., 1996; KEANE et al., 1997).

O óxido nítrico pode atuar tanto como um indutor de apoptose quanto como inibidor da morte celular programada, dependendo das condições no microambiente onde está atuando, da presença ou ausência de certas moléculas co-estimulatórias (BRÜNE et al., 1998). A produção de NO em altas concentrações pode atingir também tecidos adjacentes e os infiltrados celulares de macrófagos e células T, levando à apoptose destas células. Este evento é considerado benéfico porque elimina as células desnecessárias evitando a morte necrótica destas células, o que levaria à liberação do conteúdo celular, potencialmente tóxico para o meio extracelular (ALBINA et al., 1993; OKUDA et al., 1996).

As condições que induzem a morte apoptótica da célula estão geralmente associadas com a supressão da inflamação e da imunidade mediada por células. VOLL et al. (1997) demonstraram que as células mononucleares do sangue periférico e os monócitos produzem mais IL-10, uma citocina anti-inflamatória e imunorregulatória, e menos citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-12, quando em presença de linfócitos em apoptose, o que pode significar um mecanismo de inibição do processo inflamatório e redução da imunidade mediada por células (VOLL et al., 1997). Por outro lado, a presença das citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) inibem a apoptose de monócito *in vitro* (MANGAN e WAHL, 1991; MANGAN et al., 1992; KIENER et al., 1997).

Efeitos pró-apoptóticos (em macrófagos e linfócitos T) foram observados com elevadas concentrações de NO exógeno (100-200 μ M) e foram associados com o acúmulo de p53, que ao menos em parte é devido à inibição da degradação do p53-poliubiquitinado mediada pelo NO (GLOCKZIN et al., 1999). No sistema imune, uma função anti-apoptótica para o NO endógeno gerado pela iNOS foi observada nas células B, macrófagos, eosinófilos e linfócitos T. Em macrófagos de camundongos, concentrações não tóxicas de NO levam à ativação do fator de transcrição NF- κ B e proteína ativadora-1 (AP-1) e subseqüentemente à expressão de ciclooxigenase-2 que protege os macrófagos da apoptose (VON KNETHEN et al., 1999^a; VON KNETHEN et al., 1999^b).

Semelhante aos RNI, os ROI também podem induzir ou inibir apoptose de várias células do sistema imune (BOGDAN et al., 2000). Células NK humanas foram rapidamente mortas pelo H₂O₂ produzido por monócitos, enquanto que as células T humanas foram de duas até cinco vezes mais resistentes à apoptose induzida pelo H₂O₂ (HANSSON et al., 1996). Em macrófagos de camundongos, a produção endógena de O₂⁻ contribui para a resistência à apoptose mediada pelo NO, indicando que o balanço de ROI e RNI pode determinar a sobrevivência ou apoptose dos macrófagos (BRÜNE et al., 1997).

A morte celular, que é o efeito mais comum durante a infecção, é um processo adicional importante das interações patógeno-hospedeiro. Várias formas de morte celular foram descritas e a escolha do modo de morte parece depender de diversos fatores como a natureza do patógeno, a carga do patógeno e o local da infecção. A morte de células infectadas, conseqüentemente a morte do agente infectante, pode promover uma eficiente eliminação do patógeno (LABBÉ e SALEH, 2008). Patógenos intracelulares como o *Mycobacterium tuberculosis* inibem a fusão do lisossomo-fagossomo e se desenvolvem pela replicação dentro do fagossomo (CLEMENS, 1996). A estimulação da apoptose dos macrófagos do hospedeiro elimina o local de proliferação e destrói a bactéria infectante (FAIRBAIRN, 2004). Inversamente, certos patógenos induzem a morte das células imunes como um meio de subverter os mecanismos normais de defesa do hospedeiro, e de células epiteliais e endoteliais, para a invasão de camadas mais profundas de um órgão ou circulação sangüínea. A morte de células fagocíticas prejudica a eliminação do patógeno e é danosa ao hospedeiro (LABBÉ e SALEH, 2008).

3. Objetivos

- **Geral**

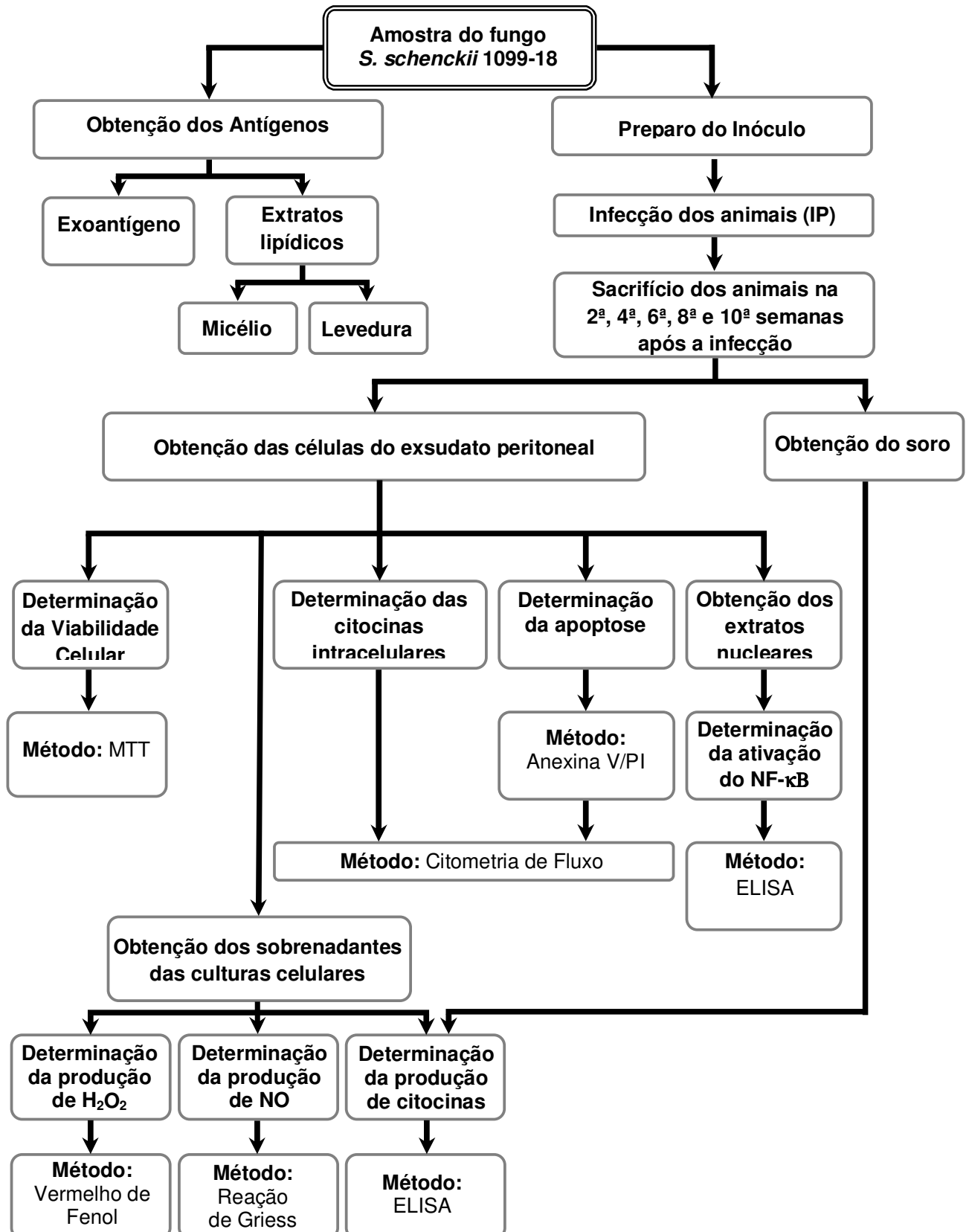
- Avaliar a participação do TLR4 na resposta imune durante a esporotricose experimental, empregando camundongos com expressão defectiva deste receptor (C3H/HeJ) e camundongos controle (C3H/HePas).

- **Específicos**

- Induzir a esporotricose em camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ;
- Avaliar a resposta imune gerada por estas duas linhagens de camundongos durante o período de 10 semanas de infecção;
- Avaliar a produção de intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio pelos macrófagos peritoneais;
- Avaliar a produção das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-12, IL-10 e TGF- β nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais e também no soro dos camundongos;
- Avaliar a translocação do NF- κ B ao núcleo;
- Avaliar a expressão das proteínas CD14 e MD-2 na superfície das células do exsudato peritoneal através da citometria de fluxo;
- Avaliar as citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-12, TGF- β intracelularmente nos macrófagos peritoneais através da técnica de citometria de fluxo;
- Avaliar a presença de apoptose/necrose nas células do exsudato peritoneal.

4. Materiais e Métodos

1. Fluxograma de execução dos experimentos:



2. Microorganismo e condições de cultivo

Amostras de *Sporothrix schenckii* 1099-18 isoladas de um caso humano de esporotricose (da seção de Micologia do Departamento de Dermatologia da Columbia University, New York), foram cedidas pela Dra. Celuta Sales Alviano do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. As formas de micélio foram obtidas em meio de ágar dextrose Sabouraud (Difco) em temperatura ambiente e as formas de levedura em meio BHI (Brain Heart Infusion, Difco) a 37°C sob agitação de 150 ciclos/minuto.

3. Animais de experimentação

Os camundongos C3H/HePas machos pesando entre 18 e 25g, idade entre 45-60 dias, foram obtidos do Biotério de Camundongos Isogênicos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. Os camundongos C3H/HeJ machos pesando entre 18 e 25g, com idade entre 45-60 dias, foram obtidos do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, Araraquara, SP. Os procedimentos envolvendo os animais e seus cuidados foram de acordo com as regras do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – Unesp, parecer Comitê de Ética nº 43/2005 (Anexo 1).

4. Infecção dos animais

Os animais foram infectados através de injeção intraperitoneal com uma suspensão fúngica em solução salina tamponada de fosfatos (PBS), pH 7,2, na concentração de 1×10^7 células leveduriformes de *S. schenckii* por mL. Cada animal foi inoculado com 0,1mL. Os animais foram eutanasiados na 2^a, 4^a, 6^a, 8^a e 10^a semanas de infecção para a coleta dos macrófagos peritoneais e dos soros e realização dos testes biológicos, juntamente com animais não infectados (grupo controle).

5. Preparo do Exoantígeno

A obtenção do exoantígeno do fungo foi feita 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, em seguida, novamente submetida à

radiação UV por mais uma hora. Em seguida, acrescentou-se timerosal na concentração final de 1/5000. A suspensão celular foi, então, 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 et al. (1951).

6. Preparo do extrato lipídico

A extração de lipídeos foi feita no Laboratório de Estruturas Superficiais de Fungos/Micologia/Departamento de Microbiologia e Parasitologia/ Instituto Biomédico/ UFF, sob a orientação da Profa. Dra. Diana Bridon da Graça Sgarbi. Os lipídeos foram extraídos das massas de células dos cultivos dos fungos na forma de micélio (25°C) e na forma de levedura (37°C) por extrações sucessivas em "Waring Blendor" com 10 volumes (mL/g de peso úmido) dos seguintes sistemas solventes: clorofórmio:metanol (C:M) (2:1, v/v) e (1:1) e C:M:H₂O (C:M:H) (4:8:3, v/v) e concentrados até a secar a vácuo (HAKOMORI e MURAKAMI, 1968; SVENNERHOLM e FREDMAN, 1980).

7. Obtenção das células do exsudato peritoneal

Os animais C3H/HeJ e C3H/HePas, em diferentes períodos da infecção e do grupo controle, foram previamente estimulados pela inoculação intraperitoneal de 3,0 mL de tioglicolato de sódio (DIFCO Lab. LTDA) a 3%, três dias antes de serem eutanasiados por inalação de CO₂ em câmara fechada. Estes animais tiveram a pele da região abdominal retirada assepticamente em câmara de fluxo laminar Classe 100 (Veco) e o peritônio exposto, após o que foram inoculados 5 mL de PBS, pH 7,2, gelado na cavidade abdominal. O líquido peritoneal resultante foi coletado com seringa e agulha, transferido para um tubo cônico estéril com capacidade de 15 mL (Corning, Inc.) e centrifugado a 720 *xg* durante 5 min (Centrífuga Fanem, Ind. Bras.) e o sedimento celular lavado três vezes com 3,0 mL de PBS. Após a última lavagem, as células foram ressuscitadas em 1,0 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma) contendo 2β-mercaptoetanol (Sigma) a $2 \times 10^{-5}\text{M}$, penicilina 100 U/mL (Sigma), estreptomicina 100 U/mL (Sigma), L-glutamina 2mM (Sigma) e 5% de soro fetal bovino (Cultilab), sendo o meio assim composto designado de RPMI-1640 completo (RPMI-1640-C) para a contagem de células. O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica tipo Neubauer (Boeco) e a suspensão celular ajustada à concentração desejada para cada teste.

8. Obtenção do soro dos camundongos

Os animais infectados e do grupo controle foram eutanasiados como descrito no item 7 e o sangue destes animais foi colhido por punção cardíaca com seringa e agulhas descartáveis. O sangue total foi acondicionado em tubos de microcentrífuga estéreis de 1,5mL e levados a estufa a 37°C por 20 minutos. Em seguida foram centrifugados a 117xg por 10 minutos. O soro foi, então, colhido e transferido para outro tubo estéril e levado ao banho-maria a 56°C por 30 minutos para a inativação do sistema complemento. Estes soros foram congelados a -20°C até o momento da determinação das citocinas.

9. Avaliação da viabilidade celular – método MTT

Para o ensaio de viabilidade celular, utilizou-se o método baseado na capacidade que têm as células viáveis de clivar o anel tetrazólico presente no MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa, formando cristais de formazana (MOSMANN, 1983).

A uma placa de microtitulação de 96 cavidades de fundo plano (Corning, Inc.) foram distribuídos 100µL por cavidade das suspensões de células do exsudato peritoneal de animais infectados e não infectados, ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL em meio de cultura RPMI-1640-C em presença de 100 µL de exoantígeno na concentração final de 24,6 µg/mL, extratos lipídicos das fases leveduriforme e miceliar na concentração final de 125 µg/mL, de LPS a 1 µg/mL ou somente meio de cultura RPMI-1640-C, em triplicata. As placas foram incubadas por 24 h, a 37°C, em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific). As células aderentes foram tratadas com 100 µL de uma solução de MTT (Across Organics) a 1 mg/mL em RPMI-1640. A placa foi, então, incubada por mais 3 h nas mesmas condições anteriores. Após esta incubação, os sobrenadantes foram descartados e as células aderentes tratadas com 100 µL de isopropanol (Mallinckrodt Chemical) para solubilizar os cristais de formazana formados. A leitura da densidade ótica foi determinada em espectrofotômetro (Multiskan Ascent, Labsystems) em UV/visível, a 540 nm, com filtro de referência de 620 nm.

10. Determinação de liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

A produção de H₂O₂ foi determinada segundo o método descrito por Pick e Keisari (1980) e adaptado por Pick e Mizel (1981). As células do exsudato peritoneal de animais infectados e do grupo controle foram obtidas como descrito no item 7 e ajustadas à concentração de 2×10^6 células/mL, em solução completa de vermelho de fenol, constituída

de 140 mM de NaCl (Qhemis); 10 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,0; 5,5 mM de dextrose (Merck); 0,56 mM de vermelho de fenol (Merck) e peroxidase de raiz forte, tipo II (0,01 mg/mL, Sigma). Alíquotas de 100 μ L foram adicionadas a placas de cultura de tecido de fundo plano contendo 96 orifícios (Corning, Inc.) e acrescentadas de 50 μ L de solução do exoantígeno a 82 μ g/mL, extratos lipídicos das fases leveduriforme e miceliar na concentração final de 416,7 μ g/mL, ou de PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate - Sigma) na concentração de 2×10^{-4} mM em tampão fosfato de potássio ou somente tampão fosfato de potássio como controle de células, e incubadas por 1h em estufa a 37°C em atmosfera úmida, com tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific). Após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de 50 μ L de NaOH 5M (Sigma). A absorbância foi determinada em leitor de ELISA automático (Multiskan Ascent, Labsystems), com filtro de 620nm, contra branco constituído de solução de vermelho de fenol e NaOH 5M. Os resultados foram expressos em nmols de H₂O₂/2x10⁵células, a partir de uma curva padrão previamente estabelecida, constituída de concentrações molares conhecidas de H₂O₂ em tampão de vermelho de fenol.

11. Determinação da Produção de Óxido Nítrico

O NO foi quantificado pelo acúmulo de nitrito no sobrenadante da cultura de células, através do método espectrofotométrico da reação de Griess (GREEN et al., 1982) e as concentrações foram calculadas usando um padrão de NaNO₂.

Os macrófagos peritoneais obtidos como descrito no item 7, foram cultivados a 5×10^6 células/mL em RPMI-C, por 24 horas, em presença do estímulo (LPS a 1 μ g/mL, como controle positivo, exoantígeno, na concentração final de 24,6 μ g/mL, extratos lipídicos das fases leveduriforme e miceliar, na concentração final de 125 μ g/mL, ou somente meio de cultura RPMI-1640-C) a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após esta incubação, alíquotas de 50 μ L do sobrenadante da cultura de células foram transferidas para outra placa de cultura de células estéril contendo 96 orifícios de fundo plano (Corning, Inc.) e acrescentadas de 50 μ L de solução de Griess (1g de sulfanilamida (Merk), 0,1g de dicloro N(1-naftil)etilenodiamina (Merk), 2,5 mL de ácido ortofosfórico (Mallinckrodt Chemical) e água deionizada q.s.p 100 mL) e após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente ao abrigo da luz, a absorbância foi lida em 540nm em espectrofotômetro (Multiskan Ascent, Labsystems) e os resultados expressos em micromoles de nitrito.

12. Determinação da liberação de citocinas

As citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-12, IL-6, IL-10 e TGF- β foram quantificadas nos sobrenadantes das culturas de macrófagos, obtidos como descrito no item 7 e ajustados à concentração de 5x10⁶ células/mL em RPMI-C após 24h de cultura em presença dos antígenos, e também nos soros obtidos como descrito no item 8, através do teste imunoenzimático ELISA de captura para cada citocina (BD OptEIA™, BD Pharmigen), de acordo com as instruções do fabricante.

As placas de 96 cavidades (Corning Inc.) foram adsorvidas com anticorpo de captura, monoclonal, obtido de rato, anti-citocina de camundongo, na concentração adequada para cada citocina, diluído em solução salina tamponada apropriada para cada teste (100 μ L por cavidade) e incubadas “overnight” a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes com solução salina tamponada com fosfatos, pH 7,2, contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T) e bloqueadas com 300 μ L/cavidade de PBS contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab) (diluente de ensaio) e incubadas em temperatura ambiente por 60 min. Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T. Em seguida, foram adicionadas às cavidades 100 μ L do padrão de citocinas ou das amostras, os sobrenadantes das culturas de células e soros a serem testados. As placas foram incubadas em temperatura ambiente por 120 minutos, e lavadas 3 vezes com PBS/T. Em seguida, foram adicionados 100 μ L/cavidade do detector de trabalho, constituído do anticorpo de detecção (anticorpo monoclonal de cabra biotilado anti-citocina de camundongo) e do sistema enzimático (estreptavidina conjugada à peroxidase de raiz forte), diluído à concentração adequada para diluente de ensaio. As placas foram incubadas em temperatura ambiente por 60 min e lavadas 5 vezes com PBS-T. Após este período de incubação, as placas foram lavadas 7 vezes com PBS-T e em seguida adicionadas de 100 μ L do substrato (TMB Substrate Reagent Set, BD Biosciences) a cada cavidade. A reação foi interrompida adicionando-se 50 μ L de H₂SO₄ 1M a cada cavidade. A absorbância foi lida a 450nm em espectrofotômetro UV/visível para microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems), as concentrações de cada citocina foram quantificadas utilizando-se uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas dos padrões de cada citocina e os resultados foram expressos em pg/mL.

13. Determinação das citocinas intracelulares IL-1, IL-10, IL-12, TNF- γ e TGF- α

Para a determinação das citocinas intracelulares, as células do exsudato peritoneal, obtidas como descrito no item 7, foram ajustadas à concentração de 2x10⁶ células/mL. As células foram cultivadas em placas de poliestireno de 6 cavidades por 1h, a 37°C, em

atmosfera úmida com tensão constante de CO₂ (5% CO₂/95% ar). Em seguida, as células não aderentes foram removidas por lavagens com RPMI-C e as células aderentes tiveram o volume inicial restabelecido com RPMI-C. Parte destas células foram estimuladas com 25 ng/mL de PMA (Sigma) e 1 µg/mL de ionomicina (Sigma), e a outra parte não recebeu estímulo. As células, assim tratadas, foram incubadas por 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, por 4 horas. Em seguida, foi adicionado 10 µg/mL de brefeldina A (Sigma) a todas as cavidades e a placa foi incubada nas mesmas condições de temperatura e tensão de CO₂, por mais duas horas. A brefeldina A foi utilizada para melhorar a análise das citocinas intracelulares por ser um inibidor da secreção de proteínas, permitindo o acúmulo das citocinas no complexo de Golgi e, conseqüentemente, aumentando o sinal que pode ser detectado pelo citômetro de fluxo. Após o período total de seis horas de incubação, as células aderentes, tanto estimuladas *in vitro* quanto não estimuladas, foram recolhidas com o auxílio de um “cell scraper” (Corning) e transferidas em PBS contendo 1% de BSA (soro-albumina bovina) para respectivos tubos cônicos e centrifugadas a 720 *xg* (Centrífuga 5810R - Eppendorf) por 5 minutos. Em seguida, as células foram lavadas uma vez com PBS contendo 1% de BSA (720 *xg* - Centrífuga 5810R - Eppendorf) por 5 minutos e ressuspensas igualmente em PBS contendo 1% de BSA.

Adicionou-se às suspensões celulares a solução Mouse FcBlock™ (BD Biosciences) e as células foram incubadas a 4°C, por 20 minutos. Terminada esta incubação, as células foram distribuídas aos respectivos tubos de microcentrifuga de 1,5 mL e iniciou-se a marcação da molécula de superfície CD11b, uma vez que a produção de citocinas foi analisada nas subpopulações de macrófagos peritoneais. Para isso, foi adicionado o anticorpo anti-CD11b conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC – BD Biosciences) a cada tubo e foram incubados por 30 minutos a 4°C, ao abrigo da luz. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS contendo 1% BSA (720 *xg* por 5 minutos - Centrífuga 5810R - Eppendorf) e ressuspensas na solução BD CytoFix/CytoPerm™ (BD Biosciences) que é responsável pela fixação e permeabilização das células. Após uma incubação de 20 minutos, a 4°C ao abrigo da luz, as células foram lavadas mais duas vezes com tampão BD Perm/Wash™ (BD Biosciences). As células foram então ressuspensas em 50 µL do tampão BD Perm/Wash™ e adicionados em todos os tubos o respectivo anticorpo monoclonal citocina-específico e anticorpo monoclonal isotipo-controle, todos conjugados à ficoeritrina (PE - BD Biosciences), com exceção do anticorpo anti-TGF-β que era biotinilado. As células, assim tratadas, foram incubadas por 30 minutos, a 4°C ao abrigo da luz. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com tampão BD Perm/Wash™ e aos tubos, exceto àqueles destinados à marcação do TGF-β e seu respectivo isotipo controle, foram

adicionados de PBS contendo 1% de formol e acondicionados a 4°C ao abrigo da luz até o momento da análise no citômetro de fluxo.

Aos tubos contendo as células incubadas com o anticorpo anti-TGF- β biotilado e seu isotipo-controle acrescentou-se a estreptavidina conjugada à PE e os mesmos foram incubados por mais 30 minutos, a 4°C ao abrigo da luz. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com o tampão BD Perm/Wash™ e adicionadas de PBS 1% de formol. Assim como os demais, estes tubos foram acondicionados a 4°C ao abrigo da luz até momento da análise no citômetro de fluxo. A análise dos dados foi feita no citômetro FACSCanto, usando o programa FACSDiva (BD).

14. Determinação da Expressão de CD14 e MD-2

O CD14 é uma proteína ligada à superfície dos macrófagos que faz parte do complexo de reconhecimento do LPS, junto com o TLR4 e MD-2. O MD-2 está diretamente associado ao TLR4. A determinação da expressão destas proteínas, CD14 e MD-2, foi realizada por citometria de fluxo nas células do exsudato peritoneal obtidas como descrito no item 7, ajustadas à concentração de 2×10^6 células/mL em RPMI-C.

As suspensões celulares foram transferidas para um tubo cônico e centrifugadas a 720xg (Centrífuga 5810R - Eppendorf) por 5 minutos. O sedimento celular foi solubilizado em PBS contendo 1% BSA e acrescentado da solução Mouse FcBlock™ (BD Biosciences). Estas suspensões foram incubadas por 20 minutos, a 4°C, e, em seguida, iniciada a marcação das proteínas de superfície celular CD14 e MD-2. As células foram incubadas por 30 minutos, a 4°C, com quantidades saturantes dos anticorpos monoclonais anti-MD-2 (BD Biosciences) conjugado à PE e anti-CD14 conjugado ao FITC (BD Biosciences). Imunoglobulinas isotipo-específicas, não reagentes, marcadas com os mesmos fluorocromos (BD Biosciences), foram utilizadas como controles (isotipo controle). Ao término desta incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS contendo 1% de BSA a 720xg por 5 minutos (Centrífuga 5810R - Eppendorf) e ressuspendidas em PBS contendo 1% de formol. As células permaneceram em solução de PBS-formol, a 4°C ao abrigo da luz, até o momento da análise no citômetro de fluxo FACSCanto (BD). Para análise dos dados foi utilizado o programa FACSDiva (BD).

15. Determinação da ativação do fator de transcrição NF- κ B

A ativação do NF- κ B foi avaliada nas 2ª, 4ª, 6ª, 8ª e 10ª semanas de infecção com a amostra 1099-19 do fungo *S. schenkii*, utilizando-se o kit NF- κ B ActivELISA™ (Imgenex).

Para tanto, foi necessário a obtenção dos extratos nucleares das células do exsudato peritoneal dos camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas infectados e dos animais controles. Foram utilizados 5 animais para cada semana do experimento.

15.1. Obtenção do extrato nuclear

As células do exsudato peritoneal foram obtidas assepticamente, conforme descrito anteriormente, e a concentração celular foi ajustada a 2×10^6 células/mL em RPMI-C. A obtenção do extrato nuclear foi feita utilizando-se o “Lysate Preparation Module”, contido no kit NF- κ B ActivELISA™ (Imgenex), utilizando-se tampões e soluções que acompanhavam o mesmo, de acordo com as instruções do fabricante. Uma alíquota de 2mL desta suspensão celular foi transferida para um tubo cônico e foi centrifugada a 720 xg , por 5 minutos, a 4°C e o sedimento lavado com PBS-PMSF. O sedimento foi mantido em gelo e tratado com 1mL do tampão de lise hipotônico, homogeneizado com a pipeta e incubado por 15 minutos no gelo. Após a incubação, cada tubo foi acrescentado de 50 μ L da solução detergente 10% e agitado vigorosamente por 10 segundos. As células foram centrifugadas por 30 segundos, a 25630 xg (Centrífuga 5810R - Eppendorf), a 4°C. O sedimento foi, então, tratado com o tampão de lise nuclear, constituído de ditioneitol (DTT), tampão de extração e de um coquetel inibidor de protease (PIC), homogeneizando muito bem com a pipeta e agitado vigorosamente por 30 segundos. Foi incubado por 30 minutos, a 4°C e, em seguida, centrifugado a 4°C a 25630 xg (Centrífuga 5810R - Eppendorf), durante 10 minutos e o sobrenadante obtido foi coletado e acondicionado a -80°C até o momento da realização do teste. Uma pequena alíquota destes extratos foi usada para dosagem de proteínas pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

15.2. Ensaio de ativação do fator de transcrição NF- κ B

Este ensaio foi realizado conforme as instruções fornecidas pelo protocolo do kit NF- κ B/p65 ActivELISA™ (Imgenex) e empregando-se as soluções e tampões que acompanhavam o mesmo. As placas de 96 cavidades foram sensibilizadas com o anticorpo de captura e incubadas “overnight” (12-24h), a 4°C. Após esta incubação, as placas foram lavadas e bloqueadas utilizando-se o tampão de lavagem contendo 1% de BSA. Em seguida, foram adicionados 100 μ L das amostras e do padrão de NF- κ B em diferentes concentrações. As amostras foram diluídas 1/10 em tampão de bloqueio a fim de se alcançar a concentração de 15 a 1000ng/mL de proteínas no extrato nuclear, sugerida pelo

fabricante. As placas foram novamente incubadas por 4 horas, em temperatura ambiente. Durante esta incubação, foi proporcionada a ligação específica da forma ativa do NF- κ B, contida nos extratos nucleares, aos anticorpos específicos imobilizados nas cavidades da placa. Terminado este período de incubação, as cavidades foram lavadas 4 vezes com 300 μ L por cavidade de tampão de lavagem. Foram adicionados então 100 μ L por cavidade do anticorpo de detecção diluído em tampão de bloqueio e as placas foram incubadas por uma hora, em temperatura ambiente. Estes anticorpos, usados para detectar o NF- κ B, reconhecem um epítipo nas subunidades p65 que se torna acessível apenas quando este fator nuclear encontra-se ativado e ligado ao seu DNA alvo. Após esta incubação, as cavidades foram novamente lavadas quatro vezes com o tampão de lavagem (300 μ L por cavidade) e o anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina foi adicionado (100 μ L por cavidade). Ao término de mais uma incubação de 1 hora em temperatura ambiente, foram executadas cinco lavagens como já descrito acima.

Como última etapa do ensaio, foram adicionados às cavidades 100 μ L da solução de substrato (pNPP - p-Nitrofenil fosfato) e a placa foi incubada por 30 minutos, em temperatura ambiente e, em seguida, foi feita a leitura em espectrofotômetro de microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems), usando-se o filtro de 405 nm. As concentrações de NF- κ B foram determinadas através de uma reta padrão com concentrações conhecidas do padrão de p65 recombinante e expressas em ng/mL.

16. Determinação da Apoptose das Células do Exsudato Peritoneal

A determinação da apoptose nas células do exsudato peritoneal dos camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ, infectados ou não com o fungo *S. schenckii*, foi baseada na externalização da fosfatidilserina (ZHANG et al., 1998). Para isso, as células do exsudato peritoneal coletadas como descrito no item 7, foram ajustadas a concentração de 2×10^6 células/mL em meio RPMI-C. As suspensões celulares foram lavadas duas vezes com PBS contendo 1% de BSA. O sedimento celular foi tratado com 100 μ L de tampão de ligação de anexina V (BD Biosciences) e acrescento de 5 μ L de Anexina V conjugada ao FITC (BD Biosciences), que vai se ligar à fosfatidilserina, e de 10 μ L da solução de iodeto de propídio (BD Biosciences), para confirmar se a ligação da Anexina V não ocorreu somente pela perda da integridade da membrana plasmática. As suspensões celulares foram incubadas por 15 minutos, ao abrigo da luz e, em seguida, foram analisadas por citometria de fluxo (FACSCanto BD). Para análise dos dados foi utilizado o programa FACSDiva (BD).

17. Análise dos Resultados

Todos os experimentos foram realizados usando-se cinco animais por semana de infecção e cada determinação foi executada em triplicata. A análise estatística dos resultados foi feita por intermédio do programa estatístico GraphPad InStat aplicando-se análise de variância com determinação do nível de significância para $p < 0,05$, através de comparações múltiplas (teste de Tukey).

5. Resultados

5.1. Determinação da Viabilidade Celular

A determinação da viabilidade celular foi realizada em células do exsudato peritoneal obtidas de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados, em diferentes períodos da infecção e do grupo controle. As células foram mantidas em cultura por 24h em meio de cultura RPMI-1640-C. Os resultados obtidos nas diferentes semanas de infecção foram expressos em percentual de viabilidade como média \pm desvio padrão de 5 animais por semana estudada e estão ilustrados nas Figuras 1 e na Tabela 1 (Apêndice).

O teste de viabilidade celular foi realizado nas culturas celulares a fim de observarmos se as condições de cultura, bem como a infecção no animal ou os antígenos utilizados como estímulo poderiam ser tóxicos para as culturas celulares. Os resultados aqui apresentados demonstram que a infecção provoca uma pequena alteração na viabilidade das células mantidas em culturas nas duas linhagens de camundongos estudadas, porém esta redução da viabilidade celular observada no decorrer da infecção não afeta os resultados de nossos testes.

Considerando-se como a maior viabilidade celular (100%) aquelas culturas celulares realizadas somente em presença de meio RPMI-1640-C, foram calculados os demais percentuais das substâncias testadas no presente estudo.

Nas células tratadas com o exoantígeno (ExoAg), observou-se pequena variação na viabilidade das células, sendo que os menores valores foram encontrados entre os animais C3H/HePas não infectados (Figura 1A), na oitava e décima semanas do estudo, sem diferenças estatisticamente significativas em relação às demais semanas frente ao mesmo estímulo. O LPS mostrou os menores valores de viabilidade celular entre a quarta e oitava semanas, entretanto com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) somente quando se compara a sexta com a segunda semana.

Quando as células foram tratadas com o extrato lipídico da fase leveduriforme (LeL) foi observada uma variação na viabilidade celular dos animais C3H/HePas e C3H/HeJ infectados (Figuras 1B e 1D, respectivamente), comparando-se as segunda e sexta semanas, não estatisticamente significativas quando se compara as segundas semanas ($p > 0,05$), mas significativas quando se compara as sextas semanas ($p > 0,01$) entre as duas linhagens. Do mesmo modo, quando tratadas com o extrato lipídico da fase miceliar (LeM) observamos que as células dos animais C3H/HePas infectados foram mais suscetíveis à presença deste estímulo na cultura de células, com menor viabilidade observada na quarta e décima semanas de infecção, porém esta redução não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Este resultado foi mais significativo nas células dos camundongos C3H/HeJ infectados, onde observamos uma redução significativa da viabilidade das células quando

mantidas em cultura durante o período que vai da quarta até a sexta semana ($p > 0,05$ quando se compara a segunda semana com a quarta, $p < 0,01$ quando se compara a sexta com a segunda semana e $p < 0,001$ quando se compara tanto a quarta quanto a sexta semanas com a oitava semana).

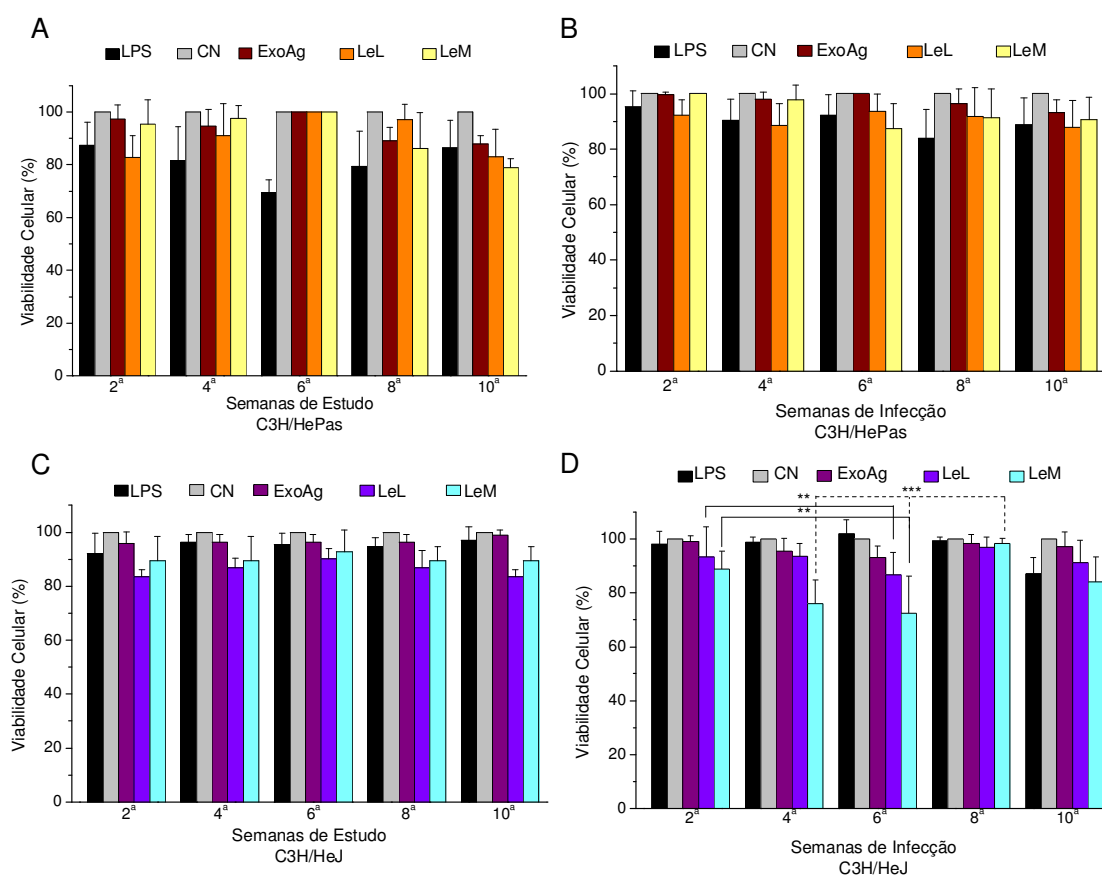


Figura 1 – Viabilidade das células do exsudato peritoneal (PEC) de camundongos C3H/HePas não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* e de camundongos C3H/HeJ não infectados (C) e infectados (D) com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas. Os macrófagos peritoneais de animais infectados e não infectados foram cultivados em presença de exoantígeno (ExoAg), extratolipídico da fase leveduriforme (LeL) e micelial (LeM), LPS ou somente em presença do meio RPMI-1640C como controle de células. Cada animal estudado foi avaliado em triplicata no momento de execução do teste. Os resultados foram expressos em percentual (%) como média \pm desvio padrão de cinco animais por semana de infecção. ($p < 0,01$, *** $p < 0,001$)**

5.2. Determinação da Produção de Peróxido de Hidrogênio

A determinação da liberação de peróxido de hidrogênio foi realizada em células do exsudato peritoneal de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ após 1h de incubação em diferentes períodos de infecção e do grupo controle em presença do ExoAg, LeL, LeM, PMA (como controle positivo) ou somente solução tamponada de fosfato (como controle negativo). Os resultados obtidos nas diferentes semanas de infecção estão representados na Figura 2 e na Tabela 2 (Apêndice).

Embora o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), bem como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), provenientes do “burst” oxidativo mitocondrial dos macrófagos, desempenhem papel fundamental na atividade bactericida destas células, as células do exsudato peritoneal tanto dos camundongos C3H/HePas quanto dos C3H/HeJ infectados pelo fungo *S. schenckii* não foram estimuladas pelo ExoAg do fungo a produzirem H_2O_2 ($p < 0,001$ quando comparados com os respectivos controles positivos – Figura 2B), com exceção da 2ª semana nos camundongos C3H/HePas infectados, onde houve produção deste mediador induzida pelo ExoAg.

O LeL (Figura 2B) foi mais eficaz que o ExoAg em estimular a produção de H_2O_2 e mesmo assim em pequenas quantidades nos animais infectados, significativamente menores que o controle positivo – PMA na segunda ($p < 0,05$) e quarta ($p < 0,01$) semanas de infecção.

Entre os antígenos testados, o maior estímulo para a produção de H_2O_2 foi o extrato lipídico da fase micelar (Figura 2B) na linhagem C3H/HePas, com valores estatisticamente significativos quando comparados com as mesmas semanas em presença do ExoAg ou LeL ($p < 0,01$). O mesmo resultado em relação aos camundongos C3H/HeJ foi observado, embora com produção de H_2O_2 menor neste grupo de animais, observamos também que o LeM induz uma resposta através da estimulação do “burst” oxidativo, sendo as maiores concentrações observadas na segunda e décima semanas de infecção ($p < 0,001$ quando comparados a quarta, sexta e oitava semanas).

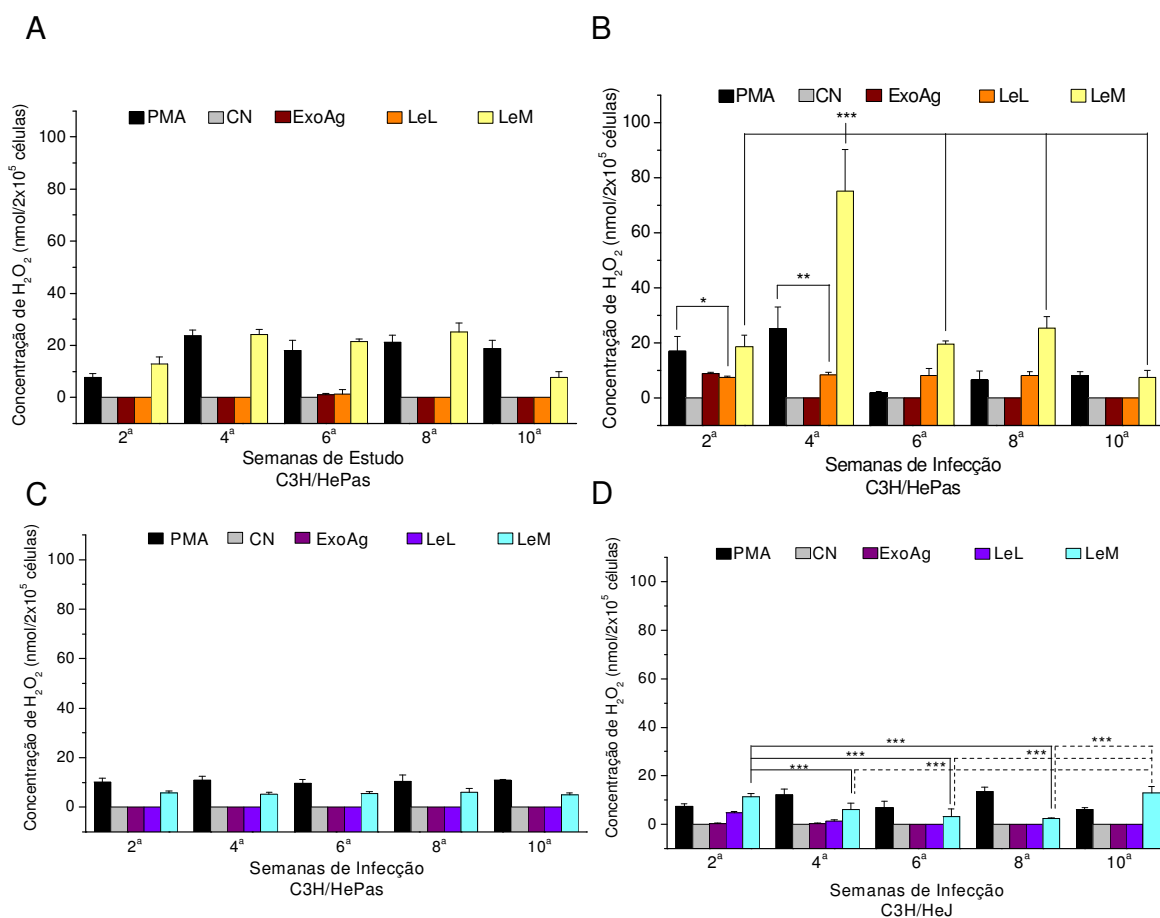


Figura 2 – Produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em cultura de células do exsudato peritoneal de camundongos C3H/HePas não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* e de camundongos e C3H/HeJ não infectados (C) ou infectados (D) com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas. As células do exsudato peritoneal dos animais infectados foram cultivadas em presença do exoantígeno (ExoAg), extratolipídico da fase leveduriforme (LeL) e micelial (LeM), PMA (como controle positivo), e somente tampão fosfato, como controle negativo. As concentrações de peróxido de hidrogênio foram calculadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de H_2O_2 . Cada animal estudado foi avaliado em triplicata no momento de execução do teste. Os resultados foram expressos em nmols de $H_2O_2/ 2 \times 10^5$ células, como média \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

5.3. Determinação da Produção de Óxido Nítrico

A determinação da liberação de NO foi realizada em sobrenadantes de culturas de células do exsudato peritoneal de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ em diferentes períodos de infecção com o fungo *S. schenckii* e do grupo controle, em presença dos antígenos do fungo ExoAg, LeL e LeM, de LPS (como controle positivo) ou somente meio RPMI-1640-C (como controle negativo). Os resultados obtidos nas diferentes semanas de infecção estão representados na Figura 3 e Tabela 3 (Apêndice).

Nos camundongos C3H/HePas não infectados (Figura 3A) observou-se elevadas concentrações de NO frente ao LPS enquanto que quando o LeL foi usado nas culturas celulares a produção de NO ocorreu em maiores concentrações na segunda e principalmente na oitava e décima semanas, estatisticamente significativos quando comparados com a quarta e sexta semanas ($p < 0,01$ em relação com a oitava e décima semanas).

Quando as células dos camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ foram tratadas com o ExoAg (Figura 3), observou-se que houve apenas uma pequena liberação de NO em todos os grupos testados, com $p < 0,001$ quando comparada com o respectivo controle positivo, exceto na décima semana dos animais C3H/HeJ ($p > 0,05$).

Os antígenos lipídicos do fungo apresentaram maiores níveis de liberação de NO em relação ao ExoAg. Observamos maiores níveis de NO no período entre a segunda e oitava semanas de infecção entre os camundongos C3H/HePas infectados quando as células foram tratadas com o LeL (Figura 3B), valores estatisticamente significativos quando comparado com o ExoAg no mesmo período ($p < 0,001$). Em relação ao LeM (Figura 3B) observou-se baixa produção de NO durante todo o período do estudo.

Quando se analisou a produção de NO entre os camundongos C3H/HeJ não infectados, verifica-se que o ExoAg (Figura 3C) foi o único antígeno a induzir a produção desta molécula, o que ocorreu somente na décima semana de infecção, estatisticamente significativo quando comparado com a oitava semana ($p < 0,001$) (Figura 3C).

Entre os camundongos C3H/HeJ infectados (Figura 3D) a produção de NO foi muito baixa, inclusive quando estimulada pelo LPS. No entanto, os maiores níveis de produção de NO foram observados em resposta ao LeL, principalmente na quarta semana de infecção ($p < 0,05$ em relação à sexta semana e $p < 0,001$ em relação à oitava).

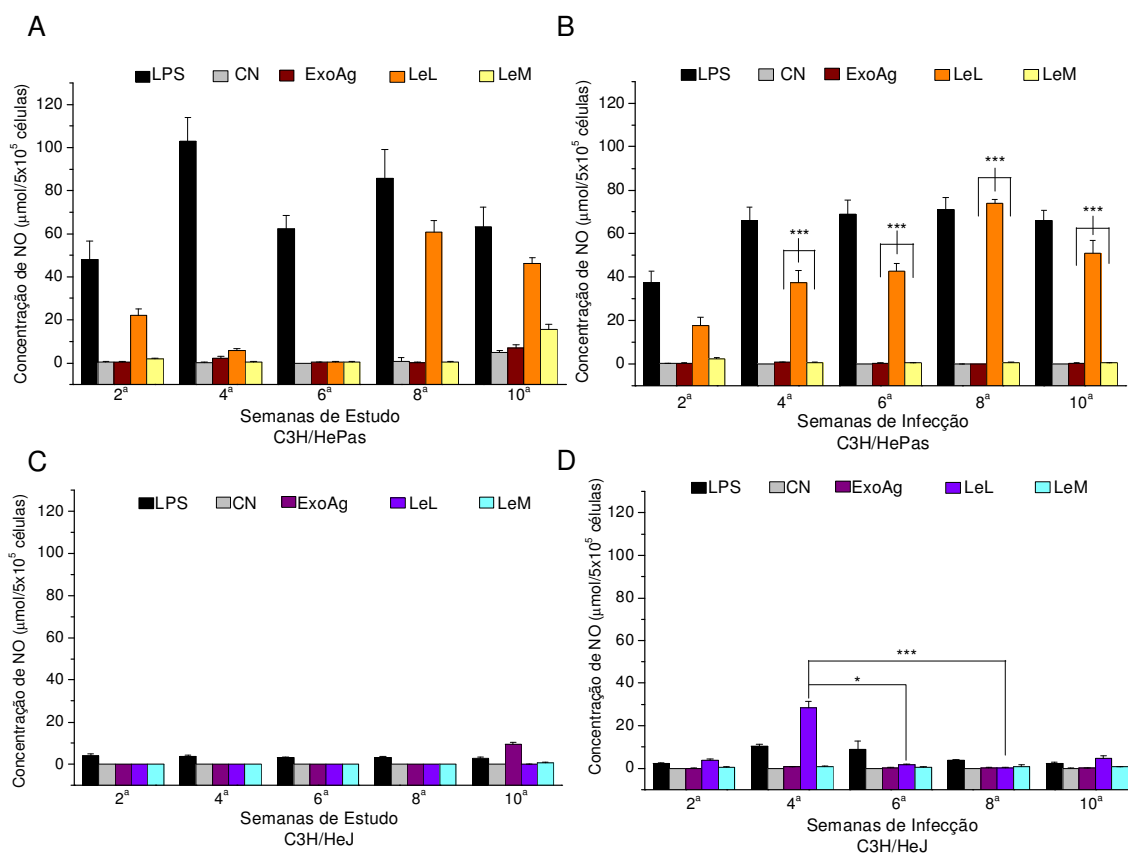


Figura 3 – Produção de NO em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* e de camundongos e C3H/HeJ não infectados (C) ou infectados (D) com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas. Os macrófagos dos animais infectados e não infectados foram cultivados em presença de exoantígeno (ExoAg), extratolipídico da fase leveduriforme (LeL) e miceliar (LeM), LPS e somente meio RPMI-1640C. Cada animal estudado foi avaliado em triplicata no momento de execução do teste. As concentrações de nitrito foram obtidas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio (NaNO₂) e os resultados expressos em µmols de nitrito/5x10⁵ células, como média ± desvio padrão de 5 cinco animais por semana de infecção (*p<0,05, ***p<0,001).

5.4. Determinação da Produção de IL-1 β

A determinação da produção de IL-1 β foi realizada nos sobrenadantes de culturas de macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ em diferentes períodos de infecção com o fungo *S. schenckii* e do grupo controle, em presença dos antígenos do fungo ExoAg, LeL e LeM), do LPS (como controle positivo) ou somente meio RPMI-1640-C (como controle negativo) e também nos soros desses mesmos animais infectados ou não (controle). Os resultados obtidos nas diferentes semanas de infecção foram calculados através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IL-1 β e estão representados nas Figuras 4 e 5 e Tabelas 4 e 5 (Apêndice), para os sobrenadantes e para os soros, respectivamente, como média \pm desvio padrão de cinco animais por semana estudada.

Quando estimuladas com o ExoAg observou-se uma menor produção de IL-1 β no período entre a quarta e sexta semanas de infecção nos camundongos C3H/HePas (Figura 4B), embora não estatisticamente significativos ($p > 0,05$). Por outro lado analisando-se a produção de IL-1 β pelos animais C3H/HeJ infectados observamos um perfil diferente de liberação deste mediador, com alta concentração encontrada apenas na oitava semana, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) quando comparado às demais semanas.

A resposta ao LeL foi maior na segunda semana de infecção nos camundongos C3H/HePas, com uma menor produção entre a quarta e a sexta semanas de infecção ($p < 0,001$ em relação as demais semanas) e novo aumento na oitava e décima semanas (Figura 4B). Os camundongos C3H/HeJ infectados produziram concentrações muito menores desta citocina durante o período estudado, e uma redução na produção de IL-1 foi observada nas semanas seis e oito, mais tardiamente do que aquela observada nos animais C3H/HePas (Figura 4D).

Nas células tratadas com o LeM observamos também menor produção de IL-1 β no período que vai da quarta a oitava semana de infecção nos camundongos C3H/HePas (Figura 4B), estatisticamente significativa em relação as semanas dois e dez ($p < 0,001$). Entre os camundongos C3H/HeJ observamos os menores níveis de produção de IL-1 β na sexta e oitava semanas (Figura 4D), com valores de $p < 0,001$ quando comparado com a segunda e décima semana.

Em relação à presença da IL-1 β no soro dos animais (Figura 5), observou-se que a maior liberação ocorreu nos camundongos C3H/HePas, com maior concentração na segunda semana de infecção. Nos camundongos C3H/HeJ, observou-se menores concentrações desta citocina nos soros dos camundongos infectados e o pico de liberação de IL-1 ocorreu mais tarde, na sexta semana de infecção.

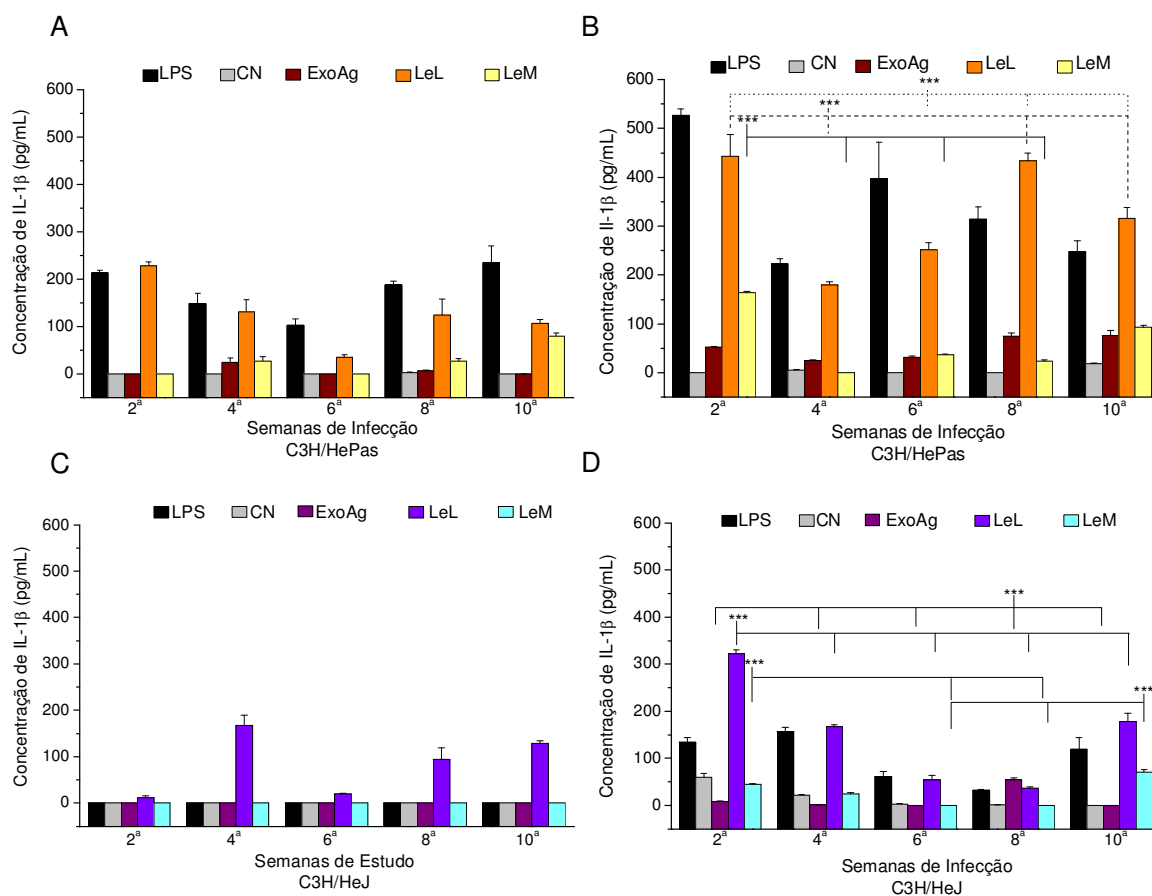


Figura 4 – Concentração de IL-1β liberado nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* e de camundongos e C3H/HeJ não infectados (C) ou infectados (D) com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas. Os macrófagos peritoneais dos camundongos infectados e não infectados foram cultivados em presença de exoantígeno (ExoAg), extratolipídico da fase leveduriforme (LeL) e miceliar (LeM), LPS e somente meio RPMI-1640C. As concentrações de IL-1β foram determinadas através de teste imunoenzimático (ELISA) e calculadas utilizando uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas de IL-1β. Os resultados foram expressos em pg/mL como média ± desvio padrão de 5 animais por semana de infecção. (***) $p < 0,001$

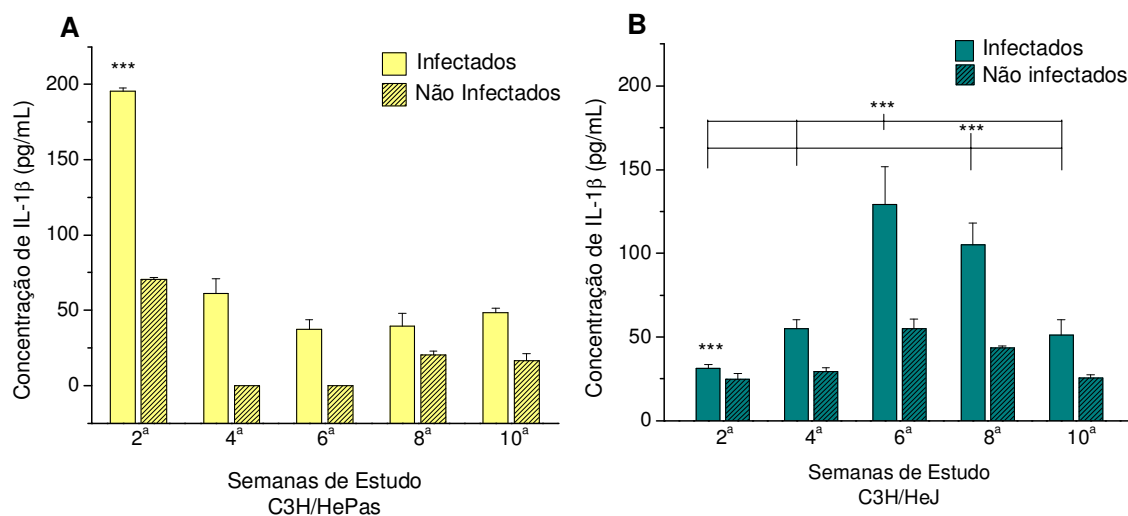


Figura 5 – Concentração de IL-1 β liberado nos soros de camundongos C3H/HePas (A) e C3H/HeJ (B) infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas. As concentrações de IL-1 β foram calculadas através de teste imunoenzimático (ELISA) utilizando uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas de IL-1 β . Os resultados foram expressos em pg/mL como média \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção. (***) $p < 0,001$

5.5. Determinação da Produção de TNF- α

A determinação da produção de TNF- α foi realizada nos sobrenadantes de culturas de macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ em diferentes períodos de infecção com o fungo *S. schenckii* e do grupo controle, em presença dos antígenos do fungo ExoAg, LeL e LeM, do LPS (como controle positivo) ou somente meio RPMI-1640-C (como controle negativo) e também nos soros desses mesmos animais infectados ou não (controle). Os resultados obtidos nas diferentes semanas de infecção foram calculados através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de TNF- α e estão representados nas Figuras 6 e 7 e Tabelas 6 e 7 (Apêndice), para sobrenadantes e os soros, respectivamente, como média \pm desvio padrão de cinco animais por semana estudada.

Quando as culturas de células dos animais infectados com o fungo *S. schenckii* foram tratadas com o LPS, observou-se um perfil semelhante de produção de TNF- α nas duas linhagens estudadas, C3H/HeJ e C3H/HePas, embora com níveis significativamente menores produzidos pelas células dos camundongos C3H/HeJ. Verificou-se elevada produção de TNF- α na segunda e quarta semanas de infecção e declínio até a décima semana ($p < 0,001$ entre a segunda e décimas semanas de infecção).

Utilizando-se os antígenos do fungo nas culturas celulares verificou-se que cada antígeno induziu uma resposta diferente de produção de TNF- α . Em resposta ao ExoAg as células dos camundongos C3H/HePas produziram apenas baixa concentração de TNF- α , sendo observado uma menor produção de TNF- α no período que vai da sexta até a décima semana de infecção, com diferenças estatisticamente significativas entre a segunda com a sexta e décima semanas de infecção ($p < 0,01$).

Em relação ao LeL, nos camundongos C3H/HePas verificou-se elevada produção de TNF- α na segunda semana de infecção, com o pico de maior produção ocorrendo na quarta semana (Figura 6B). Após este período observou-se níveis decrescentes até a décima semana de infecção ($p < 0,001$ entre a quarta e décimas semanas).

Já o LeM estimulou a produção de TNF- α em baixas concentrações e com poucas variações durante as dez semanas, porém foi observado uma menor produção deste mediador na oitava semana de infecção, sendo estatisticamente significativas as diferenças entre a oitava semana com a segunda ($p < 0,001$), sexta ($p < 0,05$) e décima semanas ($p < 0,001$).

As células dos camundongos C3H/HeJ responderam muito mais fracamente aos antígenos fúngicos do que os camundongos C3H/HePas. Não foi observada resposta de produção de TNF- α quando as células dos camundongos C3H/HeJ, infectados ou não (Figuras 6D e 6C, respectivamente), foram desafiadas com o ExoAg ou o LeM do fungo.

Quando as culturas celulares foram tratadas com o LeL, verificou-se a produção de TNF- α apenas na quarta e sexta semanas de infecção (Figura 6D).

Em relação à presença desta citocina no soro dos animais (Figura 7), só aconteceu de maneira detectável nos camundongos C3H/HePas, sendo as maiores concentrações observadas na quarta ($p < 0,001$ quando comparado com a segunda semana), oitava e décima semanas de infecção ($p < 0,001$ quando comparada com a sexta semana de infecção).

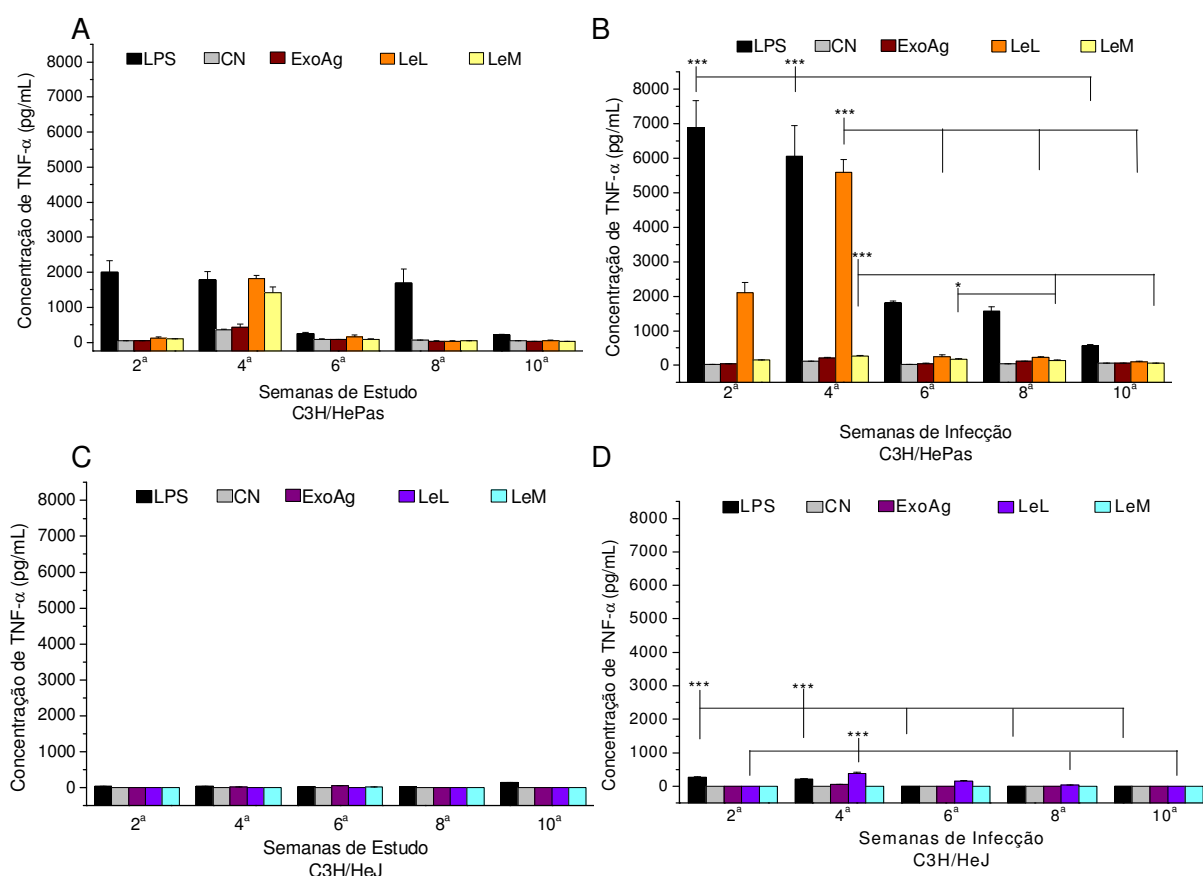


Figura 6 – Concentração de TNF- α liberado nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* e de camundongos C3H/HeJ não infectados (C) ou infectados (D) com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas. Os macrófagos peritoneais dos camundongos infectados e não infectados foram cultivados em presença de exoantígeno (ExoAg), extratolipídico da fase leveduriforme (LeL) e miceliar (LeM), LPS e somente meio RPMI-1640C. As concentrações de TNF- α foram calculadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de TNF- α . Os resultados foram expressos em pg/mL como média \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção. (***) $p < 0,001$

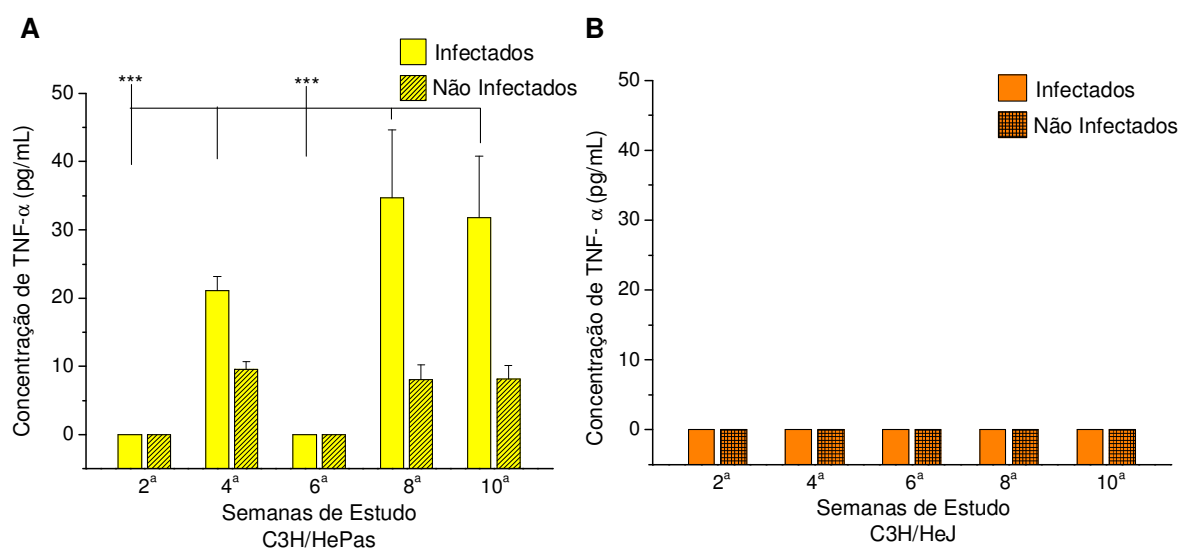


Figura 7 – Concentração de TNF- α liberado nos soros de camundongos C3H/HePas (A) e C3H/HeJ (B) infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas. As concentrações de TNF- α foram calculadas através de teste imunoenzimático (ELISA) utilizando uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas de TNF- α . Os resultados foram expressos em pg/mL, como média \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção. (***) $p < 0,001$

5.6. Determinação da Produção de IL-12

A determinação da produção de IL-12 foi realizada nos sobrenadantes de culturas de macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ, em diferentes períodos de infecção com o fungo *S. schenckii* e do grupo controle, em presença dos antígenos do fungo ExoAg, LeL e LeM, do LPS (como controle positivo) ou somente meio RPMI-1640-C (como controle negativo) e também nos soros desses mesmos animais infectados ou não (controle). Os resultados obtidos nas diferentes semanas de infecção foram calculados através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IL-12 e estão representados nas Figuras 8 e 9 e Tabelas 8 e 9 (Apêndice), para os sobrenadantes e soros, respectivamente, como média \pm desvio padrão de cinco animais por semana estudada.

Observou-se um perfil diferente de produção de IL-12 pelas duas linhagens de camundongos utilizadas no estudo. As maiores concentrações de IL-12 foram observadas nos sobrenadantes das culturas dos macrófagos peritoneais dos camundongos C3H/HeJ.

Em relação aos camundongos C3H/HePas, observamos que a produção de IL-12 pelas células estimuladas com o LPS ocorreu em maiores concentrações na segunda semana e de forma decrescente até a décima semana ($p < 0,001$ entre a segunda e décima semanas). O mesmo resultado foi observado em resposta ao LeL e LeM (Figura 8B), com as maiores concentrações sendo observadas na segunda semana de infecção, e níveis indetectáveis na sexta, oitava e décima semanas de infecção. Em resposta ao ExoAg a produção de IL-12 só foi detectada na décima semana de infecção neste grupo de animais.

Níveis muito maiores de produção de IL-12 foram observados entre a segunda e quarta semanas de infecção nos camundongos C3H/HeJ (Figura 8D) frente aos antígenos do fungo. Após este período observou-se um declínio significativo na produção desta citocina entre a sexta e oitava semanas (sendo $p < 0,001$ quando se compara a produção de IL-12 observada da quarta semana com a sexta e oitava semanas) e um leve aumento ocorrendo novamente na décima semana de infecção, com $p < 0,001$ quando se compara a produção observada na décima semana com a oitava semana, estimuladas com o ExoAg ou LeM.

Quando as culturas celulares foram tratadas com o antígeno lipídico LeL observou-se maiores concentrações desta citocina na segunda semana de infecção, com declínio progressivo até a sexta semana ($p < 0,001$ entre a segunda e oitava semanas), e voltando a aumentar na oitava semana ($p < 0,001$ entre a décima e a oitava semanas).

Quando se avaliou a liberação de IL-12 nos soros dos animais infectados e não infectados, não foram encontrados níveis desta citocina ($p > 0,05$).

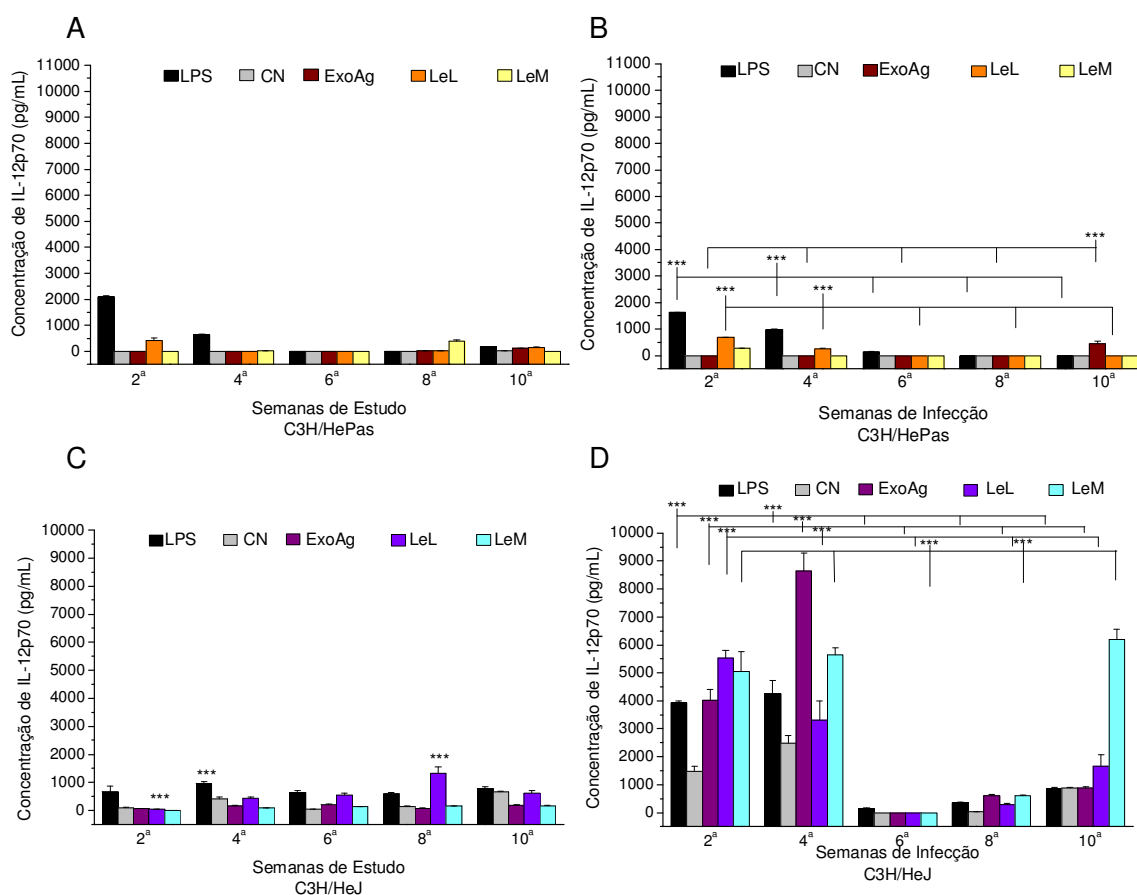


Figura 8 – Concentração de IL-12 liberada nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* e de camundongos e C3H/HeJ não infectados (C) ou infectados (D) com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas. Os macrófagos peritoneais dos camundongos infectados e não infectados foram cultivadas em presença de exoantígeno (ExoAg), extrato lipídico da fase leveduriforme (LeL) e miceliar (LeM), LPS e somente meio RPMI-1640C. As concentrações de IL-12 foram calculadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IL-12. Os resultados foram expressos em pg/mL, como média \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção. (***) $p < 0,001$

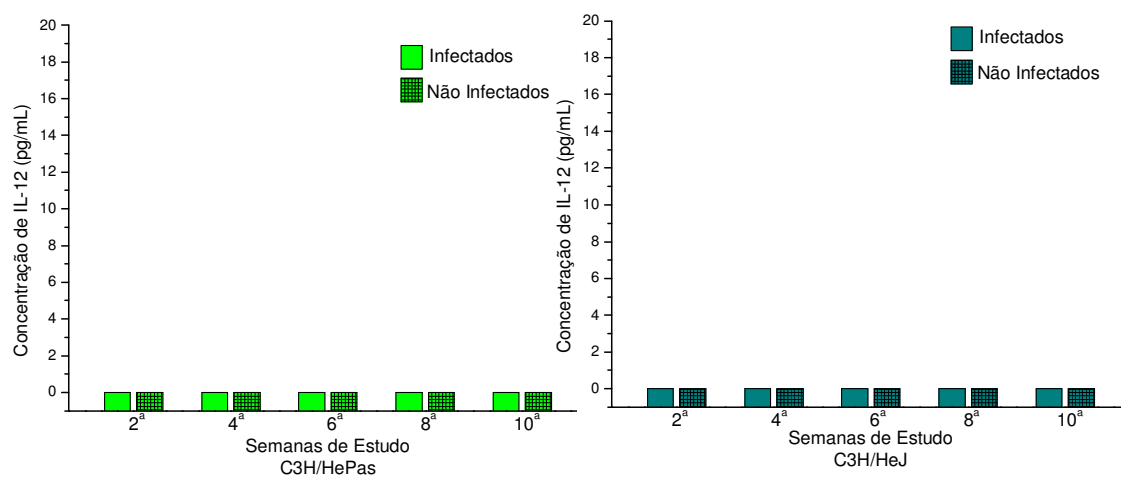


Figura 9 – Concentração de IL-12 liberado nos soros de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas. As concentrações de IL-12 foram calculadas através de teste imunoenzimático (ELISA) utilizando uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas de IL-12. Os resultados foram expressos em pg/mL, como média \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção.

5.7. Determinação da Produção de IL-10

A determinação da produção de IL-10 foi realizada nos sobrenadantes de culturas de macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ em diferentes períodos de infecção com o fungo *S. schenckii* e do grupo controle, em presença dos antígenos do fungo ExoAg, LeL e LeM, do LPS (como controle positivo) ou somente meio RPMI-1640-C (como controle negativo) e também nos soros desses mesmos animais infectados ou não (controle). Os resultados obtidos nas diferentes semanas de infecção foram calculados através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IL-10 e estão representados nas Figuras 10 e 11 e Tabelas 10 e 11 (Apêndice) para os sobrenadantes e soros, respectivamente, como média \pm desvio padrão de cinco animais por semana estudada.

Entre os camundongos C3H/HePas observamos que em presença do ExoAg houve produção de IL-10 somente na sexta e décima semanas de infecção. Quando tratadas com o LeL observou-se níveis maiores de produção desta citocina, com pequena redução na sexta semana e redução bastante significativa na oitava semana ($p < 0,001$ quando comparado com a segunda e quarta semanas e $p < 0,05$ quando comparado com a sexta semana) e os maiores níveis observados na décima semana. Já quando o LeM foi usado como estímulo, observou-se a produção de IL-10 somente na décima semana de infecção ($p < 0,01$ em relação às demais semanas).

Em relação aos camundongos C3H/HeJ não foi observada a produção desta citocina nos sobrenadantes de culturas dos macrófagos peritoneais dos camundongos infectados ou não infectados frente a qualquer dos estímulos testados.

Em relação à presença desta citocina nos soros destes animais, observamos a presença de pequena concentração de IL-10 nos soros dos animais C3H/HePas não infectados nos períodos correspondentes a quarta até a décima semanas do estudo. Entre os camundongos C3H/HePas infectados observamos picos de concentração desta citocina na sexta e décima semanas de infecção (com $p < 0,001$ quando comparado com a segunda, quarta e oitava semanas, e também com diferença estatisticamente significativa entre a sexta e oitava semana). Já entre os camundongos, não foram encontrados níveis detectáveis de IL-10 nos soros dos camundongos infectados ou não.

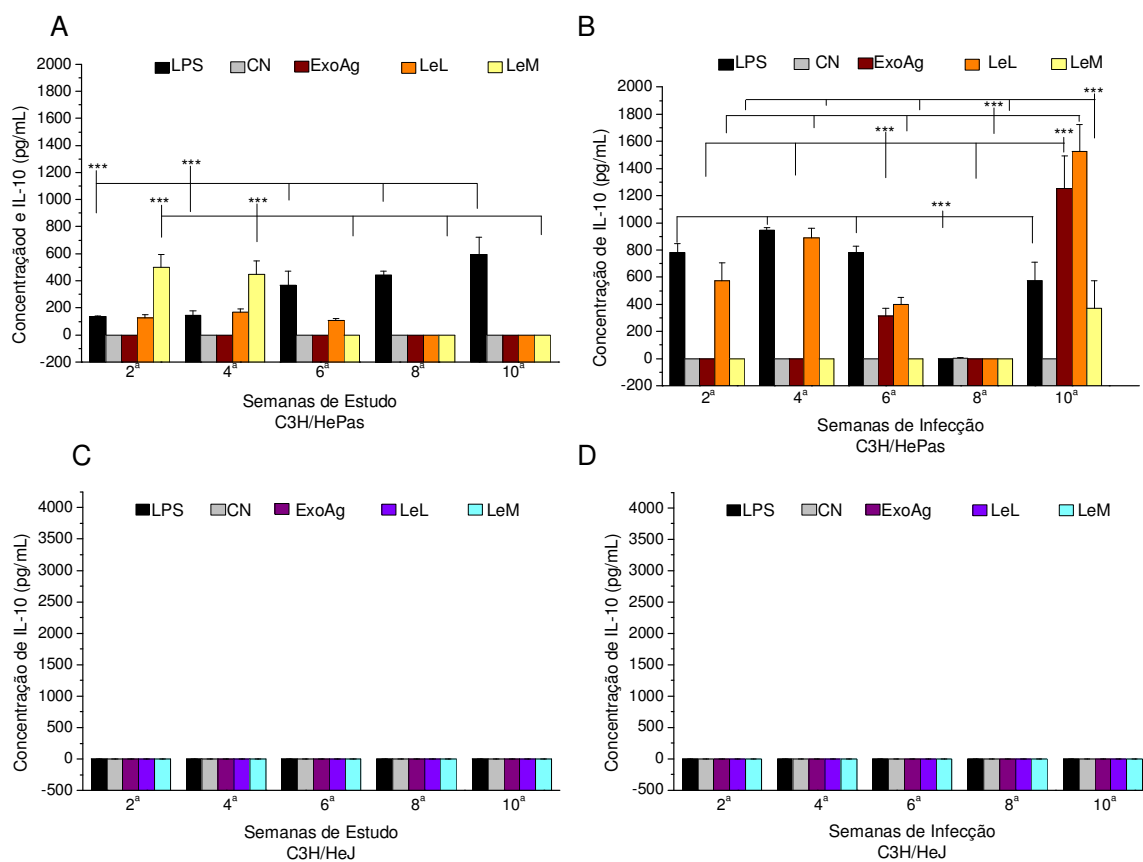


Figura 10 – Concentração de IL- 10 liberada nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* e C3H/HeJ não infectados (C) ou infectados (D) com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas. Os macrófagos peritoneais dos camundongos infectados e não infectados foram cultivadas em presença de exoantígeno (ExoAg), extratolipídico da fase leveduriforme (LeL) e miceliar (LeM), LPS e somente meio RPMI-1640C. As concentrações de IL-10 foram calculadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IL-10. Os resultados foram expressos em pg/mL, como média \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção. (***) $p < 0,001$

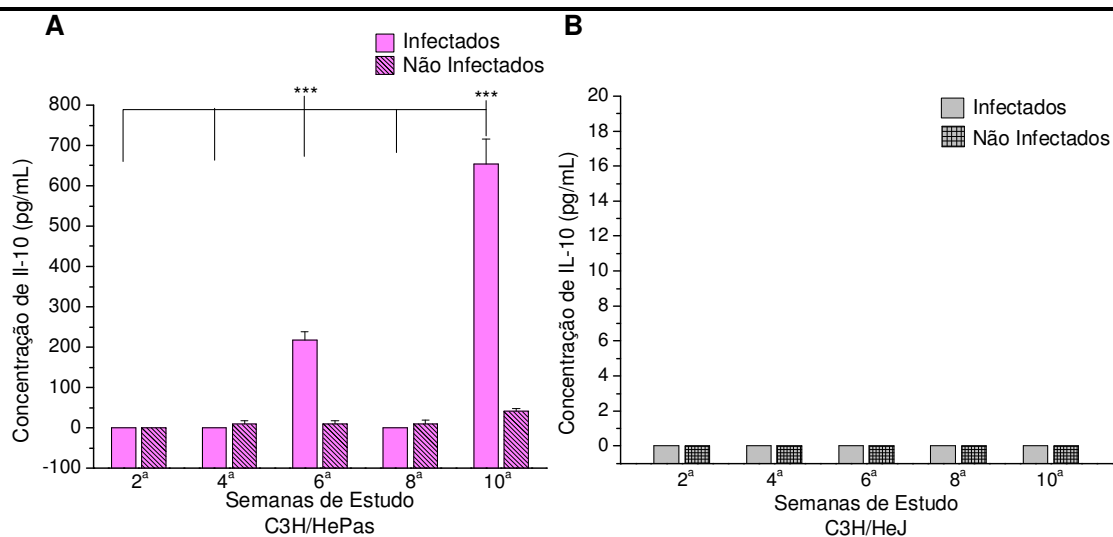


Figura 11 – Concentração de IL-10 liberado nos soros de camundongos C3H/HePas (A) e C3H/HeJ (B) infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas. As concentrações de IL-10 foram calculadas através de teste imunoenzimático (ELISA) utilizando uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas de IL-10. Os resultados foram expressos em pg/mL, como média \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção. (***) $p < 0,001$

5.8. Determinação da Produção de TGF- β

A determinação da produção de TGF- β foi realizada nos sobrenadantes de culturas de macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ em diferentes períodos de infecção com o fungo *S. schenckii* e do grupo controle, em presença dos antígenos do fungo ExoAg, LeL e LeM, do LPS (como controle positivo) ou somente meio RPMI-1640-C (como controle negativo) e também nos soros desses mesmos animais infectados ou não (controle). Os resultados obtidos nas diferentes semanas de infecção foram calculados através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de TGF- β e estão representados nas Figuras 12 e 13 e Tabelas 12 e 13 (Apêndice), para os sobrenadantes e soros, respectivamente, como média \pm desvio padrão de cinco animais por semana estudada.

Ao contrário do que observamos para a maioria dos outros mediadores, as células dos animais C3H/HeJ infectados, produziram maiores quantidades de TGF- β do que as células dos animais C3H/HePas nas mesmas condições. Não foram observados níveis detectáveis de TGF- β nos sobrenadantes de culturas de macrófagos peritoneais dos camundongos C3H/HePas frente a qualquer dos estímulos utilizados nos ensaios (Figura 12A e 12B).

Já entre os animais C3H/HeJ infectados (Figura 12D) observamos elevada produção de TGF- β pelos macrófagos peritoneais estimulados com o ExoAg na segunda e quarta semana, com menor produção na sexta semana e voltando a aumentar na oitava e décima semanas.

Quando as células dos animais C3H/HeJ infectados foram cultivadas na presença do LeL observamos as menores concentrações de TGF- β no período que vai da quarta a sexta semana de infecção, sendo estes níveis bem maiores do que aquele estimulado pelo ExoAg.

O LeM estimulou a produção de altas concentrações de TGF- β pelas células dos camundongos C3H/HeJ a partir da segunda semana, sendo as menores concentrações observadas entre a quarta e sexta semanas, e valores novamente altos na oitava e décima semanas de infecção.

Ao contrário do que foi observado nos sobrenadantes das culturas de macrófagos, a detecção de TGF- β no soro dos camundongos ocorreu de forma significativamente maior nos camundongos C3H/HePas (Figura 13).

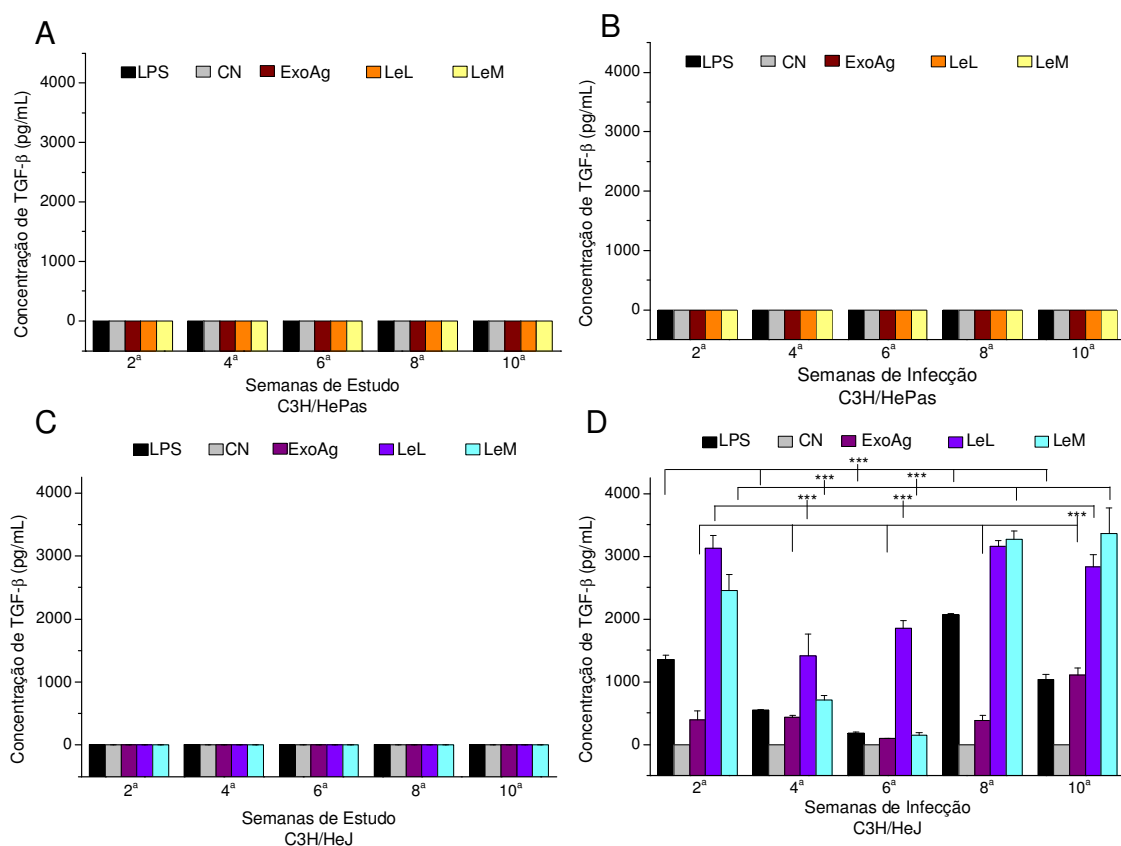


Figura 12 – Concentração de TGF-β liberada nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* e C3H/HeJ não infectados (C) ou infectados (D) com o fungo *S. schenckii* dez semanas. Os macrófagos peritoneais dos camundongos infectados e não infectados foram cultivadas em presença de exoantígeno (ExoAg), extratolipídico da fase leveduriforme (LeL) e miceliar (LeM), LPS e somente meio RPMI-1640C. As concentrações de TGF-β foram calculadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de TGF-β. Os resultados foram expressos em pg/mL, como média ± desvio padrão de 5 animais por semana de infecção. (***) $p < 0,001$

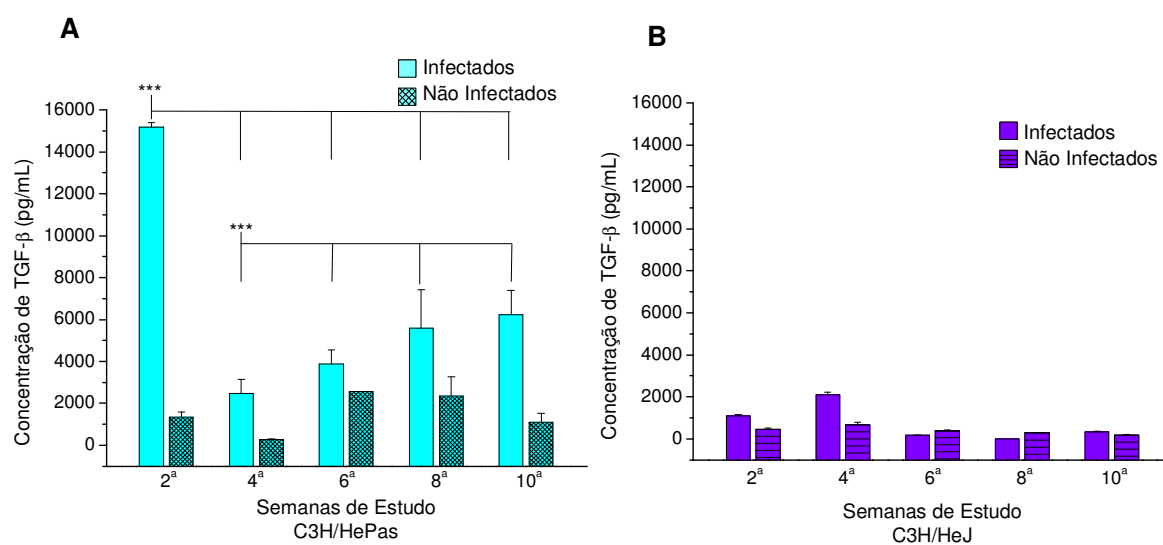


Figura 13 – Concentração de TGF- β liberado nos soros de camundongos C3H/HePas (A) e C3H/HeJ (B) infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas. As concentrações de TGF- β foram calculadas através de teste imunoenzimático (ELISA) utilizando uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas de TGF- β . Os resultados foram expressos em pg/mL, como média \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção. (*) $p < 0,001$)**

5.9. Determinação intracelular das citocinas IL-1, TNF- α , IL-12, IL-10 e TGF- β

A determinação intracelular das citocinas IL-1, TNF- α , IL-12, IL-10 e TGF- β foi realizada em macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ em diferentes períodos de infecção com o fungo *S. schenckii* e do grupo controle. Os resultados estão representados na Figura 14 como mediana de intensidade de fluorescência (MIF) da citocina obtida de macrófagos peritoneais estimulados *in vitro* ou não com PMA e ionomicina.

Na determinação intracelular das citocinas observou-se que a produção das citocinas ocorreu em níveis significativamente maiores nos camundongos C3H/HePas do que nos camundongos C3H/HeJ.

A concentração intracelular de IL-1 (Figura 14A e Tabela 14 – Apêndice) foi observada em níveis muito maiores nos camundongos C3H/HePas do que nos C3H/HeJ. Entre os camundongos C3H/HePas não infectados observou-se uma redução nos níveis de IL-1 apenas na décima semana do estudo. Já entre os camundongos C3H/HePas infectados a concentração intracelular de IL-1 variou entre as semanas de infecção, com baixos níveis durante a segunda e quarta semanas, com a maior concentração sendo observada na sexta semana ($p < 0,001$ quando se compara a sexta às demais semanas) e as menores concentrações na oitava e décima semanas. Entre os camundongos C3H/HeJ, a produção de IL-1 intracelular ocorreu em concentrações muito menores que aquelas observadas nos C3H/HePas e num perfil um pouco diferente. Nos animais C3H/HeJ não infectados a produção de IL-1 ocorreu em menores concentrações na segunda semana do estudo ($p < 0,001$ quando se comparou com as outras semanas de infecção), aumentou na quarta e manteve níveis semelhantes até a décima semana. Entre os C3H/HeJ infectados, verificou-se maiores níveis de IL-1 na quarta e oitava semanas de infecção, sendo os menores níveis encontrados na segunda semana ($p < 0,001$).

Os resultados da determinação intracelular da citocina TNF- α estão representados na Figura 14B (Tabela 15 – Apêndice) demonstrando que a produção intracelular de TNF- α também aconteceu de forma muito mais significativa nas células dos camundongos C3H/HePas do que nas células dos camundongos C3H/HeJ. Entre os camundongos C3H/HePas infectados a produção de TNF- α ocorreu em baixas concentrações durante todo o período de infecção, exceto na sexta semana ($p < 0,001$), quando observou-se uma produção extremamente elevada desta citocina, principalmente nas células não estimuladas com PMA e ionomicina. Já nos camundongos C3H/HeJ infectados a produção de TNF- α foi observada em concentrações muito menores do que nos camundongos C3H/HePas e num perfil diferente. Houve maior produção desta citocina na segunda e quarta semanas, e os menores níveis foram observados na sexta semana de infecção ($p < 0,001$).

As quantidades detectadas da IL-12 também foram muito maiores nos camundongos C3H/HePas do que nos C3H/HeJ (Figura 14C e Tabela 16 – Apêndice), embora neste caso num perfil muito parecido entre os grupos. No grupo controle dos camundongos C3H/HePas a produção de IL-12 só foi detectável na oitava e décimas semanas e em baixas concentrações. Entre os camundongos C3H/HePas infectados a produção de IL-12 foi alta desde a segunda semana, com níveis crescentes até a sexta semana, quando se observou a maior produção desta citocina. Houve um declínio significativo na oitava e décima semanas de infecção ($p < 0,001$ em relação à segunda, quarta e sexta semanas). Entre os camundongos C3H/HeJ não infectados a produção de IL-12 também foi baixa durante as dez semanas do estudo. Já entre os camundongos C3H/HeJ infectados a produção desta citocina foi baixa durante todo o período estudado, exceto na sexta semana quando também foi observado o pico de produção desta citocina ($p < 0,01$), embora ainda em concentrações muito menores do que nos C3H/HePas no mesmo período.

A produção intracelular de IL-10 (Figura 14D e Tabela 17 – Apêndice) nos camundongos C3H/HePas não infectados só foi detectável na oitava e décima semanas do estudo, sem muita variação nestas duas semanas. Entre os camundongos C3H/HePas infectados a produção de IL-10 foi baixa durante a maior parte da infecção. O pico de produção intracelular desta citocina ocorreu na quarta semana de infecção, com níveis significativamente maiores que as demais semanas ($p < 0,001$). Já entre os camundongos C3H/HeJ a produção intracelular de IL-10 foi detectada em níveis muito mais baixos que nos camundongos C3H/HePas. Observou-se que no grupo controle dos camundongos C3H/HeJ a produção de IL-10 foi detectável durante todo o período estudado, demonstrando os menores níveis na segunda semana de infecção ($p < 0,001$ em relação às demais semanas). Nos camundongos C3H/HeJ infectados a produção de IL-10 foi maior na quarta e décima semanas de infecção, em níveis significativamente maiores que as demais semanas ($p < 0,001$) e em menores concentrações do que nos animais C3H/HePas.

Em relação à produção intracelular de TGF- β (Figura 14E e Tabela 18 – Apêndice) pelas células dos camundongos C3H/HePas não infectados, só ocorreu de forma detectável na oitava e décima semanas do estudo, ainda assim em níveis muito baixos. Ao contrário, nos camundongos C3H/HePas infectados os maiores níveis de TGF- β foram observados na segunda e principalmente na quarta semanas de infecção, com níveis significativamente menores nas semanas seis até a dez ($p < 0,001$). Entre os camundongos C3H/HeJ não infectados a produção de TGF- β foi detectável desde a quarta semana do estudo, embora também em níveis muito baixos. No grupo de camundongos C3H/HeJ infectados a produção de TGF- β foi muito menor do que aquela observada nos camundongos C3H/HePas, sendo que a produção ocorreu principalmente na quarta e oitava semanas de infecção, sendo $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente, quando se compara as demais semanas de infecção.

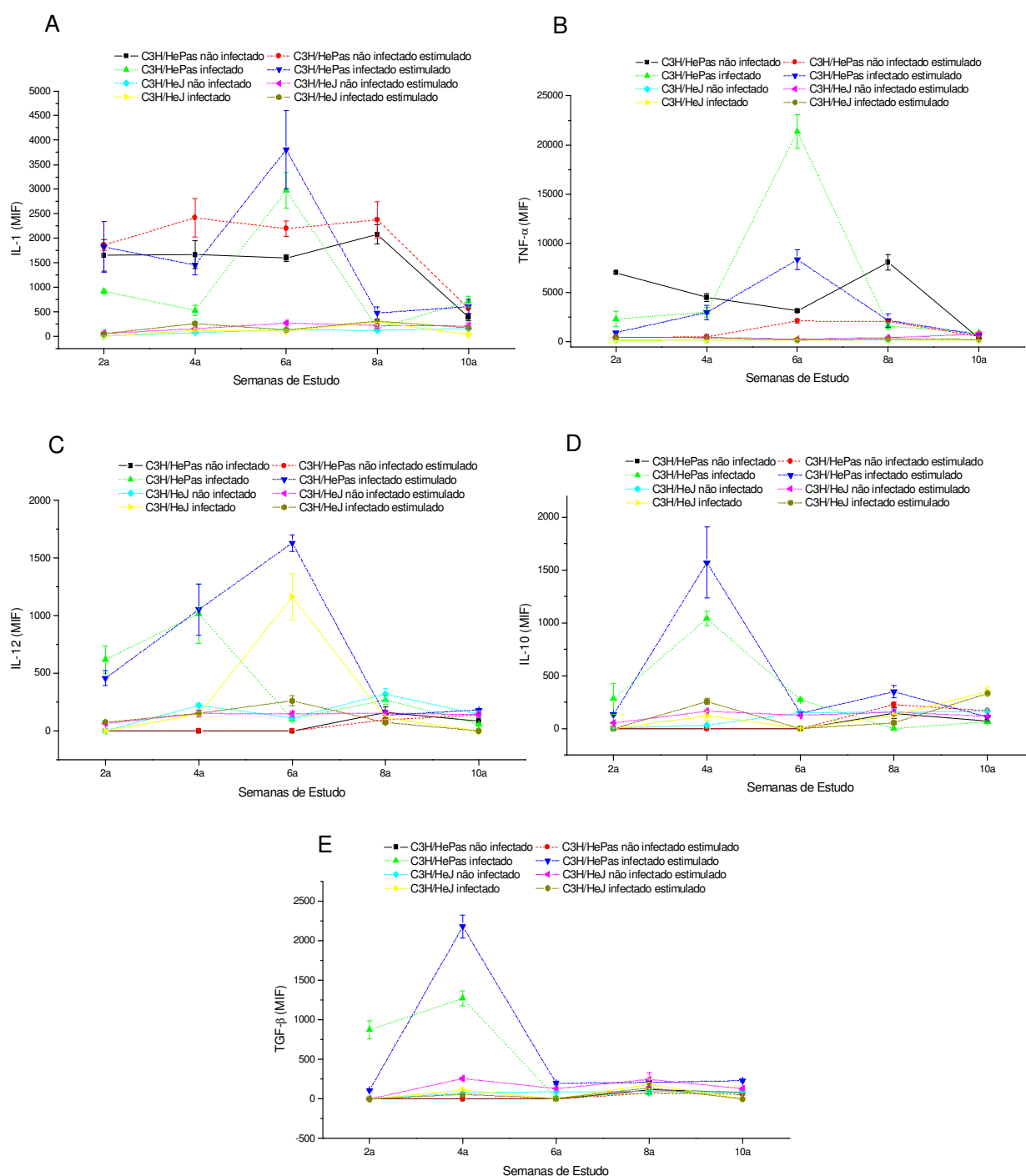


Figura 14 – Produção de citocinas intracelulares pelos macrófagos peritoneais de camundongos deficientes (C3H/HeJ) ou não (C3H/HePas) no TLR4 infectados e não com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas. As citocinas IL-1, TNF- α , IL-12, IL-10 e TGF- β foram detectadas e quantificadas intracelularmente através da metodologia da citometria de fluxo. Os resultados apresentados referem-se aos valores médios das medianas de intensidade de fluorescência (MIF) \pm desvio padrão obtidos de macrófagos estimulados ou não com PMA e ionomicina (n = 5 animais por semana).

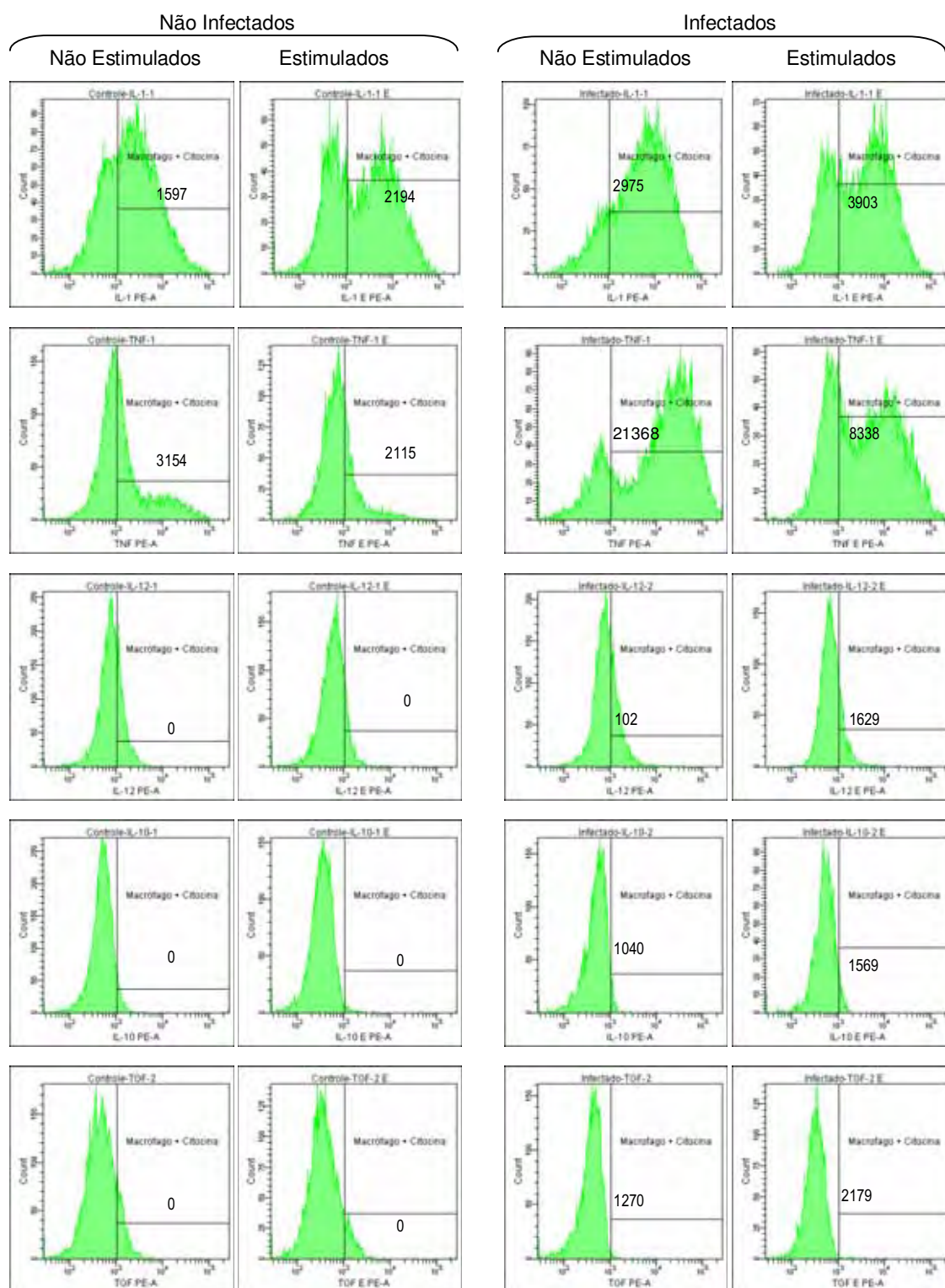


Figura 15 - Histogramas representativos da produção de citocinas IL-1, TNF- α , IL-12, IL-10 e TGF- β pelos macrófagos peritoneais de camundongos TLR4 normais (C3H/HePas) infectados ou não durante dez semanas de infecção com o fungo *S. schenckii*. Os valores apresentados nos quadrantes dos histogramas correspondem aos valores médios das medianas das intensidades de fluorescência de cinco animais por dia.

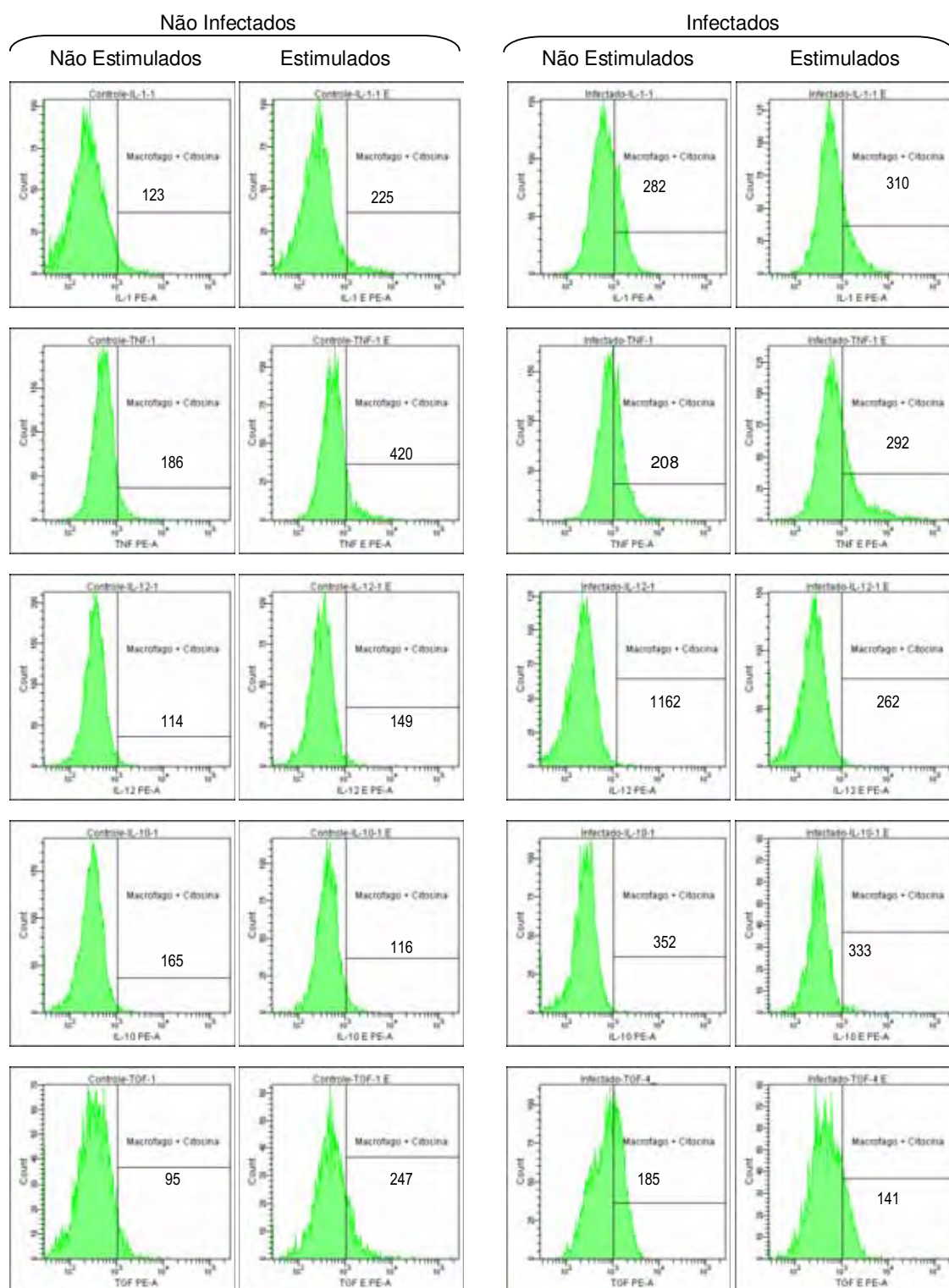


Figura 16 - Histogramas representativos da produção de citocinas IL-1, TNF- α , IL-12, IL-10 e TGF- β pelos macrófagos peritoneais de camundongos deficientes no TLR4 (C3H/HeJ) infectados ou não durante dez semanas de infecção com o fungo *S. schenckii*. Os valores apresentados nos quadrantes dos histogramas correspondem aos valores médios das medianas das intensidades de fluorescência de cinco animais por dia.

5.10. Avaliação da ativação do fator nuclear (NF- κ B)

A ativação do NF- κ B foi avaliada nos extratos nucleares obtidos das células do exsudato peritoneal de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados ou não com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas. Os resultados obtidos nas diferentes semanas de infecção foram calculados através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de NF- κ B e estão representados nas Figuras 17 e Tabela 19 (Apêndice), como média \pm desvio padrão de cinco animais por semana estudada.

Na determinação do NF- κ B nuclear observou-se que entre as duas linhagens de camundongos estudadas, as células dos camundongos C3H/HePas apresentaram níveis bem maiores da proteína no núcleo das células que os camundongos C3H/HeJ. Entretanto foi observado um perfil semelhante nas concentrações de NF- κ B no núcleo das células das duas linhagens de camundongos, com as maiores concentrações observadas na segunda semana de infecção e depois outro pico na sexta semana.

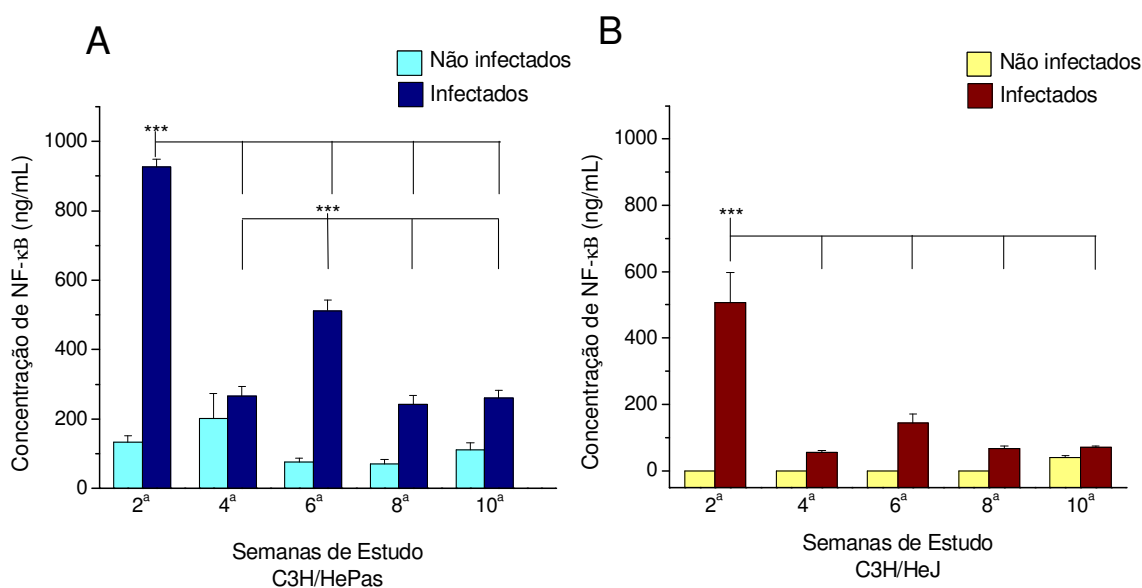


Figura 17 – Determinação de NF- κ B nos extratos nucleares de macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas (A) e C3H/HeJ (B) infectados ou não com o fungo *S. schenckii* durante 10 semanas. Os extratos nucleares foram obtidos e a dosagem de NF- κ B foi determinada através de ensaio imunoenzimático - ELISA. As concentrações de NF- κ B foram calculadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de NF- κ B. Os resultados foram expressos em pg/mL, como média \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção ($p < 0,001$).

5.11. Determinação da expressão de CD14 e MD-2

A expressão das proteínas de CD14 e MD-2 foi quantificada na superfície das células do exsudato peritoneal de camundongos C3H/HePas e C3H/H3J infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii*. Os resultados estão representados na Figura 18 e Tabela 20 (Apêndice) como média \pm desvio padrão dos percentuais de expressão de cada proteína.

A expressão de CD14 nas células dos camundongos C3H/HePas foi identificada principalmente nas três primeiras semanas do estudo, tanto do grupo controle (Figura 18A) quando do grupo dos animais infectados (Figura 18B). Porém houve uma maior expressão nas células dos animais infectados na segunda e sexta semanas da infecção, sendo $p < 0,001$ quando comparado com a quarta, oitava e décima semanas.

Nos camundongos C3H/HeJ a expressão de CD14 também ocorreu de forma mais significativa nas células dos animais infectados (Figura 18D) do que nos animais não infectados (Figura 18C). Entre os animais infectados a maior presença desta proteína na superfície das células ocorreu também nas semanas iniciais do estudo, entre a segunda e quarta semanas da infecção.

Em relação à expressão da proteína MD-2, houve pouca diferença na expressão desta proteína nas células dos animais C3H/HePas e C3H/HeJ, tanto no grupo infectado quanto no grupo controle.

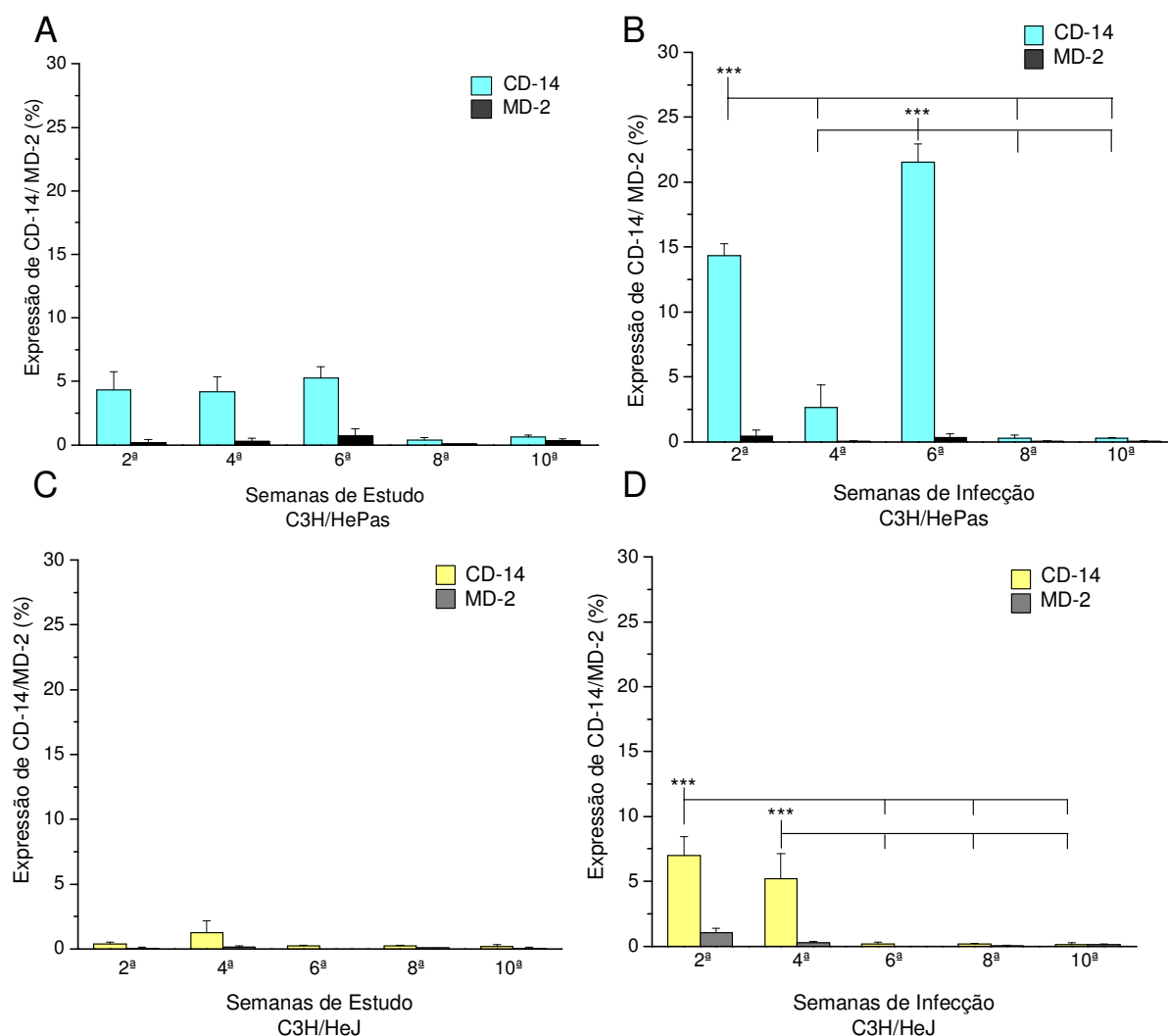


Figura 18 – Determinação da expressão de CD14 e MD2 na superfície das células do exsudato peritoneal de camundongos C3H/HePas não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* e camundongos C3H/HeJ não infectados (C) e infectados (D) com o fungo *S. schenckii* durante dez semanas. A expressão de CD14 e MD2 foi quantificada utilizando a técnica de citometria de fluxo e os resultados expressos em percentual como média \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção. (*) $p < 0,001$**

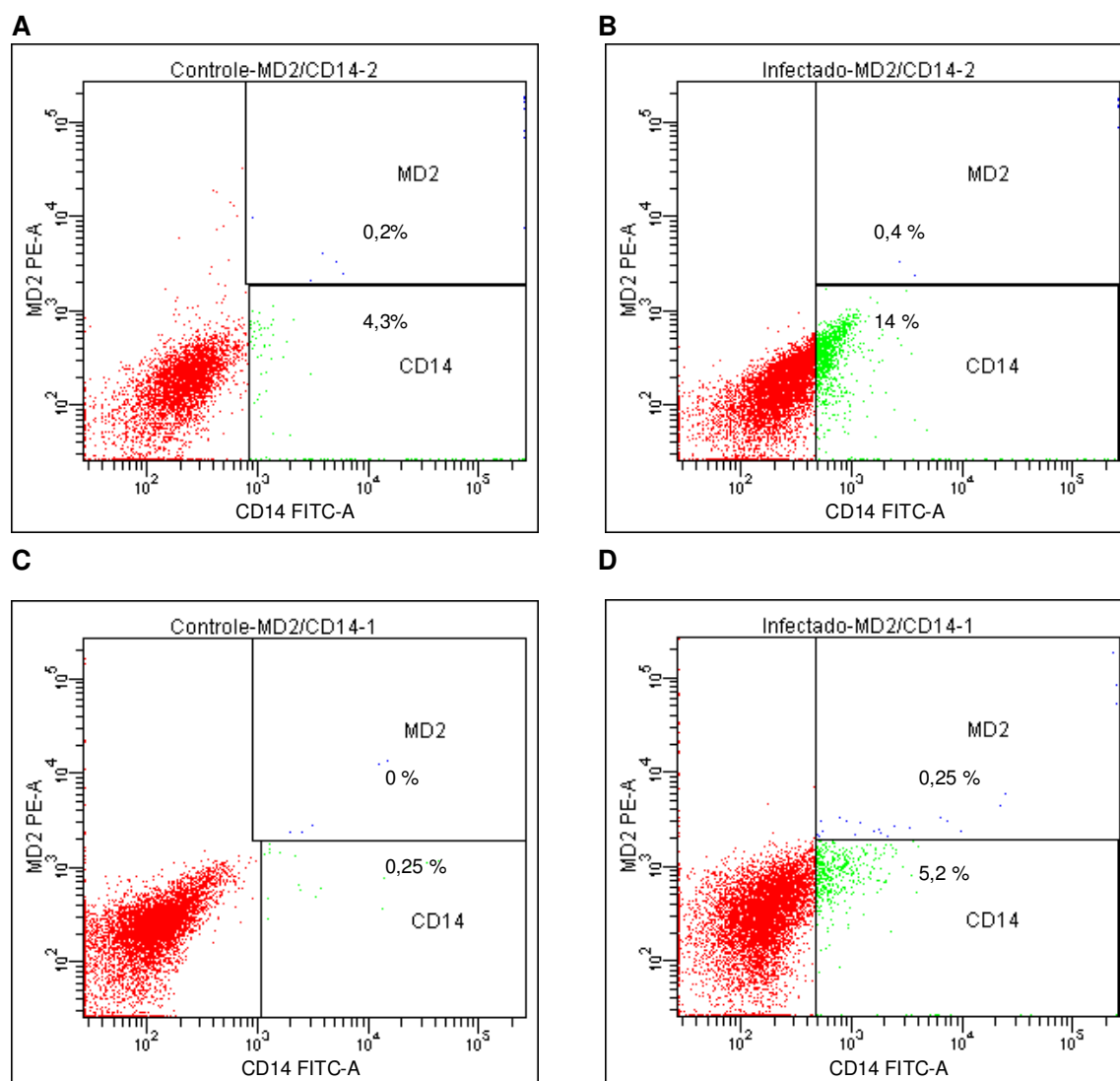


Figura 19 – Gráficos “dot plots” representativos da expressão de CD14 e MD-2 nas células do exsudato peritoneal de camundongos deficientes (C3H/HeJ – C e D) ou não (C3H/HePas – A e B) no TLR4 infectados ou não com o fungo *S. schenckii*. Os valores apresentados nos quadrantes dos gráficos correspondem aos valores médios das medianas das intensidades de fluorescência de cinco animais por dia.

5.12. Determinação da apoptose das células do exsudato peritoneal

A presença de apoptose nas células do exsudato peritoneal de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ, infectados e não infectados com o fungo *S. schenckii* foi avaliada empregando-se a técnica de citometria de fluxo, através da ligação de anexina V às células em apoptose e empregando-se iodeto de propídeo (PI), um corante vital, para caracterizar as células que estão em eventos mais tardios de apoptose ou mesmo em necrose. Os resultados estão representados na Figura 20 e Tabela 21 (Apêndice) e foram expressos como média \pm desvio padrão do percentual de células em apoptose ou necrose.

Entre os camundongos C3H/HePas não infectados (Figura 20A) observou-se baixos níveis de apoptose/necrose durante as dez semanas do estudo, sendo que na sexta e oitava semanas houve uma redução no percentual das células em apoptose. Já entre os camundongos C3H/HePas (Figura 20B) infectados observou-se que no início do estudo predominam as células em apoptose (marcadas somente com anexina); os percentuais de necrose neste grupo de animais não variou significativamente entre as dez semanas de infecção.

Observou-se que tanto nas células dos camundongos C3H/HeJ do grupo controle (Figura 20C) quanto do grupo infectado (Figura 20D), houve um percentual muito menor de apoptose do que aquele observando entre os camundongos C3H/HePas. No entanto, os percentuais de necrose (células duplamente marcadas, com Anexina V e PI) verificados entre os camundongos C3H/HeJ não infectados foram maiores do que aqueles observados entre os camundongos C3H/HePas, embora com valores não estatisticamente significativos.

Entre os animais C3H/HeJ (Figura 20D) infectados observou-se também maior percentual de necrose em relação à apoptose durante as dez semanas de infecção. O percentual de necrose ocorreu de forma crescente até a décima semana de infecção, chegando a valores estatisticamente significativos em relação àqueles observados nas semanas iniciais do estudo.

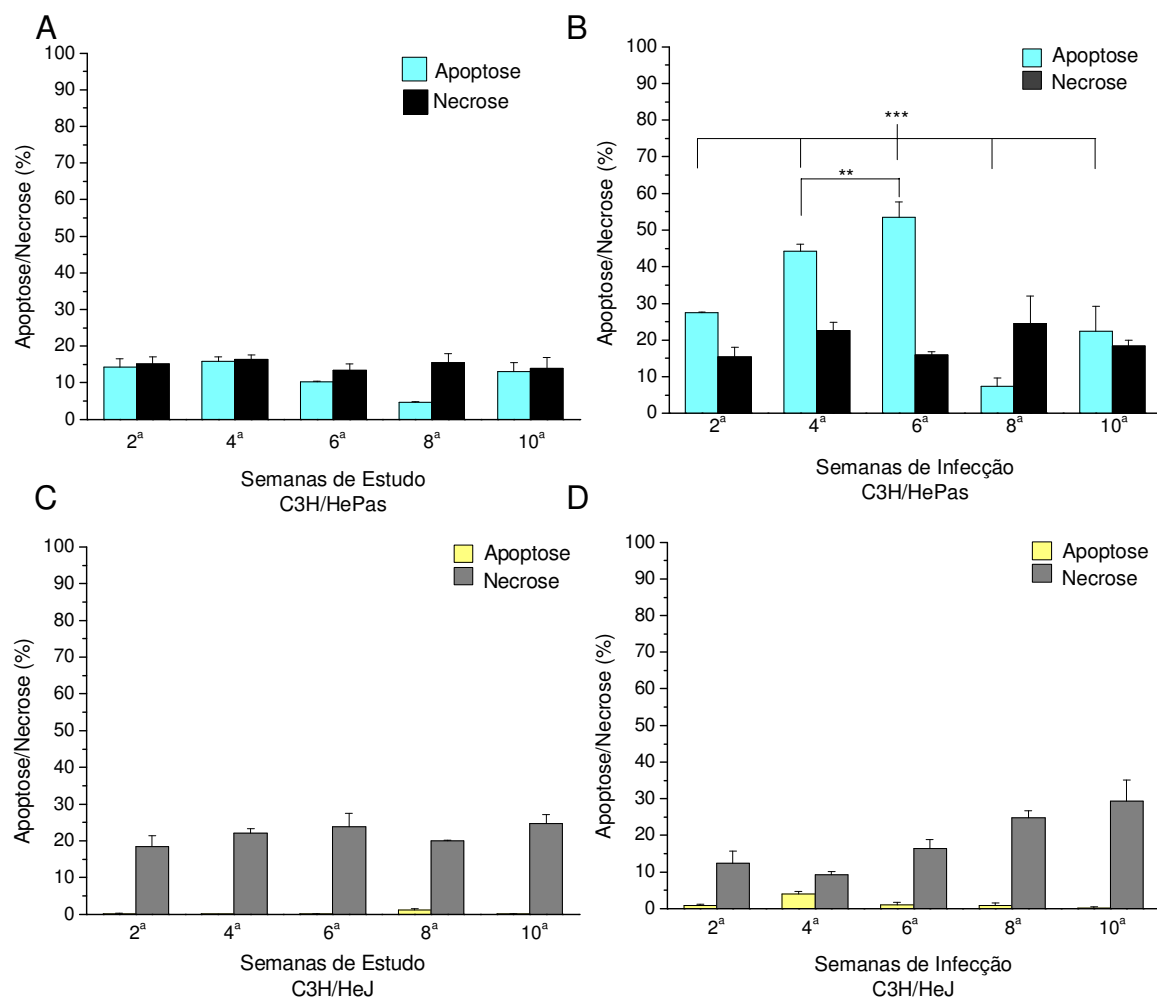


Figura 20 – Determinação de apoptose nas células do exsudato peritoneal de camundongos C3H/HePas não infectados (A) e infectados (B) com o fungo *S. schenckii* e camundongos C3H/HeJ não infectados (C) e infectados (D) com o fungo *S. schenckii* durante 10 semanas. A apoptose foi quantificada utilizando a técnica de citometria de fluxo através da determinação de Anexina V e iodeto de propídio (PI). Os resultados estão expressos em percentual de células em apoptose como média \pm desvio padrão de 5 animais por semana de infecção ($p < 0,001$).**

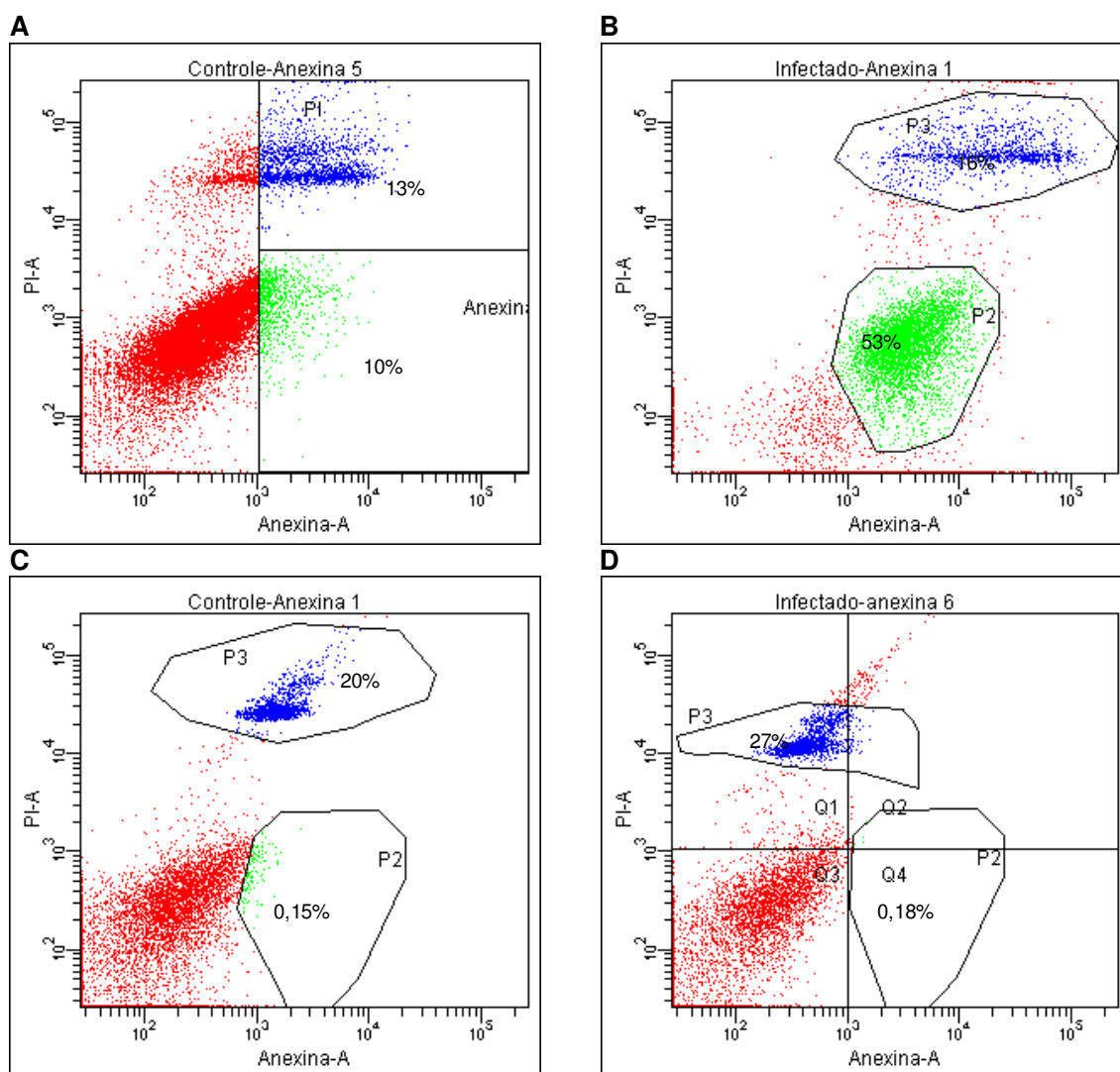


Figura 21 – Gráficos “dot plots” representativos da detecção de apoptose/necrose nas células do exsudato peritoneal de camundongos deficientes (C3H/HeJ – C e D) ou não (C3H/HePas – A e B) no TLR4 infectados ou não com o fungo *S. schenckii*. Os valores apresentados nos quadrantes dos gráficos correspondem aos valores médios das medianas das intensidades de fluorescência de cinco animais por dia.

Quadro 1 - Representação dos resultados observados na esporotricose experimental em camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados frente ao ExoAg.

Teste	Semanas de Infecção									
	C3H/HePas					C3H/HeJ				
	2 ^a	4 ^a	6 ^a	8 ^a	10 ^a	2 ^a	4 ^a	6 ^a	8 ^a	10 ^a
MTT	↑	↑	↑	↓	↓	↑	↑	↑	↑	↑
H ₂ O ₂	↑	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↓	↓	↓
NO	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
IL-1β	↑	↓	↓	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↓
TNF-α	↓	↑	↓	↑	↓	↓	↑	↓	↓	↓
IL-12	↓	↓	↓	↑	↓	↑	↑	↓	↓	↑
IL-10	↓	↓	↑	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓
TGF-β	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↓	↑	↑

Quadro 2 - Representação dos resultados observados na esporotricose experimental em camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados frente ao LeL.

Teste	Semanas de Infecção									
	C3H/HePas					C3H/HeJ				
	2 ^a	4 ^a	6 ^a	8 ^a	10 ^a	2 ^a	4 ^a	6 ^a	8 ^a	10 ^a
MTT	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↓	↑	↑
H ₂ O ₂	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↓	↓	↓	↓
NO	↓	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↓	↓	↓
IL-1β	↑	↓	↓	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↑
TNF-α	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↓	↓
IL-12	↑	↑	↓	↓	↓	↑	↑	↓	↓	↑
IL-10	↑	↑	↑	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓
TGF-β	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↑	↑

Quadro 3 - Representação dos resultados observados na esporotricose experimental em camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados frente ao LeM.

Teste	Semanas de Infecção									
	C3H/HePas					C3H/HeJ				
	2 ^a	4 ^a	6 ^a	8 ^a	10 ^a	2 ^a	4 ^a	6 ^a	8 ^a	10 ^a
MTT	↑	↑	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↑	↓
H ₂ O ₂	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↑	↓	↓	↑
NO	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
IL-1β	↑	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↓	↓	↑
TNF-α	↓	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
IL-12	↑	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↓	↓	↑
IL-10	↑	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓
TGF-β	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↑	↑

Quadro 4 - Representação dos resultados observados na esporotricose experimental em camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados

Teste	Semanas de Infecção									
	C3H/HePas					C3H/HeJ				
	2 ^a	4 ^a	6 ^a	8 ^a	10 ^a	2 ^a	4 ^a	6 ^a	8 ^a	10 ^a
IL-1 β soro	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↓
TNF- α soro	↓	↑	↓	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↓
IL-12 soro	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
IL-10 soro	↓	↓	↑	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓
TGF- β soro	↑	↓	↓	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↓
IL-1 intracelular*	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↑
TNF- α intracelular*	↓	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↓	↑	↑
IL-12 intracelular*	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↑	↑	↓	↓
IL-10 intracelular*	↓	↑	↓	↑	↓	↓	↑	↓	↓	↑
TGF- β intracelular*	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↑	↓
NF- κ B	↑	↓	↑	↓	↓	↑	↓	↑	↓	↓
CD14	↑	↓	↑	↓	↓	↑	↑	↓	↓	↓
MD-2	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↓
Apoptose	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↑	↑	↓	↓
Necrose	↓	↑	↓	↑	↑	↓	↓	↑	↑	↑

*Valores referentes as células estimuladas com PMA+ionomicina

6. Discussão

A incidência de doenças infecciosas causadas por fungos aumentou significativamente nos últimos anos, provavelmente devido à ampla utilização de terapias imunossupressoras (SAMONIS e BAFALOUKOS, 1992) e o problema da AIDS (DENNING et al., 1991; PERFECT et al., 1993; JOHNSON 2000).

A esporotricose é a mais comum das micoses profundas sendo caracterizada pela evolução subaguda e crônica das lesões nodulares dos tecidos cutâneos ou subcutâneos. É causada pela inoculação traumática do fungo *Sporothrix schenckii* no tecido subcutâneo através de ferimentos com material contaminado ou pela inalação de esporos via trato respiratório superior. A transmissão zoonótica através de arranhões ou mordida de gatos ou tatus também tem sido relatada (CONTI DIAZ, 1980; CONTI DIAZ, 1989; SCHUBACH et al., 2002; BARROS et al., 2004; SCHUBACH et al., 2005). A forma extracutânea da esporotricose, embora seja rara em indivíduos imunocompetentes, é uma doença emergente em pacientes imunocomprometidos (DURDEN e ELEWSKI, 1997; AL-TAWFIQ e WOOLS, 1998; FONTES et al., 2007; GERHARD et al., 2008).

Silva et al. (2001) confirmaram resultados prévios de Carlos et al. (1992) evidenciando a participação efetiva dos macrófagos ativados por células T CD4+ na esporotricose experimental. As células mononucleares participam efetivamente nas respostas imune e inflamatória em contato a agentes estranhos. Shiraishi et al. (1992) e Carlos et al. (1994) observaram que os macrófagos ativados são muito importantes nos mecanismos de defesa contra a infecção causada pelo fungo *S. schenckii* e que as células T também têm papel significativo na resistência a esta infecção quanto à inibição do crescimento do fungo nos órgãos.

A interação direta do *S. schenckii* com os macrófagos foi demonstrada em um modelo de esporotricose crônica na qual se observou a formação de nódulos testiculares após a inoculação intraperitoneal em camundongos. Estes nódulos contêm grupos de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos com fungos fagocitados. As leveduras permaneceram viáveis nestes nódulos até o final de seis meses, apesar de estarem primariamente dentro dos macrófagos (HIRUMA et al., 1988).

Sabe-se que a ativação dos macrófagos ocorre através de uma série de estágios variando desde um nível equivalente a macrófagos tissulares residentes e culminando no estado ativado em que os macrófagos se tornam competentes para destruir vários patógenos e também lisar células tumorais (ADAMS e HAMILTON, 1984; NATHAN, 1992). Durante este processo de ativação os macrófagos produzem uma variedade de moléculas biologicamente ativas (TAKEMURA e WERB, 1984). Através de vários destes produtos como superóxido (BADWEY e KARNOVSKY, 1980; SASADA e JOHNSTON, 1980),

peróxido de hidrogênio (BADWEY e KARNOVSKY, 1980; NATHAN, 1992), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (URBAN et al., 1986) e interleucina(IL)-1 (ONOZAKI et al., 1985), os macrófagos ativados desempenham função microbicida ou citolítica. Alguns destes produtos como o superóxido/peróxido de hidrogênio (WEISS e LOBUGLIO, 1982; CERUTTI, 1985), TNF (BEUTLER e CERAMI, 1986) e proteases neutras (CAMMER et al., 1978) são também responsáveis pelos aspectos deletérios das respostas imunes, como a destruição dos tecidos e promoção de tumores (STUEHR e MARLETTA, 1987).

A imunidade celular representa importante papel na defesa do hospedeiro contra as infecções fúngicas, e este campo de pesquisa expandiu-se rapidamente nos últimos anos, particularmente em relação à natureza, seqüência e inter-relação dos mecanismos celulares, quando elementos fúngicos são introduzidos em um organismo hospedeiro.

A indução e expressão da imunidade celular em doenças micóticas dependem de complexa seqüência de interações entre antígenos, macrófagos e linfócitos. Embora não se tenha totalmente esclarecidos os mecanismos imunes envolvidos nestas doenças, tem-se notado já há bastante tempo que na ausência das funções normais da célula T, a resistência do hospedeiro à maior parte das doenças fúngicas é acentuadamente reduzida (CAULEY e MURPHY, 1979; SHIRAIISHI et al., 1979).

Numa tentativa de compreender melhor o papel desempenhado pelos macrófagos na infecção induzida pelo fungo *S. schenckii*, nosso laboratório tem desenvolvido um modelo murino de esporotricose disseminada (CARLOS et al., 1992). Vários mecanismos da imunidade celular e humoral têm sido propostos para explicar a imunomodulação durante a esporotricose. Muitos mecanismos de regulação da resposta imune estão sendo estudados com a participação de mediadores solúveis, as citocinas, produzidas tanto por macrófagos como linfócitos. Em trabalho anterior, utilizando antígeno solúvel extraído do fungo *S. schenckii* verificamos a presença de uma depressão na liberação do TNF- α entre a quarta e sexta semanas de infecção (CARLOS et al., 1994), coincidindo com o aumento do número de fungos no fígado e baço de camundongos infectados. Já em trabalho posterior, verificamos que durante o período de infecção de 10 semanas, há o predomínio de uma resposta Th2 da sexta à décima semana (MAIA et al., 2006).

Os receptores "toll-like" (TLR) reconhecem um amplo, mas altamente conservado, grupo de padrões estruturais em bactérias, fungos e vírus, que estão normalmente ausentes nas moléculas do hospedeiro (ROACH et al., 2005). O TLR4, em combinação como MD-2 e CD14, reconhece o lipopolissacarídeo (LPS), o principal componente da membrana externa de bactérias Gram negativas (POLTORAK et al., 1998; TAKEUCHI et al., 1999). A ligação dos TLRs leva a um rearranjo do complexo receptor e ativa o recrutamento de moléculas adaptadoras específicas ao domínio intracelular, iniciando assim a cascata de sinalização (KIM et al., 2007). Na ativação de monócitos, o CD14 ligado à membrana pode ser liberado

na forma solúvel (BAZIL e STROMINGER, 1991; LANDMANN et al., 2000). Existem vários estudos demonstrando um papel importante dos TLRs no reconhecimento de fungos patogênicos, como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans* (NETEA et al., 2006).

Considerando-se que as células de um animal com processo infeccioso poderiam apresentar diferentes comportamentos em relação às células de um animal normal (não infectado), o primeiro questionamento desta pesquisa foi avaliar a viabilidade das células do hospedeiro ao longo da infecção experimental. Para isso, utilizamos o teste descrito por Mosmann (1983) baseado na propriedade que têm as células viáveis em clivar o anel tetrazólico presente no MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) pela ação de enzimas mitocondriais. Observamos que as menores viabilidades celulares foram encontradas no período compreendido entre a quarta e sexta semanas de infecção, período conhecido com sendo o de maior comprometimento do hospedeiro e agravamento da doença, observado em trabalhos anteriores (CARLOS et al., 1992; CARLOS et al., 1994) de nosso laboratório em camundongos Swiss com esse modelo de infecção sistêmica.

A Figura 1 mostra os resultados de viabilidade celular dos macrófagos quando em contato com os diferentes antígenos estudados. Nas células tratadas com o exoantígeno (ExoAg), detectou-se pequena variação na viabilidade das células, sendo que os menores valores foram encontrados entre os animais C3H/HePas não infectados (Figura 1A), na oitava e décima semanas do estudo demonstrando que o ExoAg não é tóxico às células em cultura.

Um fato que nos chama a atenção é que os animais C3H/HeJ não foram influenciados pelo LPS (Figura 1C e 1D), mostrando elevados valores de viabilidade celular (acima de 88%), uma vez que tem a expressão defectiva do receptor para essa endotoxina e por este motivo são pouco influenciados pela presença deste antígeno na cultura celular. Quando as células dos camundongos C3H/HePas foram tratadas com o LPS houve maior variação da viabilidade celular, variando de 63 a 96%. Por outro lado, resultado diferente foi observado nas células dos camundongos C3H/HeJ com relação aos lipídios da fase leveduriforme (LeL) e da fase miceliar (LeM), uma vez que foi significativa a diferença entre as sextas, oitavas e décimas semanas do estudo em ambas cepas de animais.

A presença de infecção é reconhecida por receptores para elementos chamados padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), os quais são expressos por microrganismos como bactérias, fungos e leveduras (ANDERSON, 2000). O reconhecimento desses PAMPs por células mielóides é o primeiro passo de uma complexa reação inflamatória que caracteriza a resposta imunológica inata. O LPS é o principal alvo de reconhecimento e induz a uma forte reação inflamatória mediada por células fagocíticas (WRIGHT, 1990).

Os TLRs iniciam uma transdução do sinal pró-inflamatório por atuarem como os principais receptores que reconhecem os PAMPs. Enquanto que os receptores TLR2 reconhecem PAMPs produzidos por bactérias Gram-positivas, o TLR4 é crítico para o reconhecimento de LPS, principalmente.

Alguns estudos (POLTORAK et al., 1998; HOSHINO et al., 1999) demonstraram que uma forma mutada do gene *lps*, onde houve uma troca pontual do aminoácido prolina por histidina, impede a transdução de sinal do LPS no TLR4. Nos mamíferos a proteína TLR4, produto gênico, é que reconhece o LPS e regula a resposta ao mesmo. A linhagem de camundongos C3H/HeJ é conhecida por ser hiporresponsiva ao LPS devido a essa mutação espontânea no locus gênico *lps* (WATSON e RIBLET, 1974).

Quando as células fagocíticas encontram um patógeno podem ocorrer perturbações na membrana e na fagocitose, ativando rapidamente o “burst” oxidativo e subseqüentemente ativando a célula (ZUGHAIER et al., 2005).

Os intermediários reativos do oxigênio (ROI) são mediadores da defesa antimicrobiana do hospedeiro e podem também promover danos ao tecido do hospedeiro, produzidos durante o “burst” oxidativo quando em altas concentrações. Os macrófagos respondem por expressiva produção do ânion superóxido e peróxido de hidrogênio durante a fagocitose ou após o estímulo por vários agentes (ROBINSON e BADWEY, 1994).

Neste trabalho a ativação do “burst” oxidativo foi avaliada através da liberação de H_2O_2 , composto final observado neste processo. Verificou-se que as células tanto dos animais C3H/HePas e C3H/HeJ infectados quanto dos não infectados (Figura 2) não respondem ao estímulo do ExoAg do fungo *S. schenckii*. No entanto, essas células são competentes para isso, como observado pela elevada produção de H_2O_2 em resposta ao PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate – controle positivo), tanto pelas células dos animais C3H/HePas e C3H/HeJ infectados quanto dos não infectados. Vale ressaltar que foi observada a produção de H_2O_2 estimulada pelo ExoAg na segunda semana de infecção entre os camundongos C3H/HePas. Este resultado coincide com trabalho anterior em que se observou a produção de H_2O_2 em resposta ao ExoAg somente na segunda semana de infecção em camundongos Swiss (trabalho submetido para publicação). O ExoAg é constantemente liberado durante todo o processo infeccioso e a sua incapacidade de estimulação do “burst” oxidativo poderia ser vista como uma forma de impedir a ativação de macrófagos por essa via, facilitando sua disseminação no organismo hospedeiro. Rementería et al. (1995) verificou que células do exsudato peritoneal de camundongos saudáveis ou infectados com *Candida albicans* também não foram estimuladas a produzirem intermediários reativos do oxigênio.

Por outro lado, quando os antígenos lipídicos extraídos da parede celular do fungo em sua fase micelial ou leveduriforme estiveram em contato com os macrófagos, observou-

se ativação do “burst” oxidativo pela produção de H_2O_2 . Dentre eles o extrato lipídico da fase miceliar foi o que mais estimulou a resposta através do “burst” oxidativo. Este fato talvez se deva a ser esta a forma infectante encontrada na natureza, representando na maioria dos casos a forma com a qual o fungo faz o seu primeiro contato com o sistema imune do hospedeiro. Fernandes et al. (2000) observaram que os macrófagos, quando em presença de conídios ou células leveduriformes intactas do *S. schenckii*, ativam o “burst” oxidativo com intensidade comparável àquela induzida pelo PMA.

Um fato digno de nota foi que a produção de peróxido de hidrogênio ocorreu até a décima semana de estudo, tanto nos animais infectados quanto nos não de ambas as linhagens quando estimulados com LeM, embora a produção tenha sido maior entre os animais infectados.

Romero-Martinez et al. (2000) observaram que os monócitos humanos produziram muito mais intermediários reativos do oxigênio em resposta ao *S. schenckii* que os macrófagos murinos frente ao mesmo estímulo. Embora a razão destas diferenças ainda não seja conhecida, sugere-se que a ativação do “burst” oxidativo não seja regulada da mesma maneira em macrófagos humanos e murinos, podendo estar relacionadas com outras vias de ativação.

Remer et al. (2003) demonstraram que o defeito genético no TLR4 está associado com uma menor geração de anion superóxido por neutrófilos em resposta ao LPS, sugerindo que a ativação de certos TLRs pelos PAMPs resulta não somente na indução da expressão de genes, mas também na promoção de processos rápidos como a indução do “burst” oxidativo. Os nossos resultados apresentados aqui também sugerem o envolvimento do TLR4 na indução do “burst” oxidativo, como observado pela menor produção de H_2O_2 pelos macrófagos peritoneais dos camundongos C3H/HeJ (Figura 2D) em relação aos C3H/HePas (Figura 2B) quando o “burst” oxidativo foi estimulado pelo LeL ou LeM. Da mesma forma, Ryan et al. (2004) observaram que o LPS purificado de *Escherichia coli*, que é um agonista específico de TLR4, estimula o “burst” oxidativo em células THP-1 (linhagem celular da leucemia humana aguda monocítica, que expressa o TLR4) e esta ativação é dependente da presença do TLR4, como demonstrado pela ativação do “burst” oxidativo quando se utilizou células HEK293 (células embrionárias de rim humano) transfectadas com o TLR4 e suas moléculas acessórias, CD14 e MD-2. Ryan et al. (2004), para confirmar estes resultados com as linhagens de culturas de células, observaram também em macrófagos derivados da medula óssea isolados de camundongos C57BL/6, que expressam o TLR4 funcional, que o LPS induz a geração de ROI. Entretanto, nas células dos camundongos C3H/HeJ, que têm a expressão defectiva do TLR4, não há a geração de radicais livres induzida pelo LPS.

Outra categoria de compostos inorgânicos secretados pelos macrófagos diz respeito

aos intermediários reativos do nitrogênio (RNI), que inclui o nitrito e óxidos altamente reativos como o óxido nítrico (NO) e o dióxido de nitrogênio (DING et al., 1988). O NO desempenha um papel importante na resposta inflamatória e imunológica. A ativação imunológica dos macrófagos induz a atividade da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), levando à produção de NO que medeia muitas das atividades dos macrófagos contra alguns patógenos, seja fungos, helmintos, protozoários ou bactérias (NATHAN e HIBBS, 1991).

O NO participa na resposta imune a outras infecções fúngicas. Rossi et al. (1999) observaram que o NO é uma molécula muito importante para os mecanismos efetores na infecção experimental de camundongos causada pelo fungo *C. neoformans*. Em seus experimentos demonstraram que os macrófagos peritoneais dos camundongos infectados eram mais eficazes em destruir o *C. neoformans* que as células dos animais não infectados e esta capacidade era dependente de NO.

Nossos resultados quanto à produção de NO durante a esporotricose experimental demonstraram que quando as células dos camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ foram tratadas com o ExoAg (Figura 3), houve apenas uma pequena liberação de NO em todos os grupos testados, contrastando com dados do laboratório (MAIA et al., 2006) que demonstraram elevada produção deste mediador entre a quarta e sétima semanas de infecção em camundongos Swiss frente a este mesmo antígeno. Esta diferença deve-se, possivelmente, a diferenças na concentração do ExoAg utilizada por Maia et al. (2006) e também à resposta diferente das linhagens de camundongos empregadas neste estudo.

Com relação aos outros antígenos testados, houve grande diferença em relação à produção de NO entre os camundongos C3H/HePas e os C3H/HeJ. Observamos que as células dos camundongos C3H/HePas infectados (Figura 3B) quando estimuladas pelo LeL produziram maiores concentrações de NO no período da segunda até a oitava semana e diminuindo um pouco na décima semana. Quando as células foram desafiadas com o LeM, observou-se baixa produção de NO durante todo o período estudado.

Por outro lado, quando as células dos camundongos C3H/HeJ infectados (Figura 3D) foram cultivadas em presença destes mesmos estímulos, observou-se um perfil diferente da produção deste mediador. Frente ao LeL a maior produção de NO ocorreu somente na quarta semana de infecção e quando o LeM estava presente nas culturas celulares observou-se baixa produção durante todo o período do estudo. Quando as células dos camundongos C3H/HeJ infectados foram estimuladas pelo LPS também se observou uma baixa produção de NO, resultado este que já era esperado uma vez que o TLR4 é o principal responsável pelo reconhecimento do LPS e está com a expressão defectiva nestes animais.

Observando os resultados de produção de NO pelas células dos camundongos

C3H/HePas infectados frente ao LPS e ao LeL, verificamos um perfil muito semelhante. Isso nos fez refletir sobre a composição destas duas moléculas e sua interação com o TLR4. O LPS, que é o ligante protótipo dos TLR4, é composto por uma porção hidrofóbica lipídica A, polissacarídeos hidrofílicos e o antígeno O. Sabe-se que a porção lipídica A, que é composta de di-glucosamina fosforilada e múltiplas cadeias de acila, corresponde ao padrão molecular conservado do LPS e é o principal indutor das respostas biológicas ao LPS (MIYAKE, 2006 e 2007). Sendo o LeL um antígeno lipídico, parece-nos que ele interage com o TLR4 da mesma maneira que a porção lipídica do LPS. Assim, pretendemos, em trabalhos futuros, conhecer a sua composição para elucidar os mecanismos desta interação.

Evans et al. (1993) observaram uma resposta muito pequena na indução da enzima iNOS nos camundongos com expressão defectiva do TLR4 (C3H/HeJ) após injeção endovenosa de LPS, enquanto que nos camundongos com expressão normal do TLR4 (C3H/HeN) houve uma grande indução desta enzima após 6h, uma vez que o TLR4 foi primeiramente envolvido no reconhecimento do LPS. Os nossos resultados quanto à produção de NO permitem-nos relacioná-los à presença do TLR4, uma vez que observamos baixas concentrações deste mediador sendo produzidas pelos camundongos deficientes no TLR4, sendo mais evidente quando as células dos animais infectados foram desafiadas com o LPS e LeL. Outros pesquisadores (SCHUETZE et al., 2005) também observaram que camundongos deficientes no TLR4 e deficientes tanto de TLR2 quanto TLR4 apresentaram uma redução na produção de NO e TNF- α pelos macrófagos derivados da medula óssea em resposta ao LPS e à *Salmonella enteritidis*, o que não foi observado nos deficientes somente no TLR2, demonstrando o papel do TLR4 na produção destes mediadores. Da mesma forma, Mun et al. (2003) demonstraram que macrófagos peritoneais de camundongos com expressão defectiva ou não no TLR4 infectados com o protozoário *Toxoplasma gondii* respondem ao desafio com *T. gondii* com a expressão do mRNA de iNOS e produção de NO de maneira TLR4 dependente. A inibição da produção de NO (usando N(G)-mono-metil-L-arginina – L-NMMA) levou a uma maior suscetibilidade a infecção pelo *T. gondii*, os camundongos não sobreviveram à infecção com altas doses de *T. gondii*; demonstrando que o NO é um importante mecanismo na resistência a esta infecção.

Estudos feitos por Gonzalez et al. (2000) mostraram que a produção de NO pelos macrófagos peritoneais induzida pelo IFN- γ é capaz de restringir o crescimento intracelular do *Paracoccidioides brasiliensis*, indicando que este é um mecanismo efetor importante. Wu-Hsieh et al. (1998) observaram que a produção de NO está associada à atividade supressora dos macrófagos esplênicos de camundongos infectados com o fungo *Histoplasma capsulatum* e parece também estar relacionada à apoptose e à resposta anti-proliferativa das células do baço de camundongos infectados.

O NO pode ainda estar envolvido na baixa produção de ROI observada em nossos

resultados. Kiprianova et al. (1997) observaram que a produção de NO, estimulada por IL-1 β e IFN- γ , induz uma menor produção de anion superóxido, e esta redução foi revertida pela adição de um inibidor da síntese de NO. Da mesma forma, compostos químicos que liberam NO também levam a esta inibição do “burst” oxidativo. Esta menor geração de anion superóxido pelo NO pode limitar os efeitos deletérios da liberação de ROI no tecido inflamado ou lesionado (KIPRIANOVA et al., 1997).

Os macrófagos são células muito importantes na rede de citocinas, participando na regulação da defesa imunológica do hospedeiro e nas reações inflamatórias pela produção de vários mediadores (NIELSEN et al., 1994). As citocinas são mediadores solúveis liberados pelas células do sistema fagocitário, essenciais na comunicação intracelular e em muitos processos fisiológicos e patofisiológicos. Elas também modulam a inflamação e a imunidade, regulando o crescimento e a diferenciação de leucócitos e também de células não leucocitárias (OPPENHEIM e NETA, 1994).

A interleucina (IL)-1 é uma citocina pleiotrópica, com propriedades de ativar células T e B, monócitos e macrófagos, osteoclastos, fibroblastos, células musculares, endoteliais e epiteliais. A maior fonte desta citocina são as células ativadas do sistema fagocítico mononuclear, e esta produção pode ser rapidamente induzida pelo LPS, TNF- α , interferons α , β e γ , e por si própria (MÖLLER e VILLIGER, 2006).

A IL-1 β é uma citocina intimamente relacionada à fase aguda da inflamação induzindo a expressão de moléculas de adesão na superfície de células endoteliais (MULLER, 2002). A sinalização através dos TLRs leva ao recrutamento de proteínas que levam à ativação do fator de transcrição NF- κ B, que coordena a indução de genes que codificam as proteínas pró-inflamatórias (GUHA e MACKMAN, 2001). No entanto, Netea et al. (2002) observaram que tanto a produção de TNF- α , IL-1 α e IL-1 β pelos macrófagos em resposta à infecção por *C. albicans* quanto a capacidade de matar o fungo foram normais nos camundongos com expressão defectiva do TLR4 (C3H/HeJ), ou seja, não são afetadas por este receptor.

Os resultados obtidos quanto à produção de IL-1 β demonstraram menor concentração de IL-1 β entre a quarta e sexta semanas de infecção, quando as células dos camundongos C3H/HePas foram estimuladas com o ExoAg, LeL e LeM (Figura 4B). Frente ao LPS, a redução na produção de IL-1 durante o período estudado foi observado apenas na sexta semana. Dentre estes antígenos o que induz a maior produção de IL-1 β é o LeL durante todas as semanas de infecção e este resultado ocorre também entre os animais não infectados desta linhagem, nos quais também verificou-se uma variação da produção de IL-1 β com menores níveis entre a quarta e sexta semanas do estudo, estatisticamente significativas ($p < 0,001$) quando se compara a quarta e sexta semanas com a segunda

semana e quando se compara a sexta com a oitava e décima semana. Já o extrato lipídico da fase miceliar (LeM) estimulou maior produção de IL-1 β no início da infecção (segunda semana). Isto pode ser devido ao fato de que a forma miceliar é a infectante, aquela que penetra no organismo, assim estimulando a resposta de produção de IL-1 β no início da infecção. A fase leveduriforme, na qual o fungo se transforma quando já instalado no hospedeiro (temperatura de 37°C), induz a produção de IL-1 β durante todo o período estudado, refletindo dessa forma na resposta envolvida com a permanência do fungo no organismo hospedeiro. Em trabalhos anteriores Carlos et al. (1994) já observaram essa menor produção de IL-1 neste período que vai da quarta até a sexta semana de infecção em camundongos Swiss, juntamente com maior recuperação do fungo do baço dos animais infectados, mostrando que a ausência de IL-1 β pode estar relacionada à maior proliferação do fungo no organismo hospedeiro.

Os níveis de IL-1 induzidos nas células dos camundongos com expressão defectiva do TLR4 (C3H/HeJ) foram sempre menores do que os produzidos pelas células dos camundongos não defectivos neste receptor (C3H/HePas), no entanto com diferenças menores do que aquelas observadas quanto à produção de NO entre as duas linhagens de camundongos estudadas. Isso pode significar menor envolvimento do TLR4 na sinalização da produção de IL-1 β , como também observado por Netea et al. (2002), quando estudaram o envolvimento do TLR4 na resposta imune contra *C. albicans*. Entre os antígenos testados o LeL foi também o melhor estímulo para a produção de IL-1 pelos macrófagos peritoneais mantidos em cultura, embora no caso dos C3H/HeJ tenha ocorrido em menores concentrações e também a depressão na produção de IL-1 ocorre no período entre a sexta e oitava semana de infecção (Figura 4D), um pouco mais tarde do que observado nos C3H/HePas. Uma redução na produção de IL-1 entre a sexta e oitava semanas de infecção nos camundongos C3H/HeJ também aconteceu quando as células foram tratadas com o LeM, porem as concentrações liberadas foram ainda menores do que o LeL.

Correlacionando com os resultados apresentados, podemos notar que a produção de H₂O₂ e NO pelo LeL é influenciada pelo TLR4 enquanto que os resultados da produção de IL-1 β sugerem independência deste receptor.

Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho foram observados por Nakamura et al. (2006) quando estudaram o envolvimento do TLR2 e TLR4 na resposta imune ao fungo *C. neoformans*. Eles verificaram que a síntese das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-12p40 não foi significativamente alterada nos pulmões dos camundongos “knockout” para estes receptores em relação aos controles. Assim sugeriram que tanto TLR2 quanto TLR4 não estão envolvidos ou contribuem muito pouco para a resposta celular do hospedeiro contra este patógeno.

Paterson et al. (2003) observaram que células de camundongos C57BL/10ScN/Cr, deficientes em TLR4, são hiporresponsivas, mas não completamente irresponsivas, à estimulação pelo LPS, uma vez que foi observada a produção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Este resultado concorda com trabalhos anteriores que sugerem que o LPS não sinaliza exclusivamente através do TLR4 (HIRSCHFELD et al., 2000).

As respostas celulares dos macrófagos ao LPS são numerosas, praticamente cada aspecto da fisiologia dessas células é de algum modo influenciado pelo LPS. O LPS induz aumento no consumo de glicose e oxigênio e então as células adquirem alta capacidade funcional, como a capacidade de matar microorganismos e células tumorais. Desse modo, os macrófagos desenvolveram um eficiente mecanismo para o reconhecimento do LPS e, portanto essa substância está entre as mais potentes estimuladores de macrófagos (ZWILLING e EISENSTEIN, 1994).

Alterações imunológicas relacionadas a mudanças na atividade das células do sistema imune podem aparecer não somente na cavidade peritoneal, mas também no sangue periférico, assim a concentração das citocinas nos soros dos camundongos também foi avaliada.

Em relação à presença da IL-1 β nos soros dos camundongos, observou-se novamente um perfil muito diferente em relação à presença desta citocina entre as diferentes linhagens utilizadas neste trabalho. Os animais C3H/HePas liberaram maiores concentrações nas semanas iniciais do estudo (segunda e quarta semanas) e nos C3H/HeJ observou-se que a liberação desta citocina no soro dos animais infectados ocorreu de forma mais tardia, entre a sexta e oitava semanas de infecção, mas em concentrações muito mais altas observadas na sexta semana de infecção. Este resultado reforça nosso entendimento anterior sobre o não envolvimento do TLR4 na produção de IL-1. Alguns pesquisadores demonstraram que as concentrações de citocinas no soro são freqüentemente muito baixas para serem mensuradas pelo ELISA, e os valores obtidos pelo ELISA podem variar consideravelmente. Além disso, esta técnica não avalia a fonte celular da citocina (MATSUMOTO et al., 1991; HASHIMOTO et al., 1993).

Em trabalho anterior de nosso laboratório (CARLOS et al., 1994) verificou-se que a produção de IL-1 e TNF- α ocorrem principalmente nos estágios iniciais e finais da esporotricose experimental em camundongos Swiss, e esta redução na produção de IL-1 e TNF- α , entre a quarta e sexta semanas de infecção parece estar relacionada à depressão na resposta imune observada neste período.

Enquanto que Netea et al. (2002) observaram que a produção de TNF- α e IL-1 β não é influenciada pelo TLR4 durante a infecção por *C. albicans*, outros pesquisadores demonstraram que o TLR4 é importante na defesa contra fungos patogênicos. Wang et al. (2001) demonstraram papel para o TLR4, mas não para o TLR2, na indução de citocinas

pró-inflamatórias pelo *A. fumigatus*. Da mesma forma, Shoham et al. (2001) sugerem que o TLR4 medeia a sinalização intracelular, mas não a produção de TNF após a estimulação com glucuronoxilomanana de *C. neoformans*.

O TNF, que recebeu esta denominação devido a sua capacidade de ativar a necrose e inibir o crescimento de certas linhagens de células tumorais, tornou-se um dos principais mediadores da resposta à endotoxina, doenças reumatóides e outras formas de inflamação. Também se revelou como um componente importante na imunidade celular contra vários patógenos (BEUTLER, 1995).

A produção de TNF- α ocorreu em um perfil semelhante nas duas linhagens estudadas, mas também foram observadas concentrações maiores deste mediador nos camundongos C3H/HePas do que nos C3H/HeJ, sendo que as maiores concentrações foram observadas na segunda e quarta semanas de infecção. Observando-se as respostas em relação aos diferentes antígenos do fungo utilizados nas culturas celulares, verificou-se que as maiores concentrações de TNF- α foram observadas quando as células foram cultivadas em presença do LeL, em perfil semelhante àquele observado quando as células foram desafiadas com o LPS (Figura 6B). Nos camundongos C3H/HeJ infectados (Figura 6D), que são deficientes no TLR4, não foi observada produção de TNF- α quando as células foram tratadas com o ExoAg ou LeM, e as concentrações de TNF- α em resposta ao LeL foram significativamente menores do que aquelas observadas nos camundongos C3H/HePas, sugerindo que o TLR4 seja importante na indução da produção de TNF- α . Schuetze et al. (2005) também demonstraram que a produção de TNF- α é mediada pelo TLR4 na infecção causada pela bactéria *Salmonella enteritidis*, uma vez que verificaram produção reduzida desta citocina pelas células de camundongos deficientes em TLR4. Outros pesquisadores observaram também que não só o TLR4, mas também o TLR2 está envolvido na produção de TNF- α e IFN- γ pelos macrófagos estimulados por leveduras de *C. albicans*; no entanto as hifas de *C. albicans* parecem estimular somente as respostas dependentes de TLR2 (VAN DER GRAAF et al., 2005).

Este mesmo resultado foi observado quando foi pesquisada a presença desta citocina nos soros dos animais, só ocorrendo de maneira detectável nos camundongos C3H/HePas. Resultado semelhante foi obtido por Evans et al. (1993) que avaliaram a presença de TNF- α no soro de camundongos C3H/HeJ e C3H/HeN inoculados com $4,2 \times 10^8$ CFU de *Escherichia coli* O111 e observaram que houve aumento significativo desta citocina no soro dos camundongos C3H/HeN enquanto que nos C3H/HeJ o aumento foi muito pequeno e mais tardio.

Ao contrário das nossas observações, Murciano et al. (2006) verificaram que o TLR4 é dispensável para a resistência imune à *C. albicans*, uma vez que tanto camundongos com

expressão defectiva do TLR4 quanto camundongos “knockout” (TLR4^{-/-}) não apresentaram diferença em relação à sobrevivência após a infecção com a cepa virulenta de *C. albicans*. Além disso, a produção de TNF- α pelos macrófagos e a produção de IFN- γ pelas células esplênicas também não foi diferente entre os camundongos TLR4-deficientes em relação aos controles quando estimulados por hifas de *C. albicans*. Da mesma forma, Biondo et al. (2005) estudaram o papel dos TLRs na resposta imune ao *C. neoformans* e observaram que camundongos “knockout” para o TLR2 produziram muito menos TNF- α , em relação aos controles, enquanto que macrófagos de camundongos deficientes em TLR4 produziram tanto TNF- α quanto os controles. A expressão de TNF- α , IL-12p40 e IFN- γ nos órgãos alvo também foi reduzida nos camundongos TLR2^{-/-}, sugerindo que o TLR2 está muito mais envolvido na resistência anti-criptococus do que o TLR4.

Abel et al. (2002) também demonstraram a participação do TLR4 na resposta imune durante a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, uma vez que camundongos deficientes em TLR4 têm capacidade reduzida de eliminar a micobactéria dos pulmões, morrendo dentro de 5-7 dias, enquanto que os camundongos controles conseguiram controlar a infecção e sobreviveram durante todo o experimento. Além disso, a expressão de TNF- α , IL-12p40 e proteína quimioatrativa de monócitos 1 (MCP1) também estava significativamente reduzida nos camundongos C3H/HeJ. O glicolípido micobacteriano purificado (fosfatidilinositol manosídeo), induz sinalização via TLR2 e TLR4, sugerindo que o reconhecimento deste componente influencia o desenvolvimento de uma imunidade protetora e que o TLR4 é necessário para que haja uma resposta protetora durante a infecção crônica pelo *M. tuberculosis*.

A IL-12 (também chamada de IL-12p75 ou IL-12p70, mas comumente designada como IL-12 somente) é uma citocina imunorregulatória que promove a imunidade mediada por células (GATELY et al., 1998; TRINCHIERI, 1998). A IL-12 estimula a produção de IFN- γ pelas células T e “natural killer”. Alguns estudos em camundongos deficientes em IL-12 demonstraram um papel essencial na indução da resposta imune tipo Th1, que são especialmente necessárias para a proteção contra microorganismos intracelulares (MAGRAM et al., 1996; MATTNER et al., 1996). Está não somente envolvida na indução, mas também na manutenção da resposta Th1 (PARK et al., 2000; YAP et al., 2000).

A IL-12 representa a primeira proteína heterodimérica numa família de citocinas que vem crescendo recentemente e compreende citocinas estruturalmente relacionadas e menos caracterizadas como a IL-23 e IL-27 (BROMBACHER et al., 2003). A IL-23 consiste da ligação covalente entre a subunidade p40 e a IL-23p19 (OPPMANN et al., 2000) e sua função está relacionada à promoção da proliferação das células T produtoras de IL-17 (AGGARWAL et al., 2003; KHADER et al., 2005) e envolvida na auto imunidade

(HARRINGTON et al., 2006), além de contribuir para a resistência atuando no recrutamento de neutrófilos via IL-17 (HAPPEL et al., 2005). O outro membro da família, a IL-27 consiste na ligação não covalente entre subunidades do vírus de Epstein-Baar gene 3 e a p28 (PFLANZ et al., 2002), foi primeiramente relacionada à indução da proliferação de células T CD4⁺ (PFLANZ et al., 2002), e recentemente parece inibir a proliferação de células T produtoras de IL-17 (STUMHOFER et al., 2006; BATTEN et al., 2006). Schuetze et al. (2005) estudaram a importância do TLR4 na expressão destes membros da família da IL-12. Eles observaram que macrófagos deficientes no TLR4 não respondem ao Lipídio A purificado e ao LPS. Após a estimulação com *Salmonella enteritidis*, entretanto, estas células respondem com produção de mRNA de p35, p19 e p28 bastante reduzida em comparação com os camundongos selvagens. O mRNA de p40 também estava reduzido, embora de modo mais sutil.

Ao contrário do que foi observado para os nossos resultados de produção de NO e TNF- α , a produção de IL-12p70 aconteceu em maiores níveis nos camundongos C3H/HeJ infectados (Figura 8D), e principalmente na segunda e quarta semanas de infecção, com os maiores níveis sendo observados na segunda semana, quando tratados com o LeL, e na quarta semana, quando as células foram tratadas com o ExoAg ou LeM, voltando a aparecer alta na décima semana frente ao LeM. Nos camundongos C3H/HePas infectados (Figura 8B) a produção de IL-12 também aconteceu em maiores níveis nas semanas iniciais do estudo e principalmente em resposta ao LeL, mas em concentrações muito menores do que aquelas observadas nos camundongos C3H/HeJ. Estes resultados sugerem que a produção de IL-12p70 ocorreu de forma independente do TLR4.

Resultados semelhantes foram encontrados por Mun et al. (2003) que observaram elevados níveis de células produtoras de IL-12 e IFN- γ no exsudato peritoneal dos camundongos deficientes em TLR4 após a infecção com *T. gondii*. Baixos níveis de células produtoras de IL-4 e IL-10 foram detectados no exsudato peritoneal dos camundongos deficientes em TLR4. No entanto, quando pesquisaram estas citocinas no plasma dos camundongos observaram que os camundongos TLR4 deficientes produziram maiores concentrações de IL-12 e IFN- γ e baixos níveis de IL-4. Diferente dos nossos resultados em que a pesquisa de IL-12p70 no soro dos animais não revelou níveis detectáveis desta citocina em nenhuma das duas linhagens utilizadas no trabalho.

Scanga et al. (2002), relataram que a indução de IL-12 pelo *T. gondii* depende de um único mecanismo envolvendo tanto MyD88 quanto as vias de sinalização acopladas à proteína G, e que esta redução na produção de IL-12 não é resultado da sinalização via TLR2 ou TLR4.

Zamboni et al. (2004) estudaram os macrófagos de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados com a bactéria Gram negativa *Coxiella burnetii*, e observaram que em

ambas as linhagens de camundongos houve produção de altos níveis de TNF- α e IL-12p40. Além disso, a multiplicação de *C. burnetti* nos macrófagos dos camundongos deficientes em TLR4 foi semelhante àquela observada nos macrófagos controles que expressam TLR4 funcional, indicando que o TLR4 não medeia o reconhecimento de *C. burnetti*. Entretanto, um papel para o TLR4 na fagocitose de macrófagos, na produção de citocinas *in vivo* e na formação do granuloma em resposta à infecção por *C. burnetti* foi proposta por Honstetter et al., 2004. Em nossos resultados não podemos descartar a participação do TLR4 na resposta imune ao *S. schenckii* nem, no entanto, atribuir totalmente a este, uma vez que observamos menor produção de H₂O₂, NO e TNF- α nos camundongos com expressão defectiva do TLR4, mas a produção de IL-1 e IL-12 parecem não ter sido tão afetada pela menor sinalização através deste receptor.

A IL-10 é uma citocina pleiotrópica, mas ao contrário da IL-1 β , expressa propriedades imunossupressoras e anti-inflamatórias, podendo atuar como um fator supressor das respostas imunes, com conseqüências para transplantes, tolerância, terapia do câncer e doenças infecciosas (SPITS e DE WAAL MAEFYT, 1992). Inibe principalmente a atividade antimicrobiana dos fagócitos e a ativação das células T (DEEP e GIBBONS, 2003). É produzida por linfócitos Th2, macrófagos, mastócitos e células B. Tem uma variedade de funções, incluindo a regulação negativa da ativação das células T, a produção de IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , supressão da proliferação e ativação dos macrófagos, inibição da produção de NO e a produção de anticorpos (CLEMONS et al., 2000).

A IL-10 é um produto de vários tipos celulares como monócitos, células B e células T, e diferente da IL-12, a IL-10 está associada à diferenciação das células Th2 (MOORE et al., 1988; FIORENTINO et al., 1989). A IL-10 é um potente inibidor das funções dos monócitos/macrófagos, inclusive do “burst” oxidativo, produção de NO, citotoxicidade e produção de citocinas como a IL-1 e TNF- α (BOGDAN et al., 1991; de WAAL MALEFYT et al., 1991; FIORENTINO et al., 1991; GAZZINELLI et al., 1992; RALPH et al., 1992). Além disso, a IL-10 inibe a função acessória dos macrófagos, mas não de outras células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas ou células B, pela supressão tanto de citocinas co-estimulatórias como de moléculas co-estimulatórias na superfície dos macrófagos (DING e SHEVACH. 1992).

A produção de IL-10 em nossos experimentos ocorreu somente nos camundongos C3H/HePas e nestes animais a produção pôde ser observada nas semanas iniciais do estudo (segunda e quarta) (Figura 10B), sendo que ocorreu principalmente em resposta ao LeL e as maiores concentrações foram observadas na décima semana do estudo. Uma vez que esta citocina tem papel anti-inflamatório, esta maior produção de IL-10 no final do estudo sugere um papel na resolução da resposta inflamatória, contribuindo para a

recuperação do hospedeiro.

A produção de IL-10 estimulada pelo ExoAg nos camundongos C3H/HePas foi observada somente na sexta e décima semanas de infecção. Este resultado também foi observado para a detecção desta citocina no soro dos camundongos C3H/HePas, sendo observada a liberação de IL-10 somente na sexta e décima semanas. Este fato nos chama atenção pela atividade apresentada pelo ExoAg durante a infecção: qual seu exato componente que faz com que haja uma resposta tão parecida de produção de IL-10 no soro e nas culturas celulares *in vitro*? Sabemos que o ExoAg apresenta porção peptídica e polissacarídica (ramnomanas) (CARLOS et al., 1999), e outros estudos sugeriram que os resíduos de ramnose possam ser os principais epítomos antigênicos na superfície da célula fúngica (LLOYD e TRAVASSOS, 1975; LOPES-ALVES et al., 1994). Desta maneira pretendemos em um futuro próximo realizar novos estudos na tentativa de esclarecer este fato.

A maior produção de IL-10 pelas células dos camundongos TLR4 normais (C3H/HePas) sugere que este receptor desempenha papel importante não somente no reconhecimento e indução de uma resposta imune celular, mas também nos mecanismos regulatórios da resposta imune. Outros pesquisadores também encontraram menor produção de IL-10 nos camundongos com expressão defectivas do TLR4 (C3H/HeJ). Ding et al. (2005) demonstraram que os camundongos C3H/HeJ, após a infecção por *Pneumocystis carinii*, produzem níveis reduzidos de IL-10, IL-12p40 e MIP-2 e níveis aumentados de TNF- α e IL-6 nas células do lavado bronco alveolar, quando comparados com o tipo selvagem, sugerindo que o reconhecimento do *P. carinii* pelo TLR4 ajuda a regular a resposta inflamatória através da produção de citocinas e quimiocinas pelos macrófagos alveolares. No entanto, estes resultados obtidos por Ding et al. (2005) diferem dos nossos no que diz respeito à IL-12 e ao TNF- α , uma vez que observaram níveis reduzidos e elevados (respectivamente) destas citocinas nos camundongos com expressão defectiva do TLR4 e os nossos resultados durante a esporotricose experimental demonstraram níveis aumentados de IL-12 e reduzidos de TNF- α nos camundongos C3H/HeJ.

Belocchio et al. (2005) observaram aumento significativo na produção de IL-10 nos camundongos deficientes em MyD88 (uma das proteínas adaptadoras utilizadas na via de sinalização do TLR4) contra leveduras de *C. albicans* ou hifas e conídios de *A. fumigatus*; associaram a esta elevada produção de IL-10 à baixa produção de IL-12 pelas células dendríticas. Neste mesmo trabalho, Belocchio et al. (2005) demonstraram que um perfil semelhante da produção destas citocinas foi observado nas células dendríticas deficientes em TLR4. Estes resultados são bastante semelhantes aos observados neste trabalho, com maior produção de IL-10 e menor produção de IL-12 mediada pelo TLR4.

A produção de IL-10 no início do estado infeccioso também foi observada por Farah et al. (2001) em infecção experimental de candidíase orofaríngea, onde descreveram a produção de IL-10 por neutrófilos e posterior desenvolvimento de uma resposta mediada por células T, que voltam a modular as funções dos neutrófilos em um processo de “feedback”.

Netea et al. (2004) demonstraram uma redução na produção de IL-10 pelos macrófagos e aumentada produção de IFN- γ pelas células esplênicas em resposta à infecção por *C. albicans* em camundongos deficientes no TLR2, associado a uma menor geração de células T regulatórias e melhor eliminação das leveduras pelos macrófagos. Nossos resultados podem ser equiparados a estes observados por Netea et al., uma vez que a deficiência do TLR4 levou a uma redução na produção de IL-10 e aumentada produção de IL-12, que é a principal indutora da produção de IFN- γ pelas células T. Montagnoli et al. (2002) têm associado um papel das células T regulatórias na resposta imune a *C. albicans* e que sinais mediados pela IL-10 estão envolvidos na geração destas células regulatórias. Deste modo, a redução na produção de IL-10 induzida pela *C. albicans* mediada pelo TLR2, observada por Netea et al. (2004) pode facilitar o desenvolvimento da candidíase por uma redução nas células T regulatórias. Outros pesquisadores também observaram que a inibição da produção de IL-10 pelo uso de anticorpos (ROMANI et al., 1994) ou em camundongos “knockout” (VASQUEZ-TORRES et al., 1999) pode resultar em maior resistência à candidíase disseminada.

Na paracoccidiodomicose humana a IL-10 parece desempenhar função reguladora durante o processo de apoptose, assim evitando a perda de células reativas durante a infecção pelo fungo *P. brasiliensis* (CACERE et al., 2002).

Desde que foi descrito pela primeira vez pela capacidade de inibir a ativação dos macrófagos, o TGF- β (“transforming growth factor-beta”) tem sido analisado pelo seu papel na regulação das respostas imunes contra vários patógenos, como vírus, bactérias, leveduras e protozoários (REED, 1999)

O TGF- β exerce um papel regulador importante, atuando através de uma rede complexa que envolve várias moléculas de superfície celular e intracelulares, que podem controlar a maturação celular, a regulação da proliferação celular, sobrevivência ou apoptose e diferenciação celular (FORTUNEL et al., 2003).

O TGF- β é uma citocina multifuncional, que desempenha um papel na regulação do reparo tecidual e regeneração (BRANTON e KOPP, 1999); também desempenha um papel importante no reparo tardio da resposta inflamatória, inibindo a ativação das células inflamatórias, que precede a organização do tecido de granuloma (WONG et al., 1991). TGF- β desempenha papel central nos estágios tardio e estimulando a formação de granuloma, angiogênese e fibrose (ROBERTS et al., 1986; BRANTON e KOPP, 1999).

Avaliamos a produção de TGF- β pelos macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ infectados ou não com o fungo *S. schenckii* e ao contrário do que observamos para a maioria dos outros mediadores, as células dos animais C3H/HeJ infectados produziram maiores quantidades de TGF- β do que as células dos animais C3H/HePas nas mesmas condições. Entre os animais C3H/HeJ infectados (Figura 12D) verificou-se a produção de TGF- β pelos macrófagos peritoneais estimulados com o ExoAg durante todo o período estudado, entretanto com níveis muito baixos na sexta semana de infecção. Os antígenos lipídicos estimularam concentrações muito maiores desta citocina durante as dez semanas de infecção, quando comparados com o ExoAg. Observou-se que quando as células foram tratadas com o LeL ou LeM as menores concentrações de TGF- β ocorreram entre a quarta e sexta semanas. Estes resultados de produção de TGF- β nas culturas celulares sugerem que o TLR4 não esteja envolvido na produção desta citocina nos macrófagos peritoneais, uma vez que os camundongos defectivos neste receptor foram capazes de produzir elevadas concentrações desta citocina.

No entanto, a participação do TGF- β nas infecções fúngicas é ainda pouco documentada e um pouco controversa, quando comparado a respostas imunes sistêmicas descritas para infecções envolvendo protozoários e micobactérias (REED, 1999). Figueiredo et al. (2004) demonstraram que o TGF- β juntamente com IL-1 β auxilia a aderência das células leveduriformes do *S. schenckii* às células endoteliais. O TGF- β participa na desativação dos macrófagos, principalmente dos mecanismos oxidativos dos macrófagos, facilitando assim a sobrevivência do patógeno e promovendo a persistência da infecção (TSUNAWAKI et al., 1988; DING et al., 1990).

Existem poucos trabalhos relacionando a produção de TGF- β com os TLRs. Sabe-se que a interação dos TLRs com seus ligantes leva à ativação do NF- κ B e conseqüentemente à liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α . Naiki et al. (2005) demonstraram em macrófagos RAW264.7 que a estimulação com LPS (agonista do TLR4) leva à ativação do NF- κ B e produção de TNF- α , e que o tratamento simultâneo destas culturas com LPS e TGF- β leva a inibição desta ativação do NF- κ B e da conseqüente produção de TNF- α , sugerindo que o efeito do TGF- β pode resultar, ao menos em parte, na supressão da ativação no NF- κ B. Nossos resultados estão de acordo com este uma vez que a produção de TGF- β foi observada nos camundongos C3H/HeJ infectados e neste mesmo grupo de animais observou-se uma baixa produção de TNF- α .

De modo surpreendente, observamos maiores concentrações de TGF- β nos soros dos camundongos C3H/HePas do que aquelas observadas nos camundongos C3H/HeJ. Isso pode ser devido à produção deste mediador por outras células do sistema imune, como os linfócitos T. Pelos nossos resultados torna-se evidente que diferentes células do sistema

imune possam ter outros mecanismos acessórios, inclusive outros TLRs, que participam na resposta dos camundongos C3H/HePas, que devem ser pesquisadas futuramente. Sugerindo que o TLR4 pode não mediar a produção desta citocina nos macrófagos, mas que pode ter papel diferente em outras células.

Estudos realizados com camundongos sugeriram um papel para o TGF- β na resposta protetora contra *C. albicans*, como demonstrado pelo aumento da produção TGF- β por animais resistentes infectados (SPACCAPELO et al., 1995). Entretanto, a produção local desta citocina foi demonstrada em granulomas do fígado de pacientes humanos acometidos de candidíase (LETTERIO et al., 2001).

Figueiredo et al. (2007) sugeriram que o TGF- β no local da infecção atua facilitando a disseminação do patógeno, por ter um efeito direto na interação do *S. schenckii* com a matriz sub-endotelial, o que pode interferir com a probabilidade das células leveduriformes interagirem com as células do hospedeiro. Outros estudos sugerem que a expressão aumentada de TGF- β em granulomas de infecção fúngica (SPACCAPELO et al., 1995; LETTERIO et al., 2001; NISHIKAKU e BURGER, 2003) poderia favorecer a permanência do microorganismo nas células do hospedeiro, inibindo a resposta imune, como já descrito para outros patógenos (REED, 1999). Entretanto, Figueiredo et al. (2007) reforçam uma outra possibilidade da contribuição desta citocina, pela estimulação da associação de um fungo patogênico, como o *S. schenckii*, com o tecido do hospedeiro.

Os macrófagos completamente diferenciados, após recrutamento dos monócitos aos locais de inflamação, têm sua capacidade de sintetizar citocinas aumentada. A produção de citocinas por uma população celular pode não corresponder realmente à expressão em nível celular, uma vez que a atividade biológica dos monócitos pode ser modificada após o recrutamento destas células aos locais de inflamação (PRUSSIN e METCALFE, 1995; GMYREK et al., 2008).

Existem vários ensaios para detecção de citocinas incluindo ELISA, PCR (polimerase chain reaction), Taqman real time PCR e imunohistoquímica (JASON e LARNED 1997; PALA et al., 2000; WHITESIDE, 2002). O ELISA é o método mais comumente empregado, entretanto a rápida incorporação pelas células vizinhas requer que as amostras sejam coletadas e processadas em tempo adequado para levar em conta a cinética de absorção de citocinas (DURAMAD et al., 2004).

Uma limitação dos ELISAs é sua incapacidade de identificar a célula produtora da citocina liberada no soro ou plasma (PALA et al., 2000). O método de detecção de citocinas intracelulares em células específicas pela citometria de fluxo evita estas limitações (PRUSSIN, 1997) e tem grande potencial para monitorar a função do sistema imune nas populações celulares (BURCHIEL et al., 1999). A detecção das citocinas intracelulares é um

ensaio funcional que avalia a capacidade de células específicas a expressar citocinas após a estimulação com mitógenos (JUNG et al., 1993; PRUSSIN, 1997).

A marcação de citocinas intracelulares tem sido muito usada para caracterizar a resposta imune em estados normais e patológicos. Entretanto, a marcação de citocinas intracelulares pode ser relativamente pouco sensível, mesmo após usar monensina ou brefeldina A para que as citocinas fiquem acumuladas no interior da célula (PALA et al., 2000).

Neste trabalho também avaliamos as citocinas intracelulares nos macrófagos peritoneais e realmente observamos que o perfil destas citocinas durante as dez semanas difere bastante daquele observado quando a concentração das citocinas foi determinada nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais por ELISA.

Na detecção das citocinas intracelulares observamos que todas as citocinas testadas estavam em maiores concentrações nas células dos camundongos C3H/HePas, diferente do que foi observado na produção de IL-12p70 e TGF- β nos sobrenadantes das culturas celulares. No entanto, esta diferença na produção de citocinas entre as duas linhagens de camundongos parece ser devida às diferenças na metodologia empregada para cada ensaio. Para a dosagem das citocinas produzidas e liberadas nos sobrenadantes das culturas de macrófagos, estas células foram cultivadas em presença dos antígenos do fungo *S. schenckii* ou o LPS por 24h. Para a determinação das mesmas citocinas intracelulares pela técnica de citometria de fluxo, os macrófagos foram estimulados por 6h apenas e estimulados com PMA e ionomicina. Esta diferença no tempo de cultura frente aos estímulos pode justificar a menor concentração de IL-12 e TGF- β observadas intracelularmente.

As citocinas intracelulares são facilmente detectadas em células ativadas pelo PMA em até 4h de cultura. Collins (2000) demonstrou que há diferenças na detecção das citocinas secretadas e na determinação intracelular. As culturas com poucas células expressando citocinas intracelulares algumas vezes tem níveis de citocinas secretados igual ou maiores que as culturas com grande número de células expressando citocinas intracelulares, como foi observado nos nossos resultados para IL-12 e TGF- β . Estas diferenças podem ser devidas às variações naturais de cada célula ou aos níveis de ativação. Estas observações ancoram a importância de medir e avaliar tanto a expressão de citocinas intracelulares e correlacionar com as secretadas (COLLINS, 2000).

Pala et al. (2000) relataram que as citocinas derivadas de células Th2 podem ser difíceis de detectar pela metodologia de marcação das citocinas intracelulares, e estão presentes apenas após a estimulação em uma minoria de células. Ao contrário do TNF- α e IFN- γ que podem estar presentes em proporções muito altas de células, por um período maior de tempo após a estimulação e são marcados mais fortemente.

De fato, os resultados apresentados neste trabalho para a detecção das citocinas intracelulares demonstram perfis diferentes daqueles obtidos nos sobrenadantes das culturas de macrófagos pelo teste imunoenzimático durante as dez semanas de infecção. No entanto, pôde ser observado que também na metodologia das citocinas intracelulares houve maior detecção das citocinas nos camundongos C3H/HePas do que nos C3H/HeJ, reforçando as evidências da participação do TLR4 no reconhecimento do *S. schenckii* e na indução da resposta imune durante a infecção por este agente. Porém, deve-se ressaltar que os resultados de IL-12 e TGF- β intracelulares não foram observados em maiores níveis nos camundongos C3H/HeJ como nos ensaios imunoenzimáticos. Esta diferença pode estar relacionada às diferenças nos antígenos utilizados como estímulos em cada teste.

O fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) é um fator de transcrição envolvido primariamente na regulação da transcrição de vários genes que codificam citocinas importantes para a resposta imune e inflamatória (BARNES e ADCOCK, 1997). O NF- κ B se liga à região promotora de genes codificadores de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e IL-6. Além disso, o NF- κ B contribui na regulação transcricional destas citocinas. Agentes indutores como o LPS, TNF- α , IL-1 β e ésteres de forbol ativam o NF- κ B por sinalizar a degradação do I κ Ba, um inibidor citosólico do NF- κ B, permitindo assim a translocação do NF- κ B para o núcleo. Uma vez intranuclear, o NF- κ B ativa a transcrição de genes alvos. Alguns estudos mostraram que em macrófagos peritoneais a atividade do NF- κ B foi reduzida no grupo estimulado por corticosterona, sugerindo que os glicocorticóides induzem imunossupressão através da redução na regulação da atividade do NF- κ B (BALDWIN, 1996; SCHEINMAN et al., 1995, WISSINK et al., 1998).

O NF- κ B é uma molécula dimérica e um total de cinco subunidades que formam estes dímeros foram identificados: RelA ou p65, RelB, c-Rel, NF- κ B1 ou p50, e NF- κ B2 ou p52. Os heterodímeros compostos das subunidades p50 (que se liga ao motivo cis- κ B) e p65 (que é necessário para a ativação da expressão de genes) são os mais comuns (DELFINO e WALKER, 1999).

A ligação dos TLRs resulta na ativação do NF- κ B e na indução de citocinas e moléculas co-estimulatórias necessárias para a ativação da resposta imune adaptativa (MEDZHITOV et al., 1997; ZHANG et al., 1999). O TLR4 dos camundongos C3H/HeJ tem uma mutação pontual TLR4 no domínio extracelular que causa uma falha na ativação do NF- κ B (HOSHINO et al., 1999). Nossos resultados estão de acordo com este fato este, uma vez que foi observada uma menor concentração de NF- κ B nos extratos nucleares dos camundongos defectivos no TLR4 observada em nossos resultados (Figura 17). Além disso, o NF- κ B está envolvido na regulação da expressão de citocinas e outros mediadores que participam na resposta inflamatória (ABRAHAM, 2003). Assim, a menor expressão do NF- κ B

nos camundongos com expressão defectiva do TLR4 tem como conseqüência a menor produção destes mediadores inflamatórios, como observado em nossos resultados pela menor concentração de H₂O₂, NO, TNF- α e IL-10 pelas células dos camundongos deficientes no TLR4 (Figura 17B). Shoham et al. (2001) demonstraram que a translocação do NF- κ B dependente do TLR4 é ativada *in vitro* pelo principal componente capsular do *C. neoformans*, a glicuronoxilomanana.

Os ROI estão envolvidos na ativação do NF- κ B mediada pelo TLR4 e TLR2 (FRANTZ et al. 2001; ASEHNOUNE et al., 2004; PARK et al., 2004). Nossos resultados estão de acordo com este fato, uma vez que a maior ativação do “burst” oxidativo foi observada nos camundongos TLR4 normais, e também nesta linhagem de animais verificou-se maior concentração do NF- κ B no núcleo. Deste modo, a ligação ao TLR4 durante a esporotricose experimental leva à produção de H₂O₂, que por sua vez pode estar relacionada à translocação do NF- κ B ao núcleo e transcrição de outros mediadores importantes na resposta imune.

A indução da ativação do NF- κ B é reconhecida como um importante passo na seqüência de sinais iniciados na membrana dos macrófagos pela ligação dos TLRs. Nos macrófagos a ativação transcricional e a subsequente liberação de TNF- α requerem a ativação do NF- κ B (BAEUEERLE e BALTIMORE, 1996), como aconteceu nos nossos resultados, a maior produção de TNF- α foi observada nos camundongos TLR4 normais, que também demonstraram maior translocação do NF- κ B ao núcleo.

As células monocíticas são extremamente sensíveis ao LPS e respondem pela expressão de muitas citocinas inflamatórias. O LPS interage com as proteínas ligadoras de LPS (LPB) no plasma e entra em contato com a superfície celular através do receptor de superfície CD14. Em seguida, o LPS é transferido para o receptor transmembrana de sinalização, o TLR4 e sua proteína acessória, o MD-2 (GUHA e MACKMAN, 2001). O CD14 é um antígeno marcador da linhagem mielóide (GOYERT et al., 1986). A proteína madura é expressa na superfície das células mielóides via uma cauda glicosilfosfatidilinositol. O CD14 também é encontrado livre no plasma em concentrações variando de 2 a 6 μ g/mL (BAZIL e STROMINGER, 1991) e é chamado de CD14 solúvel (sCD14). O sCD14 medeia a ativação de células CD14-negativas pelo LPS. O papel da LPB e CD14 na ativação de macrófagos e monócitos pelos LPS foi demonstrado tanto bioquímica quanto geneticamente. Anticorpos anti-CD14 bloqueiam a ativação de macrófagos dependente de LPB pelo LPS, sugerindo que o CD14 seja o receptor para partículas opsonizadas por LPBs (WRIGHT et al., 1990).

Nossos resultados quanto à expressão de CD14 nas células dos camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ demonstram a presença desta proteína principalmente nas três primeiras semanas do estudo, tanto do grupo controle quando do grupo dos animais

infectados (Figura 18), no entanto a expressão foi maior nos animais infectados em relação aos não infectados, e também foi significativamente maior nos camundongos C3H/HePas. Este resultado pode sugerir que o processo infeccioso possa ter estimulado a expressão desta proteína.

Existem vários trabalhos com macrófagos demonstrando que a expressão de CD14 nestas células pode ser aumentada ou reduzida. Pala et al. (2000) relataram que a expressão de marcadores de superfície que podem estar reduzidos após a ativação, sendo o resultado observado não correspondente à real expressão dos receptores. Rogler et al. (1998) demonstraram que o CD14 está diminuído em macrófagos intestinais. Kamada et al. (2008) observaram pequeno número de células CD14⁺ no intestino, entretanto essas células CD14⁺ estão significativamente aumentadas em pacientes com doenças inflamatórias intestinais, especialmente aqueles com doença de Crohn, demonstrando seu papel nos processos inflamatórios. Outros trabalhos com macrófagos obtidos do fígado demonstraram que análise imunohistoquímica usando anticorpos monoclonais específicos para as células da linhagem monócito/macrófago revelou que estes monócitos e macrófagos hepáticos têm um perfil distinto um do outro. A expressão de CD14 está reduzida nos macrófagos hepáticos, quando comparadas com os monócitos (YAMAMOTO et al., 1995). Os macrófagos hepáticos em doenças hepáticas são ativados a expressar CD14 em graus variados e estão envolvidos na depuração de complexos protéicos LPS-LBP (TOMITA et al., 1994). Em outro trabalho (ZIEGLER-HEITBROCK et al., 1993), foi demonstrado que os macrófagos alveolares também expressam baixos níveis de CD14.

A resposta ao LPS é mediada pela sua interação com o TLR4 juntamente com o MD-2, secretado e solúvel, ou o CD14 ligado à membrana e o sinal é transduzido via complexo de receptor de IL-1 para ativar o NF- κ B e a secreção de citocinas pró-inflamatórias (ZHANG et al., 1999; BOWIE e O'NEILL, 2000; JIANG et al., 2000; DA SILVA CORREIA et al., 2001). A proteína MD-2 é também uma proteína secretada, mas está associada à superfície celular quando expressa em linhagens celulares que expressam o TLR4, fisicamente associada ao domínio extracelular TLR4 (GUHA e MACKMAN, 2001). Posteriormente, Shimazu et al. (1999) demonstraram que a expressão de MD-2 aumenta a ativação do NF- κ B dependente do TLR4 em células HEK293 transfectadas. O complexo MD-2/TLR4 foi identificado na superfície de macrófagos peritoneais de camundongos (AKASHI et al., 2000), sugerindo que este complexo funcione como o receptor de sinalização do LPS na superfície dos monócitos.

O MD-2 pode se associar também com outros membros da família TLR e conferir a habilidade de responder a um amplo espectro de patógenos, inclusive bactérias Gram positivas e fungos (SHIMAZU et al., 1999). O perfil de expressão dos TLRs em cada célula é modulado por produtos microbianos, como o LPS, e por mediadores inflamatórios, como TNF- α e IL-1 β , indicando que a expressão dos TLR individuais pode ser alterada durante o

curso da infecção, talvez influenciando o resultado da resposta imune (KAWAI e AKIRA, 2005; TAKEDA e AKIRA, 2005).

Nossos resultados quanto à expressão de MD-2 mostraram valores muito baixos e também não mostraram diferenças significativas entre as duas linhagens de camundongos estudadas. Porém pode haver algum fator que influencie a expressão dessa proteína, seja positiva ou negativamente, como observado para outras linhagens celulares.

Abreu et al. (2001) observaram que as células do epitélio intestinal expressam baixos níveis de TLR4 e MD-2, isso porque o epitélio intestinal deve permanecer imunologicamente sem resposta aos microorganismos da microbiota e ao LPS. Pouco se sabe sobre a regulação da expressão do TLR4 ou MD-2. Em um estudo posterior, Abreu et al. (2002) demonstraram que a expressão do MD-2 e atividade transcricional são positivamente reguladas pelos interferons, principalmente o IFN- γ , enquanto que a expressão do TLR4 é regulada pelo IFN- α , sugerindo que a exposição coordenada das células do epitélio intestinal a citocinas específicas pode ser importante na geração de complexos TLR4/MD-2 funcionais.

Macrófagos intestinais também são hiporresponsivos a substâncias estranhas, especialmente o LPS, e apresentam menor expressão de CD14 e TLR4/MD-2, os receptores para o LPS. Entretanto, a expressão destas proteínas foi observada no citoplasma de macrófagos intestinais (NAKATA et al., 2007). Este mesmo grupo de pesquisadores observaram que estes macrófagos intestinais tratados com a IgA poderia restabelecer a resposta ao LPS, sugerindo que os macrófagos intestinais possuem uma plasticidade para responder sensivelmente a mudanças no meio extracelular.

Estudos genéticos e de deleção de genes demonstraram que a responsividade normal ao LPS *in vitro* requer a proteína acessória MD-2, uma pequena glicoproteína rica em resíduos de cisteína, que se liga ao TLR4 no retículo endoplasmático e então é carregado à superfície na forma de um complexo ativo TLR4/MD-2 (POLTORAK et al., 1998; SCHROMM et al., 2001; NAGAI et al., 2002). Fock et al. (2007) demonstraram que o estado nutricional dos camundongos influencia na expressão de TLR4/MD-2 e também de CD14. Os macrófagos dos animais mal-nutridos apresentaram menor expressão de CD14 e TLR4/MD-2 que o grupo controle, mesmo quando estimulados com o LPS. Outros estudos demonstraram que o LPS leva a uma redução nos níveis de TLR4 nos macrófagos peritoneais de camundongos e em regiões parenquimais e não parenquimais do cérebro (MUZIO et al., 2000; VISINTIN et al., 2001).

Töttemeyer et al. (2003) avaliaram a expressão do TLR2, TLR4 e MD-2 no baço e fígado de camundongos defectivos (C3H/HeJ) ou não (C3H/HeN) no TLR4, em resposta à infecção por *Salmonella* sorotipo *Typhimurium*. Foi observado que a expressão do mRNA de TLR2 é induzida em resposta à infecção pela *Salmonella* sorotipo *Typhimurium* em ambas

as linhagens de camundongos, mas a indução é muito menor e mais tardia nos camundongos C3H/HeJ. Ao contrário, a expressão do mRNA do TLR4 aumentou nos camundongos C3H/HeJ, mais do que nos C3H/HeN. Os níveis de mRNA do MD-2 aumentaram em ambas as linhagens de camundongos, sem diferenças entre elas, durante a infecção por *Salmonella* (TÖTEMEYER et al., 2003).

Em trabalho realizado por Maris et al. (2006) foi demonstrado que macrófagos alveolares de pacientes após a inalação de LPS têm uma redução nos níveis de mRNA que regulam a expressão das proteínas envolvidas na sinalização do LPS, especificamente de TLR4 e MD-2. O que também foi observado por outros experimentos realizados *in vitro* com macrófagos alveolares murinos, em que a estimulação com LPS levou a uma redução nos níveis de mRNA de TLR4 (DROEMANN et al., 2005).

A capacidade de responder apropriadamente aos patógenos é um evento importante para a sobrevivência, e os TLRs são o primeiro ponto de contato que se tem com os organismos invasores. Assim, os mecanismos que regulam a resposta devem ser rigorosamente controlados, primeiro para responder apropriadamente ao patógeno e depois para prevenir a ativação excessiva da sinalização pelo TLR e controlar os danos deletérios para o hospedeiro que seguem a ativação pelo TLR. Estes mecanismos que regulam a sinalização pelos TLR foram revelados e incluem a degradação de proteínas, seqüestro e compartimentalização (MIGGIN e O'NEILL, 2006). As citocinas anti-inflamatórias também tem a capacidade de regular a expressão do TLR, como por exemplo o TGF- β que inibe a expressão do TLR4 (MCCARTNEY-FRANCIS et al., 2004).

As infecções produzem diversas respostas no hospedeiro que incluem a ativação do sistema imune, inflamação e morte celular (LOBBE e SALEH, 2008). As condições que causam a morte apoptótica da célula estão associadas à supressão da inflamação ou da imunidade mediada por células (VOLL et al., 1997). A apoptose das células é importante no desenvolvimento e homeostasia de organismos multicelulares (VAUX, 1993). É considerada um mecanismo fisiológico rigorosamente controlado para a eliminação de células nocivas, lesionadas ou desnecessárias, sem causar uma resposta inflamatória ou danos teciduais (VAUX, 1993; VAUX et al., 1994; SAVILL et al., 1993). A ausência de uma resposta inflamatória durante a apoptose tem sido atribuída à rápida fagocitose das células antes de sua lise, assim prevenindo a liberação do conteúdo nocivo que poderia levar à inflamação ou dano tecidual (SAVILL et al., 1993).

Durante a apoptose as células são reconhecidas e fagocitadas por macrófagos. Nos estágios iniciais da apoptose ocorrem mudanças na superfície celular. Uma destas alterações é a translocação da fosfatidilserina do interior da membrana plasmática para o exterior. A anexina V é uma proteína ligadora de fosfolípides dependente de cálcio que tem alta afinidade pela fosfatidilserina (FADOK et al., 1992). Por este motivo a anexina V pode

ser usada como um marcador para a exposição da fosfatidilserina na superfície celular. A translocação da fosfatidilserina não ocorre somente na apoptose, mas também durante a necrose. Por esta razão uma marcação adicional com o iodeto de propídeo (PI), um corante nuclear para o qual as células vivas e em apoptose são impermeáveis, é necessário para se distinguir as células em apoptose e em necrose (VAN OOSTVELDT et al., 1999). As células necróticas (pós-apoptóticas) coram-se pelo iodeto de propídeo como consequência de danos na membrana citoplasmática. As células necróticas também se coram com a anexina V juntamente com o corante vital, indicando que a ligação da anexina V é resultado de danos na membrana (FINK et al., 2005).

Os resultados aqui apresentados demonstraram que os camundongos C3H/HePas tem predomínio das células em apoptose nas semanas iniciais do estudo (Figura 20B), diferente do que foi observado entre os camundongos C3H/HeJ, onde se verificou que houve predomínio das células em necrose (duplamente marcadas com Anexina V e PI – Figura 20D).

As duas principais vias de sinalização de apoptose foram bem definidas. Uma é a via mitocondrial de morte e outra é a sinalização de apoptose mediada por receptores, como Fas e TRAIL (“Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand”). Na via de morte celular mitocondrial, danos oxidativos estimulam a mitocôndria a liberar citocromo C no citosol, que está associado à ativação da apoptose mediada pela caspase-3. Os ROI estão envolvidos na indução da permeabilidade da mitocôndria e liberação dos fatores amplificadores de morte, ativação de caspases intracelulares e danos ao DNA. É possível que uma maior expressão dos TLRs resulte na produção de ROI que estimulam a via apoptótica mitocondrial. De fato, a observação de maior percentual de apoptose nos camundongos C3H/HePas pode estar relacionada à maior produção de H_2O_2 pelas células destes animais, uma vez que nos C3H/HeJ observou-se menor concentração de H_2O_2 e também menor percentual de células em apoptose.

A indução de apoptose das células do hospedeiro tem sido demonstrada em vários casos de infecções bacterianas, virais e parasitárias, e tem importantes consequências na patogênese (WEINRAUCH e ZYCHLINSKY, 1999; HAY e KANNOURAKIS, 2002; JAMES e GREEN, 2004).

A apoptose é um regulador importante da especificidade do sistema imune (WEINRAUCH e ZYCHLINSKY, 1999; COHEN et al., 1992). Há vários relatos de que a inibição da apoptose pode influenciar o resultado da infecção por patógenos intra- ou extracelulares e/ou modular a resposta inflamatória (WEINRAUCH e ZYCHLINSKY, 1995; HOTCHKISS et al., 2000; CARRERO et al., 2004). Os patógenos podem ativar a apoptose das células imunocompetentes para evitar seu reconhecimento por estas células (WEINRAUCH e ZYCHLINSKY, 1999). Alguns trabalhos também observaram que o $TNF-\alpha$

é um fator importante para a ativação da apoptose (BEG et al., 1996; HU et al., 1999). Bohler et al. (2000) também mostraram que a presença de TNF- α e IL-1 β aumenta o percentual de apoptose em células mesangiais de ratos. Estas duas citocinas estão relacionadas à indução da síntese de ROI (RADEKE et al., 1990), sugerindo que o H₂O₂ também esteja envolvido na via de apoptose mediada pelo TNF- α e IL-1 β nas células mesangiais. Em nossos resultados também podemos correlacionar o maior percentual de apoptose nos macrófagos dos camundongos não defectivos no TLR4 com o maior nível de expressão de H₂O₂, NO, TNF- α e IL-1 β observados nas células destes animais.

A apoptose também foi relacionada entre os mecanismos imunológicos que podem modular o curso da infecção pelo fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum*. Albina et al. (1993) demonstraram que o NO também está envolvido na indução de apoptose de várias células, inclusive de macrófagos. Wu-Hsieh et al. (1998) observaram que a iNOS é induzida em macrófagos esplênicos durante a infecção ativa pelo fungo *H. capsulatum* e está relacionada à apoptose das células esplênicas. Quando se inibiu a produção de NO houve uma redução no percentual de células apoptóticas dos animais infectados. Wu-Hshieh et al. (1998) relacionaram este resultado com a redução do número de células e recuperação do processo inflamatório após a infecção.

No entanto, outros pesquisadores (MEDEIROS et al., 2002) relacionaram a apoptose das células do hospedeiro infectado com *H. capsulatum* à maior suscetibilidade à infecção, uma vez que a indução da apoptoses dos neutrófilos e células monocleares do sangue periférico pode representar um mecanismo de escape para o fungo, por retardar a morte celular e permitir a sobrevivência do fungo dentro destes leucócitos. Resultados semelhantes foram observados por Allen e Deepe (2005) quando avaliaram a apoptose nos pulmões de camundongos infectados com *H. capsulatum*, e estes pesquisadores relacionaram a apoptose à presença de TNF- α .

Outras infecções fúngicas também parecem induzir apoptose das células do sistema imune. *C. albicans* induz apoptose de neutrófilos (ROTSTEIN et al., 2000) e o *C. neoformans* induz apoptose nas células inflamatórias de granulomas de ratos com meningite criptocócica (GOLDMAN et al., 1996; CHIAPELLO et al., 2003).

Na sinalização de apoptose através dos receptores relacionados à morte, alguns ligantes (como Fas ou CD95 e TNF- α) ligam-se aos seus receptores cognatos, resultando na formação do complexo de sinalização de morte e levando à ativação de caspase-8 e caspase-3, induzindo a apoptose (CLERK et al., 2003). Nossos resultados são concordantes com este, uma vez que a maior produção de TNF- α (Figura 6B) pelas células dos camundongos C3H/HePas coincide com a posterior indução da apoptose observada nas células destes animais (Figura 20B).

Alguns estudos sugeriram que a estimulação dos TLRs pode resultar em apoptose pela ativação da sinalização pró-apoptótica (ALIPRANTIS et al., 2000; LOPEZ et al., 2003; INTO et al., 2004). INTO et al., (2004) observaram que a estimulação do TLR2 e TLR6 com lipoproteínas bacterianas induzem a morte celular através da apoptose (INTO et al., 2004). Belocchio et al. (2004) demonstraram que os TLRs participam da indução da apoptose e necrose de células polimorfonucleares em resposta à exposição a conídios ou hifas de *A. fumigatus*. De forma muito interessante, eles observaram que a apoptose estava significativamente aumentada após a exposição às hifas de *A. fumigatus* enquanto que após o contato com os conídios observou-se predomínio das células em necrose. Efeitos diferentes também foram demonstrados com diferentes ligantes dos TLRs, a necrose foi mais pronunciada pelo zimosan (conhecido por ser ligante do TLR2) e não foi afetada pelo LPS, enquanto que apoptose foi bastante aumentada pelo lipídio A do LPS (que é reconhecido pelo TLR4) (BELOCCHIO et al., 2004). Deste modo, como supomos que o LeL possua alguma semelhança ao LPS, especialmente ao lipídio A que é reconhecido como PAMP do LPS, em relação ao seu reconhecimento pelo TLR4, este mesmo antígeno que está presente nas células leveduriformes do *S. schenckii* durante a infecção pode estar relacionado à apoptose das células que foi observada principalmente nos camundongos normais no TLR4.

A sinalização mediada pelo TLR4 também desempenha um papel dominante na apoptose estimulada pela bactéria *Yersinia enterocolitica* em macrófagos, uma vez que foi observada apoptose nas células dos camundongos controle e não dos defectivos em TLR4 (HAASE et al., 2003). Entretanto, o mecanismo preciso pelo qual o TLR medeia a apoptose na yersiniose ainda não foi completamente elucidado.

Fan et al. (2005) demonstraram que a expressão do TLR2 ou TLR4 em células de ovários de hamster (CHO) resulta em células mais suscetíveis à apoptose, induzida pela privação de soro no meio de cultura. Entretanto, houve também um aumento na expressão de fatores anti-apoptóticos induzidos pela translocação do NF- κ B ao núcleo, como o Bcl2, que previne a liberação do citocromo c da mitocôndria. Assim, a apoptose das células resulta do balanço entre efeitos anti-apoptóticos e fatores pró-apoptóticos, e tanto a sinalização através dos receptores relacionados à morte quanto à via mediada pela mitocôndria parecem estar envolvidos.

A via de sinalização mediada pelo TLR ativa principalmente o NF- κ B (ADEREM e ULEVITCH, 2000; ZHANG e GHOSH, 2001) que desempenha importante papel anti-apoptótico na célula. Entretanto, existem evidências publicadas sobre um papel pró-apoptótico da ativação do NF- κ B (KUHNEL et al., 2000; PENG et al., 2006), uma vez que a ativação do NF- κ B leva à maior expressão de Fas e ligante de Fas (FasL) que é necessário

para a indução de apoptose (KUHNEL et al., 2000; LU et al., 2002; PENG et al., 2006).

Vários patógenos tem sido descritos como ativadores de apoptose através de diferentes mecanismos que incluem a produção de toxinas bacterianas ou expressão de fatores de virulência que interagem diretamente com componentes importantes da maquinaria celular de morte (WEINRAUCH e ZYCHLINSKY, 1999). Outros patógenos modulam a apoptose por interferir nas vias de sobrevivência mediadas pelo NF- κ B e/ou MAPK (Proteínas quinases ativadas por mitógenos), que são ativadas pelo PRR, e são responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios bem como de proteínas de sobrevivência, como Bcl-xl e c-IAP2 (proteína inibidora de apoptose).

Tanto a imunidade inata quanto a adquirida são essencialmente necessárias para o desenvolvimento de uma ótima resistência aos fungos patogênicos (ROMANI e KAUFMANN, 1998). Alguns dos polímeros fúngicos que ativam a resposta inflamatória foram identificados e incluem β -1,3/ β -1,6 glucanas, glicuronoxilomanana, fosfolipomananas e galactomananas (LEVITZ, 2004). As β -glucanas constituem um dos componentes estruturais da parede celular fúngica que têm propriedades imunoestimulatórias bem caracterizadas (BROWN e GORDON, 2001). Sabe-se que o *S. schenckii* estimula os macrófagos a produzirem citocinas e que a interação das leveduras com os macrófagos se dá através da parede celular. Os antígenos do *S. schenckii* são compostos principalmente de glicoproteínas com um alto grau de glicosilação, especialmente com manose, ramnose e galactose (TAKATA e ISHIZAKI, 1983). Nos macrófagos existem outros receptores que podem estar envolvidos no reconhecimento destes polissacarídeos como os receptores de manose (YAMAMOTO et al., 1997), receptores de β -glucanas (BROWN et al., 2002) e receptores de complemento 3 (FORSYTH e MATHEWS, 1996).

Outros estudos demonstraram que o TLR4 não é necessário para a resposta dos macrófagos ao *Coccidioides posadasii* (VIRIYAKOSOL et al., 2005). Estes pesquisadores demonstraram que macrófagos peritoneais dos camundongos C3H/HeJ respondem fracamente as concentrações de LPS até 100 μ g/mL, como esperado. Ao contrário, as células dos C3H/HeJ responderam normalmente a *C. albicans*. Utilizando-se *C. posadasii* inativados por formalina houve produção de TNF- α pelos macrófagos dos C3H/HeJ tanto quanto pelo grupo controle, C3H/OuJ – TLR4 competente. O mesmo resultado foi obtido quando os sobrenadantes foram testados para IL-6 (VIRIYAKOSOL et al., 2005).

Tanto o TLR2 quanto o TLR4 são ativados *in vitro* pelo *C. neoformans*, *C. albicans* e *A. fumigatus*, no entanto, é provável que a deficiência de um destes receptores possa ser parcial ou completamente compensada em modelos animais de infecção, permitindo a redundância de mecanismos de sinalização induzida pelas células fúngicas vivas (HOHL et al., 2006).

Netea et al. (2004) demonstraram que o reconhecimento dos antígenos de parede celular da *C. albicans* envolve tanto o TLR2 quanto o TLR4, e a ausência dos sinais gerados pelo TLR4 aumenta a suscetibilidade à candidíase disseminada (NETEA et al., 2002). No entanto, quais componentes da parede celular estimulam a resposta pelo TLR2 e TLR4 continuam a ser elucidados, mas há indicações de que o componente manana seja reconhecido pelo TLR4 (TADA et al., 2002).

Nossos resultados também sugerem um papel importante para o TLR4 no reconhecimento e indução da resposta imune durante a esporotricose experimental murina. No entanto, nossos resultados sugerem que a porção lipídica da parede celular do *S. schenckii* seja reconhecida pelo TLR4. A expressão do LeL e LeM na parede celular do *S. schenckii* na fase leveduriforme e miceliar, respectivamente, e o reconhecimento pelo TLR4 (observado pela maior produção de H₂O₂, NO, TNF- α e IL-10 nos camundongos TLR4 normais) indicam estes antígenos como candidatos a serem membros da família de PAMPs do *S. schenckii*.

Para a grande maioria dos mediadores aqui avaliados nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais, os valores de produção de cada um deles sempre foram maior nos camundongos C3H/HePas, exceto para a IL-12p70 e o TGF- β , para o qual as células dos animais C3H/HeJ, infectados ou não, produziram maiores quantidades que as células dos animais C3H/HePas nas mesmas condições. Outro dado relevante encontrado em nossos resultados é que dentre os antígenos testados, os antígenos lipídicos extraídos da parede celular do fungo, tanto em sua forma miceliar quanto na forma de levedura, foram mais eficazes em induzir uma resposta do que o exoantígeno, que é um antígeno liberado pelo fungo no meio extracelular. De um modo geral, o extrato lipídico da fase leveduriforme teve mais sucesso em induzir resposta imune quando avaliamos a produção de NO, IL-1 β , TNF- α , IL-12p70, IL-10 e TGF- β . Porém, quando avaliamos a ativação do “burst” oxidativo, observamos que houve maior produção de H₂O₂ quando as células foram estimuladas com o extrato lipídico da fase miceliar, como já citado anteriormente.

Quando avaliamos a produção destas citocinas no compartimento intracelular observamos um perfil diferente daquele detectado nos sobrenadantes das culturas celulares. Realmente, como relatado por Pala et al. (2000) nem sempre houve uma correlação entre estes resultados. No entanto, pôde-se observar nestes experimentos que a produção de citocinas também foi maior nos camundongos C3H/HePas no que nos C3H/HeJ, reforçando assim o envolvimento do TLR4 no reconhecimento e ativação da resposta imune contra o fungo *S. schenckii*.

Condizente com estes resultados observamos também uma maior concentração do NF- κ B nos extratos nucleares dos camundongos TLR4 normais em relação aos C3H/HeJ

(defectivos no TLR4), uma vez que este é o principal fator de transcrição que medeia a expressão das citocinas e a maior produção de citocinas foi observada nos camundongos C3H/HePas.

A expressão das proteínas acessórias ao TLR4, CD14 e MD-2, foi também maior nos camundongos C3H/HePas, como esperado. No entanto não podemos descartar a possibilidade das formas solúveis destas proteínas também participarem na estimulação do TLR4.

Os resultados aqui apresentados sugerem que a linhagem de camundongos C3H/HePas estudada neste trabalho apresenta um perfil de resposta ao *S. schenckii* semelhante ao modelo já estabelecido em nosso laboratório com camundongos Swiss, onde observamos uma depressão na resposta imune no período entre a quarta e a sexta semanas de infecção. Observação semelhante pode ser considerada em relação aos camundongos C3H/HeJ, porém esta menor produção dos mediadores imune parece que aconteceu um pouco mais tarde, entre a sexta e oitava semanas, além de ter acontecido também em menores concentrações da maioria dos mediadores aqui estudados.

A avaliação da apoptose nas células do exsudato peritoneal foi também maior nos camundongos C3H/HePas do que nos camundongos C3H/HeJ. Isso é coerente com a expressão dos RNI e citocinas pró-inflamatórias, que também foi maior nos camundongos C3H/HePas, e estão intimamente relacionadas à indução de apoptose. A indução de apoptose nas células de animais infectados pode ser induzida como um mecanismo de reduzir os danos causados pelo sistema imune do hospedeiro ao agente invasor, possibilitando assim a instalação e disseminação do agente infeccioso.

Enquanto muito progresso tem sido feito na elucidação de como os TLRs contribuem para a defesa do hospedeiro contra os fungos, muito ainda precisa ser compreendido. Além disso, existem dados publicados de apenas um pequeno número dos fungos patogênicos e alguns são conflitantes. As razões para estes resultados precisam ser estabelecidas. A resposta inflamatória vista nas infecções fúngicas pode ser uma “faca de dois gumes”: enquanto necessária para uma defesa efetiva do hospedeiro, uma resposta inflamatória exagerada ou mal direcionada pode levar a efeitos deletérios devido à destruição tecidual (LEVITZ, 2004).

Não devemos esquecer que a complexidade dos antígenos quando no microorganismo intacto pode induzir uma resposta diferente no organismo bem como pode haver uma redundância da imunidade inata. Quando um receptor é eliminado, outros receptores podem compensar. O fenótipo usado neste trabalho, com expressão defectiva do, sugere importante papel deste receptor no reconhecimento e indução de uma resposta imune durante a esporotricose, no entanto os dados não são suficientes para eliminarmos a contribuição de outros receptores nestas respostas.

7. Conclusões

1. O TLR4 participa no reconhecimento e na indução da resposta imune ao fungo *S. schenckii*
2. Entre os antígenos do fungo *S. schenckii* utilizados como estímulo nas culturas celulares, verificou-se que o exoantígeno estimula fracamente a produção dos mediadores imunológicos.
3. O extrato lipídico da fase miceliar foi mais eficaz em estimular a produção de H₂O₂, uma vez que a fase miceliar é a forma que penetra no organismo e o “burst” oxidativo é um dos primeiros mecanismos de defesa do organismo.
4. O extrato lipídico da fase leveduriforme foi mais eficaz em estimular a produção dos outros mediadores imunológicos (NO, IL-1, TNF- α , IL-12p70, IL-10 e TGF- β), uma vez que durante a infecção a forma de levedura é que está presente no organismo do hospedeiro.
5. Observou-se uma maior produção de H₂O₂, NO, TNF- α e IL-10 nos sobrenadantes das culturas celulares dos camundongos TLR4 normais, sugerindo assim a participação deste receptor no reconhecimento do *S. schenckii*.
6. A produção de IL- β , IL-12p70 e TGF- β pelas células dos camundongos deficientes em TLR4 sugere que este receptor não seja o responsável pela indução destas citocinas ou que haja mecanismos compensatórios para estes mediadores.
7. A detecção das citocinas intracelulares mostrou que tanto as citocinas IL-1, TNF- α e IL-10 quanto IL-12p70 e TGF- β são induzidas em maiores quantidades nas células dos camundongos TLR4 normais, reforçando ainda mais o envolvimento destes receptores na esporotricose.
8. A translocação do fator de transcrição NF- κ B ao núcleo também foi condizente com a maior expressão de citocinas nos camundongos C3H/HePas e conseqüentemente com a participação do TLR4 no reconhecimento do *S. schenckii*.
9. A expressão das proteínas acessórias ao TLR4 (MD2 e CD14) foi apenas um pouco maior nos camundongos TLR4 competente, entretanto foi suficiente para gerar resposta imune de magnitudes bem diferentes entre as duas linhagens.
10. A presença de células em apoptose também foi maior nos camundongos TLR4 competente, uma vez que a apoptose pode ser induzida pelo H₂O₂, NO e TNF- α e estes foram produzidos em maiores concentrações neste grupo de animais.

8. Referências

- ABEL, B.; THIEBLEMONT, N.; QUESNIAUX, V.J.; BROWN, N.; MPAGI, J.; MIYAKE, K.; BIHL, F.; RYFFEL, B. Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. **J. Immunol.**, v. 169, p. 3155–3162, 2002.
- ABRAHAM, E. Nuclear factor-kappaB and its role in sepsis-associated organ failure. **J. Infect. Dis.**, v. 187 Suppl 2, p. S364-S369, 2003.
- ABREU, M.T.; ARNOLD, E.T.; THOMAS, L.S.; GONSKY, R.; ZHOU, Y.; HU, B.; ARDITI, M. TLR4 and MD-2 Expression Is Regulated by Immune-mediated Signals in Human Intestinal Epithelial Cells. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 23, p. 20431–20437, 2002.
- ABREU, M.T.; VORA, P.; FAURE, E.; THOMAS, L.S.; ARNOLD, E.T.; ARDITI, M. Decreased Expression of Toll-Like Receptor-4 and MD-2 Correlates with Intestinal Epithelial Cell Protection Against Dysregulated Proinflammatory Gene Expression in Response to Bacterial Lipopolysaccharide. **J. Immunol.**, v. 167, p. 1609–1617, 2001.
- ADAMS, D.O.; HAMILTON, T.A. The cell biology of macrophage activation. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 283-318, 1984.
- ADEREM, A.; ULEVITCH, R.J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v.406, p. 782–787, 2000.
- ADLER, V.; YIN, Z.; TEW, K. D.; RONAI, Z. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. **Oncogene**, v. 18, p. 6104-6111, 1999.
- AGARWAL, S.; GOPAL, K.; UMESH; KUMAR, B. Sporotrichosis in Uttarakhand (India): a report of nine cases. **Intern. J. Dermatol.**, v. 47, p. 367–371, 2008.
- AGGARWAL, S.; GHILARDI, N.; XIE, M.H.; DE SAUVAGE, F.J.; GURNEY, A.L. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. **J. Biol. Chem.**, v.278, p. 1910–1914, 2003.
- AKASHI, S.; OGATA, H.; KIRIKAE, F.; KIRIKAE, T.; KAWASAKI, K.; NISHIJIMA, M.; SHIMAZU, R.; NAGAI, Y.; FUKUDOME, K.; KIMOTO, M.; MIYAKE, K. Regulatory roles for CD14 and phosphatidylinositol in the signaling via Toll-like receptor 4-MD-2. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 268, p. 172-177, 2000a.
- AKASHI, S.; SHIMAZU, R.; OGATA, H.; NAGAI, Y.; TAKEDA, K.; KIMOTO, M.; MIYAKE, K. Cutting Edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the Toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. **J. Immunol.**, v. 164, p. 3471–3475, 2000b.

- AKIRA, S. Toll-like receptor signaling. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 40, p. 38105-38108, 2003.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nat. Immunol.** v. 2, p.675-680, 2001.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, p. 783–801, 2006.
- ALBINA, J. E.; CUI, S.; MATEO, R.B.; REICHNER, J.S. Nitric oxide mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. **J. Immunol.**, 150: 5080–5085, 1993.
- ALEXANDER, C.; RIETSCHER, E.T. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. **J. Endotoxin. Res.**, v. 7, n. 3, p. 167-202, 2001.
- ALIPRANTIS, A.O.; DIEZ-ROUX, G.; MULDER, L.C.; ZYCHLINSKY, A.; LANG, R.A. Do macrophages kill through apoptosis? **Immunol Today**, v. 17, n. 12, 573-576, 1996.
- ALIPRANTIS, A.O.; YANG, R.B.; MARK, M.R.; SUGGETT, S.; DEVAUX, B.; RADOLF, J.D.; KLIMPEL, G.R.; GODOWSKI, P.; ZYCHLINSKY, A. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. **Science**, v. 285, p. 736-739, 1999.
- ALIPRANTIS, A.O.; YANG, R.-B.; WEISS, D.S.; GODOWSKI, P.; ZYCHLINSKY, A. The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor- 2, **EMBO J.**, v. 19, p. 3325–3336, 2000.
- ALLEN, H.L.; DEEPE, G.S.Jr. Apoptosis modulates protective immunity to the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. **J. Clin. Invest.**, v. 115, p. 2875–2885, 2005.
- AL-RAMADI, B.K.; MEISSLER, J.J.JR.; HUANG, D.; EISENSTEIN, T.K. Immunosuppression induced by nitric oxide and its inhibition by interleukin-4. **Eur. J. Immunol.**, v. 22, p. 2249–2254, 1992.
- ALSINA, A.; RODRIGUEZ-DEL VALLE, N. Effects of divalent cations and functionally related substances on the yaste to myceluim transition in *Sporothrix schenckii*. **Saubouraudia: J. Med. Vet. Mycol.** v. 22, p. 1-5, 1984.
- AL-TAWFIQ, J.A.; WOOLS, K.K. Disseminated sporotrichosis and *Sporothrix schenckii* fungemia as the initial presentation of human immunodeficiency virus infection. **Clin. Infect. Dis.**, v. 26, n. 6, p.1403-1406, 1998.
- AMARANTES-MENDES, G.P.; GREEN, D.R. The regulation of apoptotic cell death. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, p. 1053-1061, 1999.
- ANDERSON, K.V. Toll signaling pathways in the innate immune response. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 12, p.13–19, 2000.

- ASEHNOUNE, K.; STRASSHEIM, D.; MITRA, S.; KIM, J.Y.; ABRAHAM, E. Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4- dependent activation of NF-kappa B, **J. Immunol.**, v. 172, p. 2522–2529, 2004.
- BABIOR, B.M. Oxygen dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts). **N. Engl. J. Med.**, v. 298, p. 659-668, 1978.
- BADWEY, J.A.; KARNOVSKY, M.L. Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 49, p. 695-726, 1980.
- BAEUERLE, P.A.; BALTIMORE D. NF-kB: ten years after. **Cell**, v. 87: 13-20, 1996.
- BALDWIN, A.S. The NF-kappa B, I kappa B proteins: new discoveries and insights. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 14, p. 649–683, 1996.
- BARNA, M.; KOMATSU, T.; REISS, C.S. Activation of type III nitric oxide synthase in astrocytes following a neurotropic viral infection. **Virology**, v. 15, p. 332-343, 1996.
- BARNES, P.J.; KARIN, M. Nuclear factor-kB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N. Engl. J. Med.** v. 336, p. 1066–1071, 1997.
- BARNES, P.J.; ADCOCK, I.M. NF-kappa B: a pivotal role in asthma and a new target for therapy. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.18, p.46–50, 1997.
- BARROS, M.B.; SCHUBACH ADE, O.; DO VALLE, A.C.; GUTIERREZ GALHARDO, M.C.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, T.M.; REIS, R.S.; WANKE, B.; MARZOCHI, K.B.; CONCEIÇÃO, M.J. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, n. 4, p. 529-535, 2004.
- BARROS, M.B.L.; SCHUBACH, A.O.; GALHARDO, M.C.; SCHUBACH, T.M.P.; REIS, R.S.; CONCEIÇÃO, M.J.; VALLE, A.C. Sporotrichosis with widespread cutaneous lesions-a report of 24 cases related to transmission by domestic cats in Rio de Janeiro, Brazil. **Int J Dermatol.**, v. 42, p. 677-681, 2003.
- BATTEN, M.; LI, J.; YI, S.; KLJAVIN, N.M.; DANILENKO, D.M.; LUCAS, S.; LEE, J.; DE SAUVAGE, F.J.; GHILARDI, N. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. **Nat. Immunol.**, v. 7, p. 929–936, 2006.
- BAZIL, V.; STROMINGER, J.L. Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes. **J. Immunol.**, v.147, p.1567-1574, 1991.
- BEG, A.A.; BALTIMORE, D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. **Science**, v. 274, p. 782–784, 1996.
- BELKNAP, B.S. Sporotrichosis. **Dermatologic Clinics**, v. 7, n. 2, p.193-202, 1989.

- BELLOCCHIO, S.; GAZIANO, R.; BOZZA, S.; ROSSI, G.; MONTAGNOLI, C.; PERRUCCIO, K.; CALVITTI, M.; PIZURRA, L.; ROMANI, L. Liposomal amphotericin B activates antifungal resistance with reduced toxicity by diverting Toll-like receptor signalling from TLR-2 to TLR-4. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 55, n. 2, p. 214-222, 2005.
- BELLOCCHIO, S.; MORETTI, S.; PERRUCCIO, K.; FALLARINO, F.; BOZZA, S.; MONTAGNOLI, C.; MOSCI, P.; LIPFORD, G.B.; PIZURRA, L.; ROMANI, L. TLRs Govern Neutrophil Activity in Aspergillosis. **J. Immunol.**, v. 173, p. 7406–7415, 2004.
- BETANCOURT, A.; TORRES-BAUZA, L.J; RODRIGUEZ DEL VALLE, N. Molecular and cellular events during the yeast to mycelium transition in *Sporothrix schenckii*. **Sauberáudia: J. Med. Vet. Mycol.**, v. 23, p. 207-218, 1985.
- BEUTLER, B. TNF, Immunity and Inflammatory Disease: Lessons of the Past Decade. **J. Invest. Med.**, v. 43, p. 227-235, 1995.
- BEUTLER, B.; CERAMI, A. Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. **Nature**, v. 320, n. 6063, p.584-588, 1986.
- BEUTLER, B.; JIANG, Z.; GEORGEL, P.; CROZAT, K.; CROKER, B.; RUTSCHMANN, S.; DU, X.; HOEBE, K. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 24, p.353-389, 2006.
- BEUTLER, B.A.; MILSARK, I.W.; CERAMI, A. Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo. **J. Immunol.**, v. 135, n. 6, p. 3972-3977, 1985.
- BEUTLER, E.; GELBART, T.; WEST, C. Synergy between TLR2 and TLR4: a safety mechanism. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 27, n. 4, p. 728-730, 2001.
- BIBLER, M.R.; LUBER, H.J.; GLUECK, H.I.; ESTES, S.A. Disseminated sporotrichosis in a patient with HIV infection after treatment for acquired factor VIII inhibitor. **JAMA**, v. 256, p. 3125-3126, 1986.
- BIONDO, C.; MIDIRI, A.; MESSINA, L.; TOMASELLO, F.; GARUFI, G.; CATANIA, M.R.; 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.**, v. 35, p. 870–878, 2005.
- BOCHUD, P.-Y.; BOCHUD, M.; TELENTI, A.; CALANDRA, T. Innate immunogenetics: a tool for exploring new frontiers of host defence. **Lancet Infect. Dis.**, v. 7, p. 531–542, 2007.
- BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M., DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 12, p. 64–76, 2000.

- BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Macrophage deactivation by interleukin 10. **J. Exp. Med.**, v. 174, p. 1549-1555, 1991.
- BÖHLER, T.; WAISER, J.; HEPBURN, H.; GAEDEKE, J.; LEHMANN, C.; HAMBACH, P.; BUDDE, K.; NEUMAYER, H.H. TNF-alpha and IL-1alpha induce apoptosis in subconfluent rat mesangial cells. Evidence for the involvement of hydrogen peroxide and lipid peroxidation as second messengers. **Cytokine**, v. 12, n. 7, p. 986-991, 2000.
- BOWIE, A.; O'NEIL, L.A. Oxidative stress and nuclear factor- κ B activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. **Biochem. Pharmacol.**, v. 59, p. 13-23, 2000.
- BOWIE, A.; O'NEILL, L.A. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. **J. Leukoc. Biol.**, v. 67, n. 4, p. 508-514, 2000.
- BRANTON, M.H.; KOPP, J.B. TGF-beta and fibrosis. **Microbes Infect.**, v. 1, n. 15, p. 1349-1365, 1999.
- BREDDT, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. **Neuron.**, v. 8, n. 1, p. 3-11, 1992.
- BROMBACHER, F.; KASTELEIN, R. A.; ALBER, G. Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. **Trends Immunol.**, v. 24, p. 207-212, 2003.
- BROWN, G.D.; TAYLOR, P.R.; REID, D.M.; WILLMENT, J.A.; WILLIAMS, D.L.; MARTINEZ-POMARES, L.; WONG, S.Y.C.; GORDON, S. Dectin-1 is a major β -glucan receptor on macrophages. **J. Exp. Med.**, v. 196, p. 407-412, 2002.
- BROWN, G.D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, p. 33-43, 2006.
- BROWN, G.D.; GORDON, S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. **Nature**, v. 413, p. 36-37, 2001.
- BRÜNE, B.; GÖTZ, C.; MESSMER, U.K.; SANDAU, K.; HIRVONEN, M.R.; LAPETINA, E.G. Superoxide formation and macrophage resistance to nitric oxide-mediated apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 7253-7258, 1997.
- BRÜNE, B.; VON KNETHEN, A.; SANDAU, K.B. Nitric oxide and its role in apoptosis. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 351, n. 3, p. 261-272, 1998.
- BURCHIEL, S.W.; LAUER, F.T.; GURULE, D.; MOUNHO, B.J.; SALAS, V.M. Uses and future applications of flow cytometry in immunotoxicity testing. **Methods**, v. 19, p. 28-35, 1999.

- BURNSM, K.; MARTINON, F.; ESSLINGER, C.; PAHL, H.; SCHNEIDER, P.; BODMER, J.L.; DI MARCO, F.; FRENCH, L.; TSCHOPP, J. MyD88, an adaptor protein involved in interleukin-1 signaling. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 12203–12209, 1998.
- CACERE, C.R.; ROMANO, C.C.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; DUARTE, A.J.S.; BENARD, G. The Role of Apoptosis in the Antigen-Specific T Cell Hyporesponsiveness of Paracoccidioidomycosis Patients. **Clinical Immunology**, v. 105, n. 2, p. 215–222, 2002.
- CAMMER, W.; BLOOM, B.R.; NORTON, W.T.; GORDON, S. Degradation of basic protein in myelin by neutral proteases secreted by stimulated macrophages: a possible mechanism of inflammatory demyelination. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 75, n. 3, p. 1554-1558, 1978.
- CARLOS, I. Z.; SGARBI, D. B.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C. S.; SILVA, C. L. Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the systemic form of the disease. **Mycopathologia**, v. 117, p.139-144, 1992.
- CARLOS, I.Z.; ZINI, M.M.; SGARBI, D.B.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C.S.; SILVA, C.L. Disturbances in the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor in disseminated murine sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 127, n. 3, p. 89-94, 1994.
- CARLOS, I.Z.; SGARBI, D.B.G.; PLACERES, M.C.P. Host organism defense by a peptide-polysaccharide extracted from the fungus *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia**, v. 144, p. 9–14, 1999.
- CARLOS, I.Z.; SGARBI, D.B.; SANTOS, G.C., PLACERES, M.C. *Sporothrix schenckii* lipid inhibits macrophage phagocytosis: involvement of nitric oxide and tumour necrosis factor- α . **Scand. J. Immunol.**, v. 7, n. 3, p. 214-220, 2003.
- CARNEIRO-SANTOS, P.; MARTINS-FILHO, O.; ALVES-OLIVEIRA, L.F.; SILVEIRA, M.A.S.; COURA-FILHO, P.; VIANA, I.R.C.; WILSON, R.A.; CORREA-OLIVEIRA, R. Apoptosis: A mechanism of immunoregulation during human schistosomiasis mansoni. **Parasite Immunol.**, v.22, p. 267–277, 2000.
- CARRADA-BRAVO, T. Esporotricosis infantil. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex., v. 45, p. 124-131, 1988.
- CARRERO, J.A.; CALDERON, B.; UNANUE, E.R. Type I interferon sensitizes lymphocytes to apoptosis and reduces resistance to listeria infection. **J. Exp. Med.**, v. 200, p. 535–540, 2004.
- CARVALHO, M. T.; CASTRO, A. P.; 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.**, v. 35, p. 655–659, 2002.

- CASTILLO, M.C.; TAPIA, F.J.; ARCINIEGAS, E. Ultrastructural localization of specific surface antigens in the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 28, n. 1, p. 91-94, 1990.
- CAULEY, L.K.; MURPHY, J.W. Response of congenitally athymic (nude) and phenotypically normal mice to *Cryptococcus neoformans* infection. **Infect. Immun.**, v. 23, n. 3, p. 644-645, 1979.
- CERUTTI, P.A. Prooxidant states and tumor promotion. **Science**, v. 227, n. 4685, p; 375-381, 1985.
- CHAN, S.H.; KOBAYASHI, M.; SANTOLI, D.; PERUSSIA, B.; TRINCHIERI, G. Mechanisms of IFN-gamma induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12). Role of transcription and mRNA stability in the synergistic interaction between NKSF and IL-2. **J Immunol.**, v.148 , n. 1, p. 92-98, 1992.
- CHAROENVIT, Y.; TAYLOR, R.L. Experimental sporotrichosis in Syrian hamsters. **Infect. Immun.**, v. 23, n. 2, p. 366-372, 1979.
- CHIAPELLO, L. S.; AOKI, M. P.; RUBINSTEIN, H. R.; MASI, D. T. Apoptosis induction by glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans*. **Med. Mycol.**, v. 41, p. 347-353, 2003.
- CHU, Z.L.; MCKINSEY, T.A.; LIU, L.; GENTRY, J.J.; MALIM, M.H.; BALLARD, D.W. Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kB control. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 10057–10062, 1997.
- CLEMENS, D.L. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. **Trends Microbiol.**, v. 4, p. 113-118, 1996.
- CLEMONS, K.V.; GRUNIG, G.; SOBEL, R.A.; MIRELS, L.F.; RENNICK, D.M.; STEVENS, D.A. Role of IL-10 in invasive aspergillosis: increased resistance of IL-10 gene knockout mice to lethal systemic aspergillosis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 122, n. 2, p. 186-191, 2000
- CLERK, A.; COLE, S.M.; CULLINGFORD, T.E.; HARRISON, J.G.; JORMAKKA, M.; VALKS, D.M. Regulation of cardiac myocyte cell death. **Pharmacol. Ther.**, v. 97, n. 3, p. 223-261, 2003.
- COHEN, J.J.; DUKE, R.C.; FADOK, V.A.; SELLINS, K.S. Apoptosis and programmed cell death in immunity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 10, p. 267–293, 1992.
- COLLINS, D.P. Cytokine and cytokine receptor expression as a biological indicator of immune activation: important considerations in the development of in vitro model systems. **J. Immunol. Methods**, v. 243, n. 1-2, p.125-145, 2000.

- COLON-COLON, W.; RODRIGUEZ-DELL VALLE. N. Studies on phase transitions in *Sporothrix schenckii*: Possible involvement of Protein kinase C. In: VADEN BOSSCHE, H.; ODDS, F.C.; KERRIGE, D. (Eds) **Dimorphic fungi in biology and medicine**. New York: Plenum Publishing Co, p. 225-239, 1993.
- CONTI DÍAZ, I.A. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. *Mycopathologia*, v. 108, n. 2, p. 113-116, 1989.
- CONTI-DÍAZ, I.A. Mycetoma and premycetomatous lesions in Uruguay. *Mycopathologia*, v. 72, n. 1, p. 59-64, 1980.
- CUNNINGHAM, K.M.; BULMER, G.S.; RHOADES, E.R. Phagocytosis and intracellular fate of *Sporothrix schenckii*. **J. Infect. Dis.**, v. 140, n. 5, p. 815-817, 1979.
- DA ROSA, A.C.; SCROFERNECKER, M.L.; VETTORATO, R; GERVINI, R.L.; VETTORATO, G.; WEBER, A. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 52, p. 451–459, 2005.
- DA SILVA CORREIA, J.; SOLDAU, K.; CHRISTEN, U.; TOBIAS, P.S.; ULEVITCH, R.J. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 24, p. 21129-21135, 2001.
- D'ANDREA, A.; ASTE-AMEZAGA, M.; VALIANTE, N.M.; MA, X.; KUBIN, M.; TRINCHIERI, G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. **J. Exp. Med.**, v. 178, n. 3, p. 1041-1048, 1993.
- DE ALBORNOZ, M.B.; DE CABRAL, N.A.; VILLANUEVA, E. Antigenic structure of *Sporothrix schenckii*. In: **Superficial, Cutaneous and subcutaneous infection. Pan American Health Organization**. Washington D.C.: Sc Publ No. 396, p. 296-299, 1980.
- DE ALBORNOZ, M.B.; MENDOZA, M.; DE TORRES, E.D. Growth temperatures of isolates of *Sporothrix schenckii* from disseminated and fixed cutaneous lesions of sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 95, n. 2, p. 81-83, 1986.
- DE WAAL MALEFYT, K.; ABRAMS, J.; BENNETT, B.; FIGDOR, C.G.; DE VRIES, J.E. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J. Exp. Med.**, v. 174, p.1209-1220, 1991.
- DEEPE, G.S. JR; GIBBONS, R.S. Protective and memory immunity to *Histoplasma capsulatum* in the absence of IL-10. **J. Immunol.**, v. 171, n. 10, p. 5353-5362, 2003.

- DELFINO, F.; WALKER, W.H. Hormonal regulation of the NF-kappaB signaling pathway **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 157 p. 1–9, 1999.
- DELUDE, R.L.; SAVEDRA, R.JR.; ZHAO, H.; THIERINGER, R.; YAMAMOTO, S.; FENTON, M.J.; GOLENBOCK, D.T. CD14 enhances cellular responses to endotoxin without imparting ligand-specific recognition. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, n. 20, p. 9288-9292, 1995.
- DENNING, D.W.; ARMSTRONG, R.W.; LEWIS, B.H.; STEVENS, D.A. Elevated cerebrospinal fluid pressures in patients with cryptococcal meningitis and acquired immunodeficiency syndrome. **Am. J. Med.**, v. 91, n. 3, p. 267-272, 1991.
- DESSING, M.C.; VAN DER SLUIJS, K.F.; FLORQUIN, S.; AKIRA, S.; VAN DER POLL, T. Toll-like receptor 2 does not contribute to host response during postinfluenza pneumococcal pneumonia. **Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol.**, v.36, p. 609-614, 2007.
- DINARELLO, C.A. Proinflammatory Cytokines. **Chest**. v.118, p. 503-508, 2000.
- DINARELLO, C.A., Interleukin-1. **Digestive Diseases and Science**, v. 33, p. 25s-35s, 1988.
- DING, A.; NATHAN, C.F.; GRAYCAR, J.; DERYNCK, R.; STUEHR, D.J.; SRIMAL, S. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors β 1, β 2 and β 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN- γ . **J. Immunol.**, v. 145, p. 940–944, 1990.
- DING, A.H.; NATHAN, C.F.; STUEHR, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. **J. Immunol.**, v. 141, p. 2407-2412, 1988.
- DING, K.; SHIBUI, A.; WANG, Y.; TAKAMOTO, M.; MATSUGUCHI, T; SUGANE, K. Impaired recognition by Toll-like receptor 4 is responsible for exacerbated murine *Pneumocystis pneumonia*. **Microbes Infection**, v. 7, p. 195–203, 2005.
- DING, L.; SHEVACH, E.M. IL-10 inhibit mitogen induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. **J. Immunol.**, v. 148, p.3133-3139, 1992.
- DOMER. J.E.; MURPHY, J.W.; DEEPE, G.S.JR; FRANCO, M. Immunomodulation in the mycoses. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 30, suppl. 1, p. 157-66, 1992.
- DROEMANN, D.; GOLDMANN, T.; TIEDJE, T.; ZABEL, P.; DALHOFF, K.; SCHAAF, B. Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients. **Respir. Res.**, v. 6, p. 68, 2005.
- DURAMAD, P.; MCMAHON, C.W.; HUBBARD, A.; ESKENAZI, B.; HOLLAND, N.T. Flow Cytometric Detection of Intracellular Th1/Th2 Cytokines Using Whole Blood: Validation of

- Immunologic Biomarker for Use in Epidemiologic Studies. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 13, n. 9, p.1452–1458, 2004.
- DURDEN, F.M.; ELEWSKI, B. Fungal infections in HIV-infected patients. **Semin. Cutan. Med. Surg.**, v. 16, n. 3, p. 200-12, 1997.
- EVANS, T.J.; STRIVENS, E.; CARPENTER, A.; COHEN, J. Differences in Cytokine Response and Induction of Nitric Oxide Synthase in Endotoxin-Resistant and Endotoxin-Sensitive Mice after Intravenous Gram-Negative Infection. **J. Immunol.**, v. 150, n. 11, p. 5033-5040, 1993
- FADOK, V.A.; VOELKER, D.R.; CAMPBELL, P.A.; COHEN, J.J.; BRATTON, D.L.; HENSON, P.M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **J Immunol.**, v. 148, n. 7, p. 2207-2216, 1992.
- FAIRBAIRN, I.P. Macrophage apoptosis in host immunity to mycobacterial infections. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 32, p. 496–498, 2004.
- FAN, W.; HA, T.; LI, Y.; OZMENT-SKELTON, T.; WILLIAMS, D.L.; KELLEY, J.; BROWDER, I. W.; LI, C. Overexpression of TLR2 and TLR4 susceptibility to serum deprivation-induced apoptosis in CHO cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 337, p. 840–848, 2005
- FARAH, C. S.; ELAHI, S.; PANG, G.; GOTJAMANOS, T.; SEYMOUR, G.J.; CLANCY, R.L.; ASHMAN, R.B. T Cells Augment Monocyte and Neutrophil Function in Host Resistance against Oropharyngeal Candidiasis. **Infection Immun.**, v. 69, n. 10, p. 6110–6118, 2001.
- FAURE, E.; EQUILS, O.; SIELING, P.A.; THOMAS, L.; ZHANG, F.X.; KIRSCHNING, C.J.; POLENTARUTTI, N.; MUZIO, M.; ARDITI, M. Bacterial lipopolysaccharide activates NF-κB through Toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells: differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 11058-11063, 2000.
- FELLSTRÖN, B.; ZEZINA, L. Apoptosis: friend or foe? **Transplantation Proceedings**, v. 33, p. 2414-2416, 2001.
- FERNANDES, K.S.S.; MATHEWS, H.L.; LOPES-BEZERRA, L.M. Differences in virulence of *Sporothrix schenckii* conidia related to culture conditions and cell-wall composition. **J. Med. Microbiol.**, v. 48, p. 195-203, 1999.
- FERNANDES, K.S.S.; COELHO, A.L.; LOPES-BEZERRA, L.M.; BARJA-FIDALGO, C. Virulence of *Sporothrix schenckii* conidia and yeast cells, and their susceptibility to nitric oxide. **Immunology**, v. 101, n. 4:563-569, 2000.

- FIGUEIREDO, C.C.; DECCACHE, P.M.; LOPES-BEZERRA, L.M.; MORANDI, V. TGF-beta1 induces transendothelial migration of the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii* by a paracellular route involving extracellular matrix proteins. **Microbiol.**, v. 153, n. Pt 9, p. 2910-2921, 2007.
- FIGUEIREDO, C.C.; LIMA, O.C.; CARVALHO, L.; LOPES-BEZERRA, L.M.; MORANDI, M. The in vitro interaction of *Sporothrix schenckii* with human endothelial cells is modulated by cytokines and involves endothelial surface molecules. **Microbial Pathogenesis**, v. 36, p. 177-188, 2004.
- FINK, S.L.; COOKSON, B.T. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 4, p. 1907-1916, 2005.
- FIORENTINO, D.F.; BOND, M.W.; MOSMANN, T.R. Two types of mouse helper T cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J. Exp. Med.**, v. 170, p. 2081-2095, 1989.
- FIORENTINO, D.F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T.R.; HOWARD, M.H.; O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J. Immunol.**, v. 147, n. 11, p.3815-3822, 1991.
- FIORENTINO, D.F.; ZLOTNIK, A.; VIEIRA, P.; MOSSMAN, T.R.; HOWARD, M.; MOORE, K.W.; O'GARRA, A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **J. Immunol.**, v. 146, p. 3444-3451, 1991.
- FITZGERALD, K.A.; PALSSON-MCDERMOTT, E.M.; BOWIE, A.G.; JEFFERIES, C.A.; MANSELL, A.S.; BRADY, G.; BRINT, E.; DUNNE, A.; GRAY, P.; HARTE, M.T.; MCMURRAY, D.; SMITH, D.E.; SIMS, J.E.; BIRD, T.A.; O'NEILL, L.A. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. **Nature**, v. 413, n. 6851, p. 78-83, 2001.
- FLOHÉ, L.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; SALIOU, C.; TRABER, M.; PACKER, L. Redox regulation of NF-kB activation. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 22, p.1115-1126, 1997.
- FOCK, R.A.; VINOLO, M.A.; DE MOURA SÁ ROCHA, V.; DE SÁ ROCHA, L.C.; BORELLI, P. Protein-energy malnutrition decreases the expression of TLR-4/MD-2 and CD14 receptors in peritoneal macrophages and reduces the synthesis of TNF-a in response to lipopolysaccharide (LPS) in mice . **Cytokine**, v. 40, p. 105-114, 2007.
- FONTES, P.C.; KITAKAWA, D.; CARVALHO, Y.R.; BRANDÃO, A.A.; CABRAL, L.A.; ALMEIDA, J.D. Sporotrichosis in an HIV-positive man with oral lesions: a case report. **Acta Cytol.**, v. 51, n. 4, p. 648-650, 2007.

- FORMAN, H.J.; TORRES, M. Redox signaling in macrophages. *Mol. Aspects Med.*, v. 22, n. 4-5, p. 189-216, 2001.
- FORSYTH, C.B.; MATHEWS, H. L. Lymphocytes utilize CD11b/CD18 for adhesion to *Candida albicans*. **Cell. Immunol.** v. 170, p. 91-100, 1996.
- FORTUNEL, N.O.; HATZFELD, J.A.; MONIER, M.N.; HATZFELD, A. Control of Hematopoietic stem/progenitor cell fate by transforming growth factor- β . **Oncology Res.**, v.13, p.445-453, 2003.
- FRANTZ, S.; KELLY, R.A.; BOURCIER, T. Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor-kappa B by oxidative stress in cardiac myocytes, **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 5197–5203, 2001.
- FUKUO, K.; INOUE, T.; MORIMOTO, S.; NAKAHASHI, T.; YASUDA, O.; KITANO, S.; SASADA, R.; OGIHARA, T. Nitric oxide mediates cytotoxicity and basic fibroblast growth factor release in cultured vascular smooth muscle cells. A possible mechanism of neo vascularization in atherosclerotic plaques. **J. Clin. Invest.**, v. 95, p. 669–676, 1995.
- GATELY, M.K.; DESAI, B.B.; WOLITZKY, A.G.; QUINN, P.M.; DWYER, C.M.; PODLASKI, F.J.; FAMILLETTI, P.C.; SINIGAGLIA, F.; CHIZZONITE, R.; GUBLER, U.; STERN, A.S. Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor). **J Immunol.**, v. 147 , n. 3, p. 874-882, 1991.
- GATELY, M.K.; RENZETTI, L.M.; MAGRAM, J.; STERN, A.S.; ADORINI, L.; GUBLER, U.; PRESKY, D.H. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v.16, p. 495–521, 1998.
- GATELY, M.K.; WOLITZKY, A.G.; QUINN, P.M.; CHIZZONITE, R. Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. **Cell Immunol.**, v. 143, n. 1, p.127-42, 1992.
- GAZZINELLI, R.T.; HIENY, S.; WYNN, T.A.; WOLF, S.; SHER, A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 90, n. 13, p. 6115-6119, 1993.
- GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I.P.; JAMES, S.L.; SHER, A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. **J. Immunol.**, v. 148, p.1792-1796, 1992.
- GERHARD, R.; DE MOSCOSO, P.C.; GABBI, T.V.; VALENTE, N.Y. Fine-needle aspiration biopsy of disseminated sporotrichosis: a case report. **Diagn Cytopathol.** v. 36, n. 3, p. 174-177, 2008.

- GERY, I.; WAKSMAN, B.H. Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. II. The cellular source of potentiating mediator(s). **J. Exp. Med.**, v. 136, n. 1, p.143-55, 1972.
- GHOSH, S.; MAY, M.J.; KOPP, E.B. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 16, p. 225–260, 1998.
- GLOCKZIN, S.; VON KNETHEN, A.; SCHEFFNER, M.; BRÜNE, B. Activation of the cell death program by nitric oxide involves inhibition of the proteasome. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 19581-19586, 1999.
- GMYREK, G.B.; SIERADZKA, U.; GOLUDA, M.; GABRYS, M.; SOZANSKI, R.; JERZAK, M.; ZBYRYT, I.; CHROBAK, A.; CHELMONSKA-SOYTAM A. Differential flow cytometric detection of intracellular cytokines in peripheral and peritoneal mononuclear cells of women with endometriosis. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v.137, n. 1, p. 67-76, 2008.
- GOLDMAN, D.L.; CASADEVALL, A.; CHO, Y.; LEE, S.C. *Cryptococcus neoformans* meningitis in the rat. **Lab. Invest.**, v. 75, p. 759-770, 1996.
- GONZALEZ, A.; DE GREGORI, W.; VELEZ, D.; RESTREPO, A.; CANO, L.E. Nitric Oxide Participation in the Fungicidal Mechanism of Gamma Interferon-Activated Murine Macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* Conidia. **Infection Immun.**, v. 68, n. 5, p. 2546–2552, 2000.
- GHOSH, S.; MAY, M.J.; KOPP, E.B. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 16, p. 225–260, 1998.
- GOYERT, S.M.; FERRERO, S.V.; SEREMETIS, R.J.; WINCHESTER, J.; SILVER, J.; MATTISON, A.C. Biochemistry and expression of myelomonocytic antigens. **J. Immunol.**, v.137, p.3909-3914, 1986.
- GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15 N]nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**, v.126, p.131-138, 1982.
- GUHA, M.; MACKMAN, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. **Cellular Signalling**, v. 13, p. 85-94, 2001.
- HAANEN, C.; VERMES, I. Apoptosis: programmed Cell death in fetal development. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 64, p. 126-133, 1996.
- HAASE, R.; KIRSCHNING, C.J.; SING, A.; SCHROTTNER, P.; FUKASE, K.; KUSUMOTO, S.; WAGNER, H.; HEESEMANN, J.; RUCKDESCHEL, K. A dominant role of Toll-like receptor 4 in the signaling of apoptosis in bacteriafaced macrophages, **J. Immunol.**, v. 171, p. 4294–4303, 2003.

- HACHISUKA, H.; SASAI, Y. Development of experimental sporotrichosis in normal and modified animals. **Mycopathologia**, v.76, p. 79-82, 1981.
- HAJJAR, A.M.; O'MAHONY, D.S.; OZINSKY, A.; UNDERHILL, D.M.; ADEREM, A.; KLEBANOFF, S.J.; WILSON, C.B. Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. **J. Immunol.**, v. 166, n. 1, p. 15-19, 2001.
- HAKOMORI, S.I.; MURAKAMI, W.T. Glycolipids of hamster fibroblasts and derived malignant-transformed cell lines. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.59, p. 254-261, 1968.
- HANSSON, M.; ASEA, A.; ERSSON, U.; HERMODSSON, S.; HELLSTRAND, K. Induction of apoptosis in NK cells by monocyte-derived reactive oxygen metabolites. **J. Immunol.**, v. 156, p.42-47, 1996.
- HAPPEL, K.I.; DUBIN, P.J.; ZHENG, M.; GHILARDI, N.; LOCKHART, C.; QUINTON, L.J.; ODDEN, A.R.; SHELLITO, J.E.; BAGBY, G.J.; NELSON, S.; KOLLS, J.K. Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. **J. Exp. Med.**, v. 202, p. 761–769, 2005.
- HARRINGTON, L.E.; MANGAN, P.R.; WEAVER, C.T. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. **Curr. Opin. Immunol.**, v.18, p. 349–356, 2006.
- HASHIMOTO, S.; AMEMIYA, E.; TOMITA, Y.; KOBATASHI, T.; ARAI, K.; YAMAGUCHI, M.; HORIE, T. Elevation of soluble IL-2 receptor and IL-4, and nonelevation of IFN-g in sera from patients with allergic asthma. **Ann. Allergy**, v. 71, p. 455-458, 1993.
- HASLETT, C. Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in the tissue fate of granulocytes. **Clin. Sci.**, v.83, n. 6, p.639-48, 1992.
- HAY, S.; KANNOURAKIS, G. A time to kill: viral manipulation of the cell death program. **J. Gen. Virol.**, v. 83, p. 1547–1564, 2002.
- HEER, A.K.; SHAMSHIEV, A.; DONDA, A.; UEMATSU, S.; AKIRA, S.; KOPF, M.; MARSLAND, B.J. TLR signaling fine-tunes anti-influenza B cell responses without regulating effector T cell responses. **J. Immunol.**, v. 178, p. 2182-2191, 2007.
- HEKTOEN, L.; PERKINS, C.F. Refractory subcutaneous caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. **J. Exp. Med.**, v. 5, p. 77– 89, 1900.
- HELLER, H.M.; FUHRER J. Disseminated sporotrichosis in patients with AIDS: case report and review of the literature. **AIDS**, v. 5, p. 1243-1246, 1991.
- HIBBS, J.B.; TAINTOR, R.R.; CHAPMAN, H.A.; WEINBERG, J.B. Macrophage tumor killing Influence of the local environment. **Science**, v. 197, p. 279–283, 1977.

- HIRSCHFELD, M.; MA, Y.; WEIS, J.H.; VOGEL, S.N.; WEIS, J.J. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. **J. Immunol.**, v. 165, n. 2, p. 618-622, 2000.
- HIRUMA, M.; YAMAJI, K.; SHIMIZU, T.; OHATA, H.; KUKITA, A. Ultrastructural study of tissue reaction of mice against *Sporothrix schenckii* infection. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 280, Suppl, p.S94-100, 1988.
- HOHL, T.M.; RIVERA, A.; PAMER, E.G. Immunity to fungi. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 18, p. 465–472, 2006.
- HONSTETTRE, A.; GHIGO, E.; MOYNAULT, A.; CAPO, C.; TOMAN, R.; AKIRA, S.; TAKEUCHI, O.; LEPIDI, H.; RAOULT, D.; MEGE, J.L. Lipopolysaccharide from *Coxiella burnetii* is involved in bacterial phagocytosis, filamentous actin reorganization, and inflammatory responses through Toll-like receptor 4. **J. Immunol.**, v. 172, n. 6, p. 3695-703, 2004.
- HOSHINO, K.; TAKEUCHI, O.; KAWAI, T.; SANJO, H.; OGAWA, T.; TAKEDA, Y.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Cutting Edge: Toll-Like Receptor 4 (TLR4)-Deficient Mice Are Hyporesponsive to Lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the *Lps* Gene Product. **J. Immunol.**, v. 162, p. 3749–3752, 1999.
- HOTCHKISS, R.S.; CHANG, K.C.; SWANSON, P.E.; TINSLEY, K.W.; HUI, J.J.; KLENDER, P.; XANTHOUDAKIS, S.; ROY, S.; BLACK, C.; GRIMM, E.; ASPIOTIS, R.; HAN, Y.; NICHOLSON, D.W.; KARL, I.E. Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. **Nat. Immunol.**, v. 1, p. 496–501. 2000.
- HOWARD, D.H. Dimorphism of *Sporotrichum schenckii*. **J. Bacteriol.**, v. 81, p. 464– 469, 1961.
- HSIEH, C.S.; MACATONIA, S.E.; TRIPP, C.S.; WOLF, S.F.; O'GARRA, A., MURPHY, K.M. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. **Science**, v. 260, p. 547-549, 1993.
- HU, W.H.; JOHNSON, H.; SHU, H.B. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors signal NF-kappaB and JNK activation and apoptosis through distinct pathways. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 30603–30610, 1999.
- HURST, J.; VON LANDENBERG, P. Toll-like receptors and autoimmunity. **Autoimmunity Rev.**, v. 7, p. 204–208, 2008.
- IGNARRO, L.J. Physiological significance of endogenous nitric oxide. **Semin Perinatol.**, v. 15, n. 1, p. 20-26, 1991a.

- IGNARRO, L.J. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. **Biochem. Pharmacol.**, v. 41, p. 485-490, 1991b.
- INTO, T.; LIURA, K.; YASUDA, M.; KATAOKA, H.; INOUE, N.; HASEBE, A.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; SHIBATA, K.I. Stimulation of human Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR6 with membrane lipoproteins of *Mycoplasma fermentans* induces apoptotic cell death after NF-kappaB activation, **Cell. Microbiol.**, v. 6, p. 187–199, 2004.
- ISHIZAKI, H.; KAWASAKI, M.; AOKI, M.; MATSUMOTO, T.; PADHYE, A.A.; MENDOZA, M.; NEGRONI, R. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in North and South America. **Mycopathologia**, v.142, n. 3, p. 115-118, 1998.
- ISHIZAKI, H.; KAWASAKI, M.; AOKI, M.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K.; GARCIA FERNANDEZ, J.A. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in Costa Rica. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 34, n. 1, p. 71-73, 1996.
- ISHIZAKI, H.; KAWASAKI, M.; AOKI, M.; WU, S.; LIN, J.; KIM, J.A.; WON, Y.-H.; CALVO, C.R. Mitochondrial DNA Analysis of *Sporothrix schenckii* from China, Korea and Spain. **Jpn. J. Med. Mycol.**, v. 45, p. 23-25, 2004.
- JAMES, E.R.; GREEN, D.R. Manipulation of apoptosis in the host-parasite interaction. **Trends Parasitol.**, v. 20, p. 280–287, 2004.
- JANEWAY, C.A.Jr.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 197–216, 2002.
- JANEWAY, C.A.Jr. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. **Immunol. Today**, v.13, p. 11–16, 1992.
- JASON, J.; LARNED, J. Single-cell cytokine profiles in normal humans: comparison of flow cytometric reagents and stimulation protocols. **J. Immunol. Methods**, v. 207, p.13–22, 1997.
- JIANG, Q.; AKASHI, S.; MIYAKE, K.; PETTY, H.R. Cutting Edge: Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and Toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF- κ B. **J. Immunol.**, v. 165, p. 3541–3544, 2000.
- JOHNSON, D. Update from the 7th conference on retroviruses and opportunistic infections. **Women Alive**, Spring, p. 15-16, 2000.
- JOUAULT, T.; IBATA-OMBETTA, S.; TAKEUCHI, O.; TRINEL, P.A.; SACCHETTI, P.; LEFEBVRE, P.; AKIRA, S.; POULAIN, D. *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through Toll-like receptors. **J. Infect. Dis.**, v. 188, p. 165-172, 2003.
- JUNG, T.; SCHAUER, U.; HEUSSER, C.; NEUMANN, C.; RIEGER, C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. **J. Immunol. Methods**, v. 159, p.197-207, 1993.

- KAMADA, N.; HISAMATSU, T.; OKAMOTO, S.; CHINEN, H.; KOBAYASHI, T.; SATO, T.; SAKURABA, A.; KITAZUME, M.T.; SUGITA, A.; KOGANEI, K.; AKAGAWA, K.S.; HIBI, T. Unique CD14⁺ intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN- γ axis. **J. Clin. Invest.**, v. 118, p. 2269–2280, 2008.
- KARIN, M.; LIN, A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. **Nat. Immunol.**, v. 3, n. 3, p. 221-227, 2002.
- KAUFFMAN, C. A. Sporotrichosis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 29, p. 231–237, 1999.
- KAUFFMAN, C. A.; HAJJEH, R.; CHAPMAN, S. W. Practice guidelines for the management of patients with sporotrichosis. For the Mycoses Study Group. Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, p. 684–687, 2000.
- KAUL, N.; FORMAN, H.J. Activation of NF- κ B by the respiratory burst of macrophages. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 21, p. 401-405, 1996.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. **Curr. Opin. Immunol.**, v.17, n. 4, p. 338-344, 2005.
- KAWAI, T.; ADACHI, O.; OGAWA, T.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. **Immunity**, v. 11, n. 1, p. 115-122, 1999.
- KAWASAKI, M.; ISHIZAKI, H.; MUIR, D. Mitochondrial DNA analyses of *Sporothrix schenckii* in Australia. **Jpn J. Med. Mycol.**, v. 38, suppl. 2, p.107, 1997
- KEANE, J.; BALCEWICZ-SABLINSKA, M.K.; REMOLD, H.G.; CHUPP, G.L.; MEEK, B.B.; FENTON, M.J.; KORNFELD, H. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 1, p. 298-304, 1997.
- KHADER, S.A.; PEARL, J.E.; SAKAMOTO, K.; GILMARTIN, L.; BELL, G.K.; JELLEY-GIBBS, D.M.; GHILARDI, N.; DESAUVAGE, F.; COOPER, A.M.; IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN-gamma responses if IL-12p70 is available. **J. Immunol.**, v. 175, p. 788–795. 2005.
- KIENER, P.A.; DAVIS, P.M.; STARLING, G.C.; MEHLIN, C.; KLEBANOFF, S.J.; LEDBETTER, J.A.; LILES, W.C. Differential induction of apoptosis by Fas-Fas ligand interactions in human monocytes and macrophages. **J. Exp. Med.**, v. 185, n. 8, p. 1511-1516, 1997.
- KIM, H.M.; PARK, B.S.; KIM, J.-I.; KIM, S.E.; LEE, J.; OH, S.C.; ENKHBAYAR, P.; MATSUSHIMA, N.; LEE, H.; YOO, O.O.; LEE, J.-O. Crystal Structure of the TLR4-MD-2 Complex with Bound Endotoxin Antagonist Eritoran. **Cell**, v. 130, p. 906–917, 2007.

- KIPRIANOVA, I.; SCHWABA, S.; FANDREYB, J.; SPRANGERA, M. Suppression of the oxidative burst in murine microglia by nitric oxide. **Neurosc. Letters**, v. 226, p. 75–78, 1997.
- KOBAYASHI, M.; FITZ, L.; RYAN, M.; HEWICK, R.M.; CLARK, S.C.; CHAN, S.; LOUDON, R.; SHERMAN, F.; PERUSSIA, B.; TRINCHIERI, G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. **J. Exp. Med.**, v. 170, n. 3, p. 827-845, 1989.
- KOGA, T.; DUAN, H.; FURUE, M. Immunohistochemical detection of interferon- γ -producing cells in granuloma formation of sporotrichosis. **Med. Mycol.**, v. 40, p. 111-114, 2002.
- KOMATSU, T.; BI, Z.; REISS, C.S. IFN- γ -induced type 1 nitric oxide synthase activity inhibits viral replication in neurons. **J. Neuroimmunol.**, v. 68, p. 101-108, 1996.
- KONG, X.; XIAO, T.; LIN, J.; WANG, Y.; CHEN, H.D. Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 12, n. 11, p.1077-1081, 2006.
- KOZEL, T.R. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. **Trends Microbiol.**, v. 3, p. 295-299, 1995.
- KUHNEL, F.; ZENDER, L.; PAUL, Y.; TIETZE, M.K.; TRAUTWEIN, C.; MANN, M.; KUBICKA, S. NF κ B mediates apoptosis through transcriptional activation of Fas (CD95) in adenoviral hepatitis, **J. Biol. Chem.**, v. 275, p.6421–6427, 2000.
- KWON-CHUNG, K.J., Comparison of isolates of *Sporothrix schenckii* obtained from fixed cutaneous lesions with isolates from other type of lesions. **J. infect. Dis.**, v. 139, p. 424-431, 1979.
- LABBÉ, K.; SALEH, M. Cell death in the host response to infection. **Cell Death Differ.**, v. 15, n. 9, p. 1339-1349, 2008.
- LANDMANN, R.; MÜLLER, B.; ZIMMERLI, W. CD14, new aspects of ligand and signal diversity. **Microbes Infect.**, v. 2, n. 3, p. 295-304, 2000.
- LASKIN, D.L.; PENDINO, J. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 35, 655–677, 1995.
- LE GOFFIC, R.; BALLOY, V.; LAGRANDERIE, M.; ALEXOPOULOU, L.; ESCRIOU, N.; FLAVELL, R.; CHIGNARD, M.; SI-TAHAR, M. Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR)3 to influenza A virus-induced acute pneumonia. **PLoS Pathog.**, v.2, e53, 2006.

- LEI, P.C.; YOSHIIKE, T.; OGAWA, H. Effects of proteinase inhibitors on the cutaneous lesion of *Sporothrix schenckii* inoculated hairless mice. **Mycopathologia**, v. 123, n. 2, p. 81-85, 1993.
- LEMAITRE, B.; NICOLAS, E.; MICHAUT, L.; REICHHART, J.M.; HOFFMANN, J.A. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults, **Cell**, v. 86, p. 973–983, 1996.
- LETTERIO, J.J., LEHRNBECHER, T., POLLACK, G., WALSH, T.J., CHANOCK, S.J. Invasive candidiasis stimulates hepatocyte and monocyte production of active transforming growth factor beta. **Infect Immun.**, v. 69, n. 8, p. 5115-5120, 2001.
- LEVITZ, S.M. Interactions of Toll-like receptors with fungi. **Microbes Infect.**, v.6, p. 1351-1355, 2004.
- LIMA BARROS, M.B.; OLIVEIRA-SCHUBACH, M.C.; SCHUBACH, T.M.; REIS, R.S.; CONCEIÇÃO, M.J.; VALLE, A.C. Sporotrichosis with widespread cutaneous lesions: report of 24 cases related to transmission by domestic cats in Rio de Janeiro, Brazil. **Int. J. Dermatol.**, v. 42, p. 677–681, 2003.
- LIN, J.; KAWASAKI, M.; AOKI, M.; ISHIZAKI, H.; YOU, G.; LI, R. Mitochondria DNA analysis of *Sporothrix schenckii* clinical isolates from China. **Mycopathologia**, v. 148, p. 68-72, 1999.
- LIU, S.F.; MALIK, A.B. NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 290, n. 4, p. L622-L645, 2006.
- LIU, Z.Q.; KUNIMATSU, M.; YANG, J.P.; OZAKI, Y.; SASAKI, M.; OKAMOTO, T. Proteolytic processing of nuclear factor kappa B by calpain in vitro. **FEBS Lett.**, v. 385, p.109-113, 1996.
- LLOYD, K.O.; BITOON, M.A. Isolation and purification of a peptido-rhamnomannan from the yeast form of *Sporothrix schenckii*. Structural and immunochemical studies. **J. Immunol.**, v. 107, n. 3, p. 663-671, 1971.
- LLOYD, K.O.; TRAVASSOS, L.R. Immunochemical studies of L-rhamno-D-mannans of *Sporothrix schenckii* and related fungi by use of rabbit and human sera. **Carbohydr. Res.**, v. 40, p. 89-97, 1975.
- LOPES ALVES, L.; TRAVASSOS, L.R.; PREVIATO, J.O.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Novel antigenic determinants from peptidorhamnomannans of *Sporothrix schenckii*. **Glycobiology**, v. 4, p. 281-288, 1994.

- LOPES, J.O.; ALVES, S.H.; MARI, C.R.; BRUM, L.M.; WESTPHALEN, J.B.; ALTERMANN, M.I.; PRATES, F.B. Epidemiology of sporotrichosis in the central region of Rio Grande do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32, p. 541-545, 1999.
- LOPES-BEZERRA, L.M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R.O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Ann. Brazil. Acad. Sciences**, v. 78, p. 293-308, 2006.
- LOPEZ, M.; SLY, L.M.; LUU, Y.; YOUNG, D.; COOPER, H.; REINER, N.E. The 19-kDa *Mycobacterium tuberculosis* protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2. **J. Immunol.**, v.170, p. 2409–2416, 2003.
- LORSBACH, R.B.; MURPHY, W.J.; LOWENSTEIN, C.J.; SNYDER, S.H.; RUSSELL, S.W. Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 3, p. 1908-1913, 1993.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Proteins measurement with folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, p.265-275, 1951.
- LU, B.; WANG, L.; MEDAN, D.; TOLEDO, D.; HUANG, C.; CHEN, F.; SHI, X.; ROJANASAKUL, Regulation of Fas (CD95)-induced apoptosis by nuclear factor-kappaB and tumor necrosis factor-alpha in macrophages, **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 283, p. C831–C838, 2002.
- LUTZ, A.; SPLENDORE A. Sobre uma mycose observada em homens e ratos. **Rev. Med. São Paulo**, v. 21, p. 433– 450, 1907.
- MACATONIA, S.E.; HSIEH, C.S.; MURPHY, K.M.; O’GARRA, A. Dendritic cells and macrophages are required for Th1 development of CD4+ T cells from alpha beta TCR transgenic mice: IL-12 substitution for macrophages to stimulate IFN-gamma production is IFN-gamma-dependent. **Int. Immunol.**, v. 5, n. 9, p. 1119-1128, 1993.
- MAGRAM, J.; CONNAUGHTON, S.E.; WARRIER, R.R.; CARVAJAL, D.M.; WU, C.Y.; FERRANTE, J.; STEWART, C.; SARMIENTO, U.; FAHERTY, D.A.; GATELY, M.K. IL-12-deficient mice are defective in IFN γ production and type 1 cytokine responses. **Immunity**, v. 4, p. 471–481, 1996.
- MAIA, D.C.G.; SASSÁ, M.F.; PLACERES, M.C.P.; CARLOS, I.Z. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*, **Mycopathologia**, v. 161, p. 11-19, 2006.
- MAKHATADZE, N.J. Tumor Necrosis Factor Locus: Genetic Organisation and Biological Implications. **Human Immunology**, v. 59, p. 571–579, 1998.

- MANETTI, R.; PARRONCHI, P.; GUIDIZI, M.G.; PICCINI, M.P.; MAGGI, E.; TRINCHIERI, G.; ROMAGNANI, S. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin-12 (IL-12)) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL4-producing Th2 cells. **J. Exp. Med.**, v. 177, p. 1199-1204, 1993.
- MANGAN, D.F.; WAHL, S.M. Differential regulation of human monocyte programmed cell death apoptosis) by chemotactic factors and pro-inflammatory cytokines. **J. Immunol.**, v. 147, n. 10, p. 3408-3412, 1991.
- MANGAN, D.F.; WAHL, S.M.; SULTZER, B.M.; MERGENHAGEN, S.E. Stimulation of human monocytes by endotoxin-associated protein: inhibition of programmed cell death (apoptosis) and potential significance in adjuvanticity. **Infect Immun.**, v. 60, n. 4, p. 1684-1686, 1992.
- MARIN, M.L.; LEE, J.H.; MURTHA, J.; USTUNOL, Z.; PESTKA, J.J. Differential cytokine production in clonal macrophage and T-cell lines cultured with bifidobacteria. **J. Dairy Sci.**, v. 80, n. 11, p. 2713–2720, 1997.
- MARINO, M.W.; DUNN, A.; GRAIL, D.; INGLESE, M.; NOGUCHI, Y.; RICHARDS, L., JUNGBLUTH, A.; WADA, H.; MOORE, M.; WILLIAMSON, B.; BASU, U.; OLD, L.J. Characterisation of tumor necrosis factor-deficient mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 8093-8098, 1997.
- MARIS, N.A.; DESSING, M.C.; DE VOS, A.F.; BRESSER, P.; VAN DER ZEE, J.S.; JANSEN, H.M.; SPEK, C.A.; VAN DER POLL, T. Toll-like receptor mRNA levels in alveolar macrophages after inhalation of endotoxin. **Eur. Respir. J.**, v. 28, n. 3, p.622-626, 2006.
- MATSUNAGA, K.; ITO, M. Quantitative analysis of apoptotic cell death in granulomatous inflammation induced by intravenous challenge with *Cryptococcus neoformans* and bacillus Calmette-Guérin vaccine. **Pathol. Int.**, v. 50, n. 3, p. 206-218, 2000
- MATTNER, F.; MAGRAM, J.; FERRANTE, J.; LAUNOIS, P.; DI PADOVA, K.; BEHIN, R.; GATELY, M.K.; LOUIS, J.A.; ALBER, G. Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with *Leishmania major* and mount a polarized Th2-cell response. **Eur. J. Immunol.**, v. 26, p. 1553–1559, 1996.
- MATSUMOTO, T.; MIIKE, T.; YAMAGUCHI, K.; MURAKAMI, M.; KAWABE, T.; YODOI, J. Serum levels of soluble IL-2 receptor, IL-4 and IgE-binding factors in childhood allergic diseases. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 85, p. 288-292, 1991.
- MAY, M.J.; GOSH, S. Signal transduction through NF-kB. **Immunol. Today**, v. 19, p.80–88, 1998.

- MCCARTNEY-FRANCIS, N.; JIN, W.; WAHL, S.M. Aberrant Toll receptor expression and endotoxin hypersensitivity in mice lacking a functional TGF- β 1 signaling pathway. **J. Immunol.**, v. 172, p. 3814–3821, 2004.
- MEDEIROS, A.I.; BONATO, V.L.; MALHEIRO, A.; DIAS, A.R.; SILVA, C.L.; FACCIOLI, L.H. *Histoplasma capsulatum* inhibits apoptosis and Mac-1 expression in leucocytes. **Scand. J. Immunol.**, v. 56, n. 4, p. 392-398, 2002.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C.Jr. Innate immunity. **N. Engl. J. Med.**, v. 343, p. 338-344, 2000.
- MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C.A.Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v.388, p.394–397, 1997
- MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; KOPP, E.; STADLEN, A.; CHEN, C.; GHOSH, S.; JANEWAY, C.A.Jr. MyD88 is an adaptor protein in the Toll/IL-1 receptor family signaling pathways. **Mol. Cell**, v. 2, p. 253–258, 1998.
- MEIER, A.; KIRSCHNING, C.J.; 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.**, v. 5, p.561–570, 2003.
- MELÉNDEZ-RUIZ, C.E.; GONZÁLEZ-MENDOZA, A.; SOTOMAYOR, J.M., RUIZ GODOY, V.M.; RAMOS ZEPEDA, R. Perfil inmunológico Del paciente con esporotricosis linfocutánea. **Mycopathologia**, v. 83, p. 169-173, 1983.
- MENCACCI, A.; TOROSATUCCI, A.; SPACCAPELO, R.; ROMANI, L.; BISTONI, F.; CASONE, A. A mannoprotein constituent of *Candida albicans* that elicits different levels of delayed-type hypersensitivity, cytokine production, and anticandidal protection in mice. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 5353-5360, 1994.
- MICHEL, T.; FERON, O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? **J. Clin. Invest.**, v. 100, p. 2146-2152, 1997.
- MIGGIN, S.M.; O'NEILL, L.A. New insights into the regulation of TLR signaling. **J. Leukoc. Biol.**, v. 80, n. 2, p. 220-226, 2006.
- MIYAKE, K. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. **Semin. Immunol.**, v. 19, n. 1, p. 3-10, 2007.
- MIYAKE, K. Roles for accessory molecules in microbial recognition by Toll-like receptors. **J. Endotoxin Res.**, v. 12, p. 195–204, 2006.

- MÖLLER, B.; VILLIGER, P.M. Inhibition of IL-1, IL-6, and TNF-alpha in immune-mediated inflammatory diseases. **Springer Semin. Immunopathol.**, v. 27, n. 4, p. 391-408, 2006.
- MONTAGNOLI, C.; BACCI, A.; BOZZA, S.; GAZIANO, R.; MOSCI, P.; SHARPE, A. H.; ROMANI, L. B7/CD28-dependent CD4₊CD25⁺ regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*. **J. Immunol.**, v. 169, p. 6298-6308, 2002.
- MOORE, K.W.; VIEIRA, P.; FIORENTINO, D.F.; TROUNSTINE, M.L.; KHAN, T.A.; MOSMANN, T.K. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. **Science**, v. 248, p. 1230-1234, 1988.
- MORRIS-JONES, R.; YOUNGCHIM, S.; GOMEZ, B.L.; AISEN, P.; HAY, R.J.; NOSANCHUK, J.D.; CASADEVALL, A.; HAMILTON, A.J. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. **Infect Immun.**, v. 71, p. 4026-4033, 2003.
- MORRIS-JONES, R. Sporotrichosis. **Clin. Dermatol.**, v. 27, p. 427-431, 2002.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and survival: Application and Cytotoxicity Assays. **J. Immunol. Methods**, v.65, n. 1-2, p.55-63, 1983.
- MÜLLER, B. Cytokine imbalance in non-immunological chronic disease. **Cytokine**, v. 18, n. 6, p. 334-339, 2002.
- MUN, H.S.; AOSAI, F.; NOROSE, K.; CHEN, M.; PIAO, L.X.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; ISHIKURA, H.; YANO, A. TLR2 as an essential molecule for protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection. **Int. Immunol.**, v.15, n. 9, p.1081-1087, 2003.
- MURCIANO, C.; VILLAMON, E.; GOZALBO, D.; ROIG, P.; O'CONNOR, J.E.; GIL, M.L. Toll-like receptor 4 defective mice carrying point or null mutations do not show increased susceptibility to *Candida albicans* in a model of hematogenously disseminated infection. **Med. Mycol.**, v.44, n. 2, p.149-57. 2006
- MURPHY, P.A.; SIMON, P.L.; WILLOUGHBY, W.F. Endogenous pyrogens made by rabbit peritoneal exudate cells are identical with lymphocyte-activating factors made by rabbit alveolar macrophages. **J. Immunol.**, v. 124, n. 5, p. 2498-501, 1980.
- MUZIO, M.; BOSISIO, D.; POLENTARUTTI, N.; D'AMICO, G.; STOPPACCIARO, A.; MANCINELLI, R.; VAN'T VEER, C.; PENTON-ROL, G.; RUCO, L.P.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR-3 in dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 164, p. 5998–6004, 2000.

- MUZIO, M.; NI, J.; FENG, P.; DIXIT, V.M. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. **Science**, v. 278, p. 1612–1615, 1997.
- MUZIO, M.; POLENTARUTTI, N.; BOSISIO, D.; MANOJ KUMAR, P.P.; MANTOVANI, A. Toll-like receptor family and signaling pathway. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 28, p. 563-566, 2000.
- NAGAI, Y.; AKASHI, S.; NAGAFUKU, M.; OGATA, M.; IWAKURA, Y.; AKIRA, S.; KITAMURA, T.; KOSUGI, A.; KIMOTO, M.; MIYAKE, K. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR-4 distribution. **Nat. Immunol.**, v. 3, p.667–672, 2002.
- NAIKI, Y.; MICHELSEN, K.S.; ZHANG, W.; CHEN, S.; DOHERTY, T.M.; ARDITI, M. Transforming growth factor-beta differentially inhibits MyD88-dependent, but not TRAM- and TRIF-dependent, lipopolysaccharide-induced TLR4 signaling. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 7, p. 5491-5495, 2005.
- NAKAMURA, K.; MIYAGI, K.; KOGUCHI, Y.; KINJO, Y.; UEZU, K.; KINJO, T.; AKAMINE, M.; FUJITA, J.; KAWAMURA, I.; MITSUYAMA, M.; ADACHI, Y.; OHNO, N.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; MIYAZATO, A.; KAKU, M.; KAWAKAMI, K. Limited contribution of Toll-like receptor 2 and 4 to the host response to a fungal infectious pathogen, *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 47, p. 148–154, 2006.
- NAKATA, K.; INAGAWA, H.; NISHIZAWA, T.; KOHCHI, C.; SOMA, G. Suppression of response to foreign substances by intestinal macrophages. **Anticancer Res.**, v. 27, n. 6A, p. 3723-3727, 2007.
- NASCIMENTO, R.C.; ALMEIDA, S.R. Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 43, n. 2, p. 241-247, 2005.
- NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J.**, v. 6, n. 12, p. 3051-3064, 1992.
- NATHAN, C.F.; HIBBS, J.B.JR. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 3, n. 1, p. 65-70, 1991.
- NATHAN, C.F.; MURRAY, H.W.; COHN, Z.A. The macrophage as an effector cell. **N. Engl. J. Med.**, v. 303, p. 622-626, 1980.
- NELSON, B.J.; RALPH, P.; GREEN, S.J.; NACY, C.A. Differential susceptibility of activated macrophage cytotoxic effector reactions to the suppressive effects of transforming growth factor- β 1. **J. Immunol.**, v. 146, p.1849-1857, 1991.

- NETEA, M. G.; DE GRAAF, C.; VONK, A.; VERSCHUEREN, I.; VAN DER MEER, J.W.M.; KULLBERG, B.J. The role of Toll-like receptors in the defense against disseminated candidiasis. **J. Infect. Dis.**, v. 185, p.1483-1489, 2002.
- NETEA, M.G.; FERWERDA, G.; VAN DER GRAAF, C.A.; VAN DER MEER, J.W.; KULLBERG, B.J. Recognition of fungal pathogens by toll-like receptors. **Curr. Pharm. Des.**, v.12, p. 4195–4201, 2006.
- NETEA, M.G.; VAN DER GRAAF, C.; VAN DER MEER, J.W.M.; KULLBERG, B.J. Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 23, p. 672-676, 2004.
- NETEA, M.G.; VAN DER MEER, J.W.M.; KULLBERG, B.J. Role of the dual interaction of fungal pathogens with pattern recognition receptors in the activation and modulation of host defence. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 12, p. 404-409, 2006.
- NIELSEN, B.W.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K.; KASAHARA, T. Macrophages as producers of chemotactic proinflammatory cytokines. **Immunol. Ser.**, v. 60, p. 131-142, 1994.
- NISHIKAKU, A.S.; BURGER, E. Immunohistochemical demonstration of TGF-beta and decorin in paracoccidioidial granulomas. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, n. 8, p.1073-1078, 2003.
- NISITANI, S.; TSUBATA, T.; MURAKAMI, M.; OKAMOTO, M.; HONJO, T. The bcl-2 gene product inhibits clonal deletion of self-reactive B lymphocytes in the periphery but not in the bone marrow. **J. Exp. Med.**, v. 178, n. 4, p. 1247-1254, 1993.
- ODA, L.M.; KUBELKA, C.F.; ALVIANO, C.S.; TRAVASSOS, L.R. Ingestion of yeast forms of *Sporothrix schenckii* by mouse peritoneal macrophages. **Infect Immun.**, v. 39, n. 2, p. 497-504, 1983.
- OHASHI, K.; BURKART, V.; FLOHÉ, S.; KOLB, H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. **J. Immunol.**, v.164, n. 2, 558-561, 2000.
- OKUDA, Y.; SAKODA, S.; SHIMAOKA, M.; YANAGIHARA, T. Nitric oxide induces apoptosis in mouse splenic T lymphocytes. **Immunol. Lett.**, v. 52, n. 2-3, p. 135-138, 1996.
- O'NEILL, L.A.; BOWIE, A.G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. **Nat. Rev. Immunol.**, v.7, p. 353-364, 2007.

- ONOZAKI, K.; MATSUSHIMA, K.; KLEINERMAN, E.S.; SAITO, T.; OPPENHEIM, J.J. Role of interleukin 1 in promoting human monocyte-mediated tumor cytotoxicity. **J. Immunol.**, v. 135, n. 1, p. 314-320, 1985.
- OPPENHEIM, J.J.; NETA, R. Pathophysiological roles of cytokines in development, immunity, and inflammation. **FASEB J.**, v. 8, n. 2, p.158-162, 1994.
- OPPMANN, B.; LESLEY, R.; BLOM, B.; TIMANS, J.C.; XU, Y.; HUNTE, B.; VEGA, F.; YU, N.; WANG, J.; SINGH, K.; ZONIN, F.; VAISBERG, E.; CHURAKOVA, T.; LIU, M.; GORMAN, D.; WAGNER, J.; ZURAWSKI, S.; LIU, Y.; ABRAMS, J.S.; MOORE, K.W.; RENNICK, D.; DE WAAL-MALEFYT, R.; HANNUM, C.; BAZAN, J.F.; KASTELEIN, R.A. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. **Immunity**, v. 13, p. 715–725, 2000.
- OZINSKY, A.; UNDERHILL, D.M.; FONTENOT, J.D.; HAJJAR, A.M.; SMITH, K.D.; WILSON, C.B.; SCHROEDER, L.; ADEREM, A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 97, n. 25, p.13766-13771, 2000.
- PALA, P.; HUSSEL, T.; OPENSHAW, P.J.M. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. **J. Immunol. Meth.**, v. 243, p. 107-124, 2000.
- PAPPAS, P.G.; TELLEZ, I.; DEEP, A.E.; NOLASCO, D.; HOLGADO, W.; BUSTAMANTE, B. Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, p. 65–70, 2000.
- PARK, A.Y.; Hondowicz, B.D.; Scott, P. IL-12 is required to maintain a Th1 response during *Leishmania major* infection. **J. Immunol.**, v. 165, p. 896–902, 2000.
- PARK, H.S.; JUNG, H.Y.; PARK, E.Y.; KIM, J.; LEE, W.J.; BAE, Y.S. Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B, **J. Immunol.**, v.173, p. 3589–3593, 2004.
- PATERSON, H.M.; MURPHY, T.J.; PURCELL, E.J.; SHELLEY, O.; KRIYNOVICH, S.J.; LIEN, E.; MANNICK, J.A.; LEDERER, J.A. Injury primes the innate immune system for enhanced Toll-like receptor reactivity. **J. Immunol.**, v.171, n. 3, p. 1473-1483, 2003.
- PATTERSON, T.F. Advances and challenges in management of invasive mycoses. **Lancet**, v. 366, p. 1013-1025, 2005.
- PENG, Y.; GALLAGHER, S.F.; HAINES, K.; BAKSH, K.; MURR, M.M. Nuclear factor-kappaB mediates Kupffer cell apoptosis through transcriptional activation of Fas/FasL, **J. Surg. Res.**, v. 130, n. 1, p. 58.65, 2006.

- PERFECT, J.R.; SCHELL, W.A.; RINALDI, M.G. Uncommon invasive fungal pathogens in the acquired immunodeficiency syndrome. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 31, n. 2, p.175-179, 1993.
- PFLANZ, S.; TIMANS, J.C.; CHEUNG, J.; ROSALES, R.; KANZLER, H.; GILBERT, J.; HIBBERT, L.; CHURAKOVA, T.; TRAVIS, M.; VAISBERG, E.; BLUMENSCHNEIN, W.M.; MATTSON, J.D.; WAGNER, J.L.; TO, W.; ZURAWSKI, S.; MCCLANAHAN, T.K.; GORMAN, D.M.; BAZAN, J.F.; DE WAAL, M.R.; RENNICK, D.; KASTELEIN, R.A. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EB13 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. **Immunity**, v. 16, p. 779–790, 2002.
- PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide by cells in culture. **J. Immunol. Methods**, v.36, n.1-2, p.61-70, 1980.
- PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassay for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using in automatic enzyme immunoassay reader. **J. Immunol. Methods**, v.46, n.2, p.211-226, 1981.
- POLONELLI, L.; MORACE, G. Exoantigen studies of *Sporothrix schenckii*, *Ceratocystis minor*, and *Graphium penicillioides* cultures. **J. Clin. Microbiol.**, v. 15, n. 3, p. 362-365, 1982.
- POLTORAK, A.; HE, X.; SMIRNOVA, I.; LIU, M-Y.; VAN HUFFEL, C.; DU, X.; BIRDWELL, D.; ALEJOS, E.; SILVA, M.; GALANOS, C.; FREUDENBERG, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; LAYTON, B.; BEUTLER, B. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. **Science**, v. 282, p. 2085-88, 1998
- POLTORAK, A.; SMIRNOVA, I.; CLISCH, R.; BEUTLER, B. Limits of a deletion spanning Tlr4 in C57BL/10ScCr mice. **J. Endotoxin. Res.**, v. 6, n. 1, p. 51-56, 2000.
- POWER, M.R.; LI, B.; YAMAMOTO, M.; AKIRA, S.; LIN, T.J. A role of Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN- β in the host response to *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. **J. Immunol.**, v. 178, p. 3170–3176, 2007.
- PRUSSIN, C. Cytokine flow cytometry: understanding cytokine biology at the single-cell level. **J. Clin. Immunol.**, v.17, p.195 – 204, 1997.
- PRUSSIN, C.; METCALFE, D.D. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. **J. Immunol. Methods**, v. 188, p. 117-128, 1995.
- RADEKE, H.H.; MEIER, B.; TOPLEY, N.; FLOGE, J., HABERMEHL, G.G., RESCH, K. Interleukin 1- β and tumor necrosis factor- α induce oxygen radical production in mesangial cells. **Kidney Int.**, v. 37, p. 767–775, 1990.

- RADVANYI, L.G.; MILLS, G.B.; MILLER, R.G. Religation of the T cell receptor after primary activation of mature T cells inhibits proliferation and induces apoptotic cell death. **J Immunol.**, v. 150, n. 12, p. 5704-5715, 1993.
- RALPH, P.; NAKOINZ, I.; JOHANNES, A.S.; FONG, S.; LOWE, D.; MIN, H.Y.; LIN, L. IL-10, T lymphocyte inhibitor of human blood cell production of IL-1 and tumor necrosis factor. **J. Immunol.**, v. 148, p. 808-814, 1992.
- RAMASARMA, T. H₂O₂ has a role in cellular regulation, **Indian J. Biochem. Biophys.**, v. 27, p. 269–274, 1990.
- RAMOS-ZEPEDA, R.; GONZÁLEZ-MENDOZA, A. Metabolic activity of phagocytes in experimental sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 93, p. 109-112, 1986.
- REED, S.G. TGF-β in infections and infectious diseases. **Microbes Infect.**, v. 1, p. 1313–1325, 1999.
- REMENTERÍA, A.; GARCÍA-TOBALINA, R.; SEVILLA, M.J. Nitric oxide-dependent killing of *Candida albicans* by murine peritoneal cells during an experimental infection. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 11, n. 3, p. 157-162. 1995
- REMER, K.A.; BRCIC, M.; JUNGI, T.W. Toll-like receptor-4 is involved in eliciting an LPS-induced oxidative burst in neutrophils. **Immunology Lett.**, v. 85, p. 75-80, 2003.
- RESTO, S.; RODRIGUEZ-DEL VALLE, N. Yeast cell cycle of *Sporothrix schenckii*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 23, p. 13-24, 1985.
- RESTREPO-GUTIERREZ, S.; ARANGO-ARTEAGA, M.; URIBE-JARAMILLO, F.; ZULUAGA-CADENA, A.I.; RESTREPO-MORENO, A. Course of the experimental murine infection induced by *Sporothrix schenckii* conidia according to depth of inoculation. **J. med. Vet. mycol.**, v. 31, p. 411-420, 1993.
- RIPPON, J.W. Sporotrichosis. In RIPPON, J.W., **Medical Mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic actinomyces**. 2nd Ed, Chicago: W. B. Saunders. p. 277-302, 1982.
- RISS, T.L. Apoptosis as a biomarker in chemoprevention trials. **Urology**, v. 57, p. 141-142, 2001.
- RIVERA-RODRIGUES, N.; RODRIGUEZ-DEL VALLE, N. Effects of calcium ions on the germination of *Sporothrix schenckii* conidia. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 30, p. 185-195, 1992.
- ROACH, J.C.; GLUSMAN, G.; ROWEN, L.; KAUR, A.; PURCELL, M.K.; SMITH, K.D.; HOOD, L.E.; ADEREM, A. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 102, p. 9577–9582, 2005.

- ROBERTS, A.B.; SPORN, M.B.; ASSOIAN, R.K.; SMITH, J.M.; ROCHE, N.S.; WAKEFIELD, L.M.; HEINE, U.I.; LIOTTA, L.A.; FALANGA, V.; KEHRL, J.H.; FAUCI, A.S. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, n. 12, p. 4167-4171, 1986.
- ROBINSON, J.M.; BADWEY, J.A. Production of active oxygen species by phagocytic leukocytes. **Immunol. Ser.**, v. 60, p. 159-178, 1994.
- ROCHA, M.M.; DASSIN, T.; LIRA, R.; LIMA, E.L.; SEVERO, L.C.; LONDERO, A.T. Sporotrichosis in patient with AIDS: report of a case and review. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 18, p. 133-136, 2001.
- RODRIGUEZ-DEL VALLE, N.; DEBS-ELIAS, N.; ALSINA, A. effects of caffeine, cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in the development of the mycelial form of *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia**, v. 86, p. 29-33, 1984.
- RODRIGUEZ-DEL VALLE, N.; ROSARIO, M.; TORRES-BLASINI, G. Effects of pH, temperature, aeration, and carbon source on the development of the mycelial and yeast forms of *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia**, v. 82, p. 83-88, 1983.
- RODRIGUEZ-DEL VALLE, N.; RODRIGUEZ-MEDINA, J.R. Calcium stimulates molecular and cellular events during the yeast-to-mycelium transition in *Sporothrix schenckii*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 31, p. 43-53, 1993
- ROEDER, A.; KIRSCHNING, C.J.; RUPEC, R.A.; SCHALLER, M.; KORTING, H.C. Toll-like receptors and innate antifungal responses. **Trends Microbiol.**, v.12, p. 44-49, 2004.
- ROGLER, G.; HAUSMANN, M.; VOGL, D.; ASCHENBRENNER, E.; ANDUS, T.; FALK, W.; ANDREESSEN, R.; SCHÖLMERICH, J.; GROSS, V. Isolation and phenotypic characterization of colonic macrophages. **Clin. Exp. Immunol.**, v 112, p. 205–215, 1998.
- ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, p.1-23, 2004.
- ROMANI, L.; KAUFMANN, S.H. Immunity to fungi. **Res. Immunol.**, v. 149, p. 277-281, 1998.
- ROMANI, L.; PUCETTI, P.; MENCACCI, A.; CENCI, E.; SPACCAPELO, R.; TONNETTI, L.; GROHMANN, U.; BISTONI, F. Neutralization of IL-10 up-regulates nitric oxide production and protects susceptible mice from challenge with *Candida albicans*. **J. Immunol.**, v. 152, p. 3514-3521, 1994.
- ROMERO-MARTINEZ, R.; WHEELER, M.; GUERRERO-PLATA, A.; RICO, G.; TORRES-GUERRERO, H. Biosynthesis and Functions of Melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infection Immun.**, v. 68, n. 6, p. 3696–3703, 2000.

- ROSENWASSER, L.J.; DINARELLO, C.A.; ROSENTHAL, A.S. Adherent cell function in murine T-lymphocyte antigen recognition. IV. Enhancement of murine T-cell antigen recognition by human leukocytic pyrogen. **J. Exp. Med.**, v. 150, n. 3, p. 709-14, 1979.
- ROSSI, G.R.; CERVI, L.A.; GARCÍA, M.M.; CHIAPELLO, L.S.; SASTRE, D.A.; MASIH, D.T. Involvement of nitric oxide in protecting mechanism during experimental cryptococcosis. **Clin. Immunol.**, v. 90, n. 2, p. 256-265, 1999.
- ROTSTEIN, D.; PARODO, J.; TANEJA, R.; MARSHALL, J.C. Phagocytosis of *Candida albicans* induces apoptosis of human neutrophils. **Shock**, v. 14, p. 278-283. 2000.
- RYAN, K.A.; SMITH, M.F.; SANDERS, M.K.; ERNST, P.B. Reactive Oxygen and Nitrogen Species Differentially Regulate Toll-Like Receptor 4-Mediated Activation of NF- κ B and Interleukin-8 Expression. **Infection Immun.**, v. 72, n. 4, p. 2123–2130, 2004.
- SAMONIS, G.; BAFALOUKOS, D. Fungal infections in cancer patients: an escalating problem. **In Vivo**, v. 6, n. 2, p. 183-193, 1992.
- SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, v. 45, p. 528-537, 2000.
- SARIH, M.; SOUVANNAVONG, V.; ADAM, A. Nitric oxide synthase induces macrophage death by apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 191, p. 503-508, 1993.
- SASADA, M.; JOHNSTON, R.B.JR. Macrophage microbicidal activity. Correlation between phagocytosis-associated oxidative metabolism and the killing of *Candida* by macrophages. **J. Exp. Med.**, v. 152, n. 1, p. 85-98, 1980.
- SAVILL, J.; FADOK, V.; HENSON, P.; HASLETT, C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. **Immunol. Today**, v.14 , n. 3, p.131-136, 1993.
- SCANGA, C.A.; ALIBERTI, J.; JANKOVIC, D.; TILLOY, F.; BENNOUNA, S.; DENKERS, E.Y.; MEDZHITOV, R.; SHER, A. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. **J Immunol.**, v.168, n. 12, p. 5997-6001, 2002.
- SCHEINMAN, R.I.; COGSWELL, P.C.; LOFQUIST, A.K.; BALDWIN, A.S. JR. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. **Science**, v. 270, p. 283–286, 1995.
- SCHENCK, B. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to sporotrichia. **John Hopkins Hosp.**, v. 9, p. 286– 290, 1898.
- SCHMIDT, H.H.; WALTER, U. NO at work. **Cell**, v.78, n. 6, p. 919-925, 1994.

- SCHROMM, A.B.; LIEN, E.; HENNEKE, P.; CHOW, J.C.; YOSHIMURA, A.; HEINE, H.; LATZ, E.; MONKS, B.G.; SCHWARTZ, D.A.; MIYAKE, K.; GOLENBOCK, D.T. Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. **J. Exp. Med.**, v. 194, p. 79–88, 2001.
- SCHUBACH, A.; DE LIMA BARROS, M.B.; SCHUBACH, T.M.; FRANCESCONI-DO-VALLE, A.C.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; SUED, M.; DE MATOS SALGUEIRO, M.; FIALHO-MONTEIRO, P.C.; REIS, R.S.; MARZOCHI, K.B.; WANKE, B.; CONCEIÇÃO-SILVA, F. Primary conjunctival sporotrichosis: two cases from a zoonotic epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Cornea**, v. 24, n. 4, p. 491-493, 2005.
- SCHUBACH, A.O.; SCHUBACH, T.M.; BARROS, M.B. Epidemic cat-transmitted sporotrichosis. **N. Engl. J. Med.**, v. 353, p. 1185–1186, 2005.
- SCHUBACH, T.M.P.; SCHUBACH, A.O.; REIS, R.S.; CUZZI-MAYA, T.; BLANCO, T.C.M.; MONTEIRO, D.F.; BARROS, M.B.L.; BRUSTEIN, R.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; MONTEIRO, P.C.F.; WANKE, B. *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Mycopathologia**, v. 153, p. 83-86, 2002.
- SCHUBACH, T.M.P.; VALLEM, A.C.F.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; MONTEIRO, P.C.F.; REIS, R.S.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; MARZOCHI, K.B.F.; SCHUBACH, A. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). **Med. Mycol.**, v. 39, p. 147-149, 2001.
- SCHUETZE, N.; SCHOENEBERGER, S.; MUELLER, U.; FREUDENBERG, M.A.; ALBER, G.; STRAUBINGER, R.K. IL-12 family members: differential kinetics of their TLR4-mediated induction by *Salmonella enteritidis* and the impact of IL-10 in bone marrow-derived macrophages. **International Immunol.**, v. 17, n. 5, p. 649–659, 2005.
- SCHWACHA, M.G.; EISENSTEIN, T.K. Interleukin-12 is critical for induction of nitric oxide-mediated immunosuppression following vaccination of mice with attenuated *Salmonella typhimurium*. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 12, p. 4897-4903, 1997.
- SERRANO, S.; RODRIGUES-DEL VALLE, N. Calcium uptake and efflux during the yeast to mycelium transition in *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia**, v. 112, p. 1-9, 1990.
- SGARBI, D.B.; DA SILVA, A.J.; CARLOS, I.Z.; SILVA, C.L.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C.S. Isolation of ergosterol peroxide and its reversion to ergosterol in the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia**, v. 139, n. 1, p. 9-14. 1997.

- SHAO, X.; RIVERA, J.; NIANG, R.; CASADEVALL, A.; GOLDMAN, D.L. A Dual Role For TGF- β 1 in the Control and Persistence of Fungal Pneumonia. **J. Immunol.**, v. 175, p. 6757–6763, 2005.
- SHIMAZU, R.; AKASHI, S.; OGATA, H.; NAGAI, Y.; FUKUDOME, K.; MIYAKE, K.; KIMOTO, M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. **J. Exp. Med.**, 189, p. 1777–1782, 1999.
- SHIRAISHI, A.; NAKAGAKI, K.; ARAI, T. Experimental sporotrichosis in congenitally athymic (nude) mice. **J. Reticuloendothel. Soc.**, v. 26, n. 3, p. 333-336, 1979.
- SHIRAISHI, A.; NAKAGAKI, K.; ARAI, T. Role of cell-mediated immunity in the resistance to experimental sporotrichosis in mice. **Mycopathologia**, v. 120, n. 1, p. 15-21, 1992.
- SHOHAM, S.; HUANG, C.; CHEN, J.M.; GOLENBOCK, D.T.; LEVITZ, S.M. Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF- α release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. **J. Immunol.**, v. 166, p. 4620-4626, 2001.
- SHOHAM, S.; LEVITZ, S. M. The immune response to fungal infections. **Br. J. Haematol.**, v. 129, p.569-582, 2005.
- SILVA, A.C. da; BEZERRA, L.M.; AGUIAR, T.S.; TAVARES, D.; ARAUJO, L.M.; PINTO, C.E.; RIBEIRO, O.G. Effect of genetic modifications by selection for immunological tolerance on fungus infection in mice. **Microbes Infect.**, v. 3, n. 3, p. 215-222, 2001.
- SILVA-VERGARA, M.L.; MANEIRA, F.R.; DE OLIVEIRA, R.M.; SANTOS, C.T.; ETCHEBEHERE, R.M.; ADAD, S.J. Multifocal sporotrichosis with meningeal involvement in a patient with AIDS. **Med. Mycol.**, v. 43, p. 187–190, 2005.
- SMILEY, S.T.; KING, J.A.; HANCOCK, W.W. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. **J Immunol.**, v. 167, n. 5, p. 2887-2894, 2001.
- SPACCAPELO, R.; ROMANI, L.; TONNETTI, L.; CENCI, E.; MENCACCI, A.; DEL SERO, G.; TOGNELLINI, R.; REED, S.G.; PUCETTI, P.; BISTONI, F. TGF-beta is important in determining the in vivo patterns of susceptibility or resistance in mice infected with *Candida albicans*. **J. Immunol.**, v. 155, n. 3, p. 1349-1360, 1995.
- SPITS, H.; DE WAAL MALEFYT, R. Functional characterization of human IL-10. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 99, n. 1, p. 8-15, 1992.
- STELLER, H. Mechanisms and genes of cellular suicide. **Science**, v. 267, p. 1445-1449, 1995.
- STERN, A.S.; PODLASKI, F.J.; HULMES, J.D.; PAN, Y.C.; QUINN, P.M.; WOLITZKY, A.G.; FAMILLETTI, P.C.; STREMLLO, D.L.; TRUITT, T.; CHIZZONITE, R.; GATELY, M.K.

- Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 87, n. 17, p. 6808-6812, 1990.
- STUEHR, D.J.; MARLETTA, M.A. Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines. **Cancer Res.**, v. 47, n. 21, p. 5590-4, 1987.
- STUMHOFER, J.S.; LAURENCE, A.; WILSON, E.H.; HUANG, E.; TATO, C.M.; JOHNSON, L.M.; VILLARINO, A.V.; HUANG, Q.; YOSHIMURA, A.; SEHY, D.; SARIS, C.J.; O'SHEA, J.J.; HENNIGHAUSEN, L.; ERNST, M.; HUNTER, C.A. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. **Nat. Immunol.**, v.7, p. 937-945, 2006.
- SUZUKI, K.; KAWASAKI, M.; ISHIZAKI, H. Analyses of restriction profiles of mitochondrial DNA from *Sporothrix schenckii* and related fungi. **Mycopathologia**, v. 103, p. 147-151, 1988.
- SVENNERHOLM, L.; FREDMAN, P. A procedure for the quantitative isolation of brain gangliosides. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 617, p. 97-109, 1980
- SWAIN, S.L.; WEINBERG, A.D.; ENGLISH, M.; HUSTON, G. (1990). IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. **J. Immunol.**, v. 145, p. 3796-3806, 1990.
- TACHIBANA, T.; MATSUYAMA, T.; MITSUYAMA, M. Characteristic infectivity of *Sporothrix schenckii* to mice depending on routes of infection and inherent fungal pathogenicity. **Med. Mycol.**, v. 36, n. 1, p. 21-27, 1998.
- 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.**, v. 37, p. 397-404, 1999.
- TACHIBANA, T.; MATSUYAMA, T.; ITO, M.; MITSUYAMA, M. *Sporothrix schenckii* thermo-intolerant mutants losing fatal visceral infectivity but retaining high cutaneous infectivity. **Med. Mycol.**, v. 39, n. 3, p. 295-298, 2001.
- TADA, H.; NEMOTO, E.; SHIMAUKI, H.; WATANABE, T.; MIKAMI, T.; MATSUMOTO, T.; OHNA, N.; TAMURA, H.; SHIBATA, K.; AKASHI, S.; MIYAKE, K.; SUGAWARA, S.; TAKADA, H. *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida albicans*-derived mannan induced production of tumor necrosis factor α by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner. **Microbiol. Immunol.**, v. 46, n. 7, p. 503-512, 2002.
- TAKATA, M.; ISHIZAKI, H. Correlation among culture times, sugar composition, and biological activities of *Sporothrix schenckii* antigens. **Mycopathologia**, v. 84, p. 31-39, 1983.

- TAKEDA, K.; AKIRA, S. Microbial recognition by Toll-like receptors. **J. Dermatol. Sci**, v. 34, p. 71-82, 2004.
- TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **Int Immunol.**, v. 17, n. 1, p. 1-14, 2005.
- TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 21, p. 335–376, 2003.
- TAKEDA, Y.; KAWASAKI, M.; ISHIZAKI, H. Phylogeny and molecular epidemiology of *Sporothrix schenckii* in Japan. **Mycopathologia**, v. 116, p. 9-14, 1991.
- TAKEMURA, R.; WERB, Z. Secretory products of macrophages and their physiological functions. **Am. J. Physiol.**, v. 246, n. 1 Pt 1, p. C1-9. Review, 1984.
- TAKEUCHI, O.; HOSHINO, K.; KAWAI, T.; SANJO, H.; TAKADA, H.; OGAWA, T.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. **Immunity**, v. 11, p. 443–451, 1999.
- TOMITA, M.; YAMAMOTO, K.; KOBASHI, H.; OHMOTO, M.; TSUJI, T. Immunohistochemical phenotyping of liver macrophages in normal and diseased human liver. **Hepatology**, v. 20, n. 2, p. 317-325, 1994.
- TORRES-MENDOZA, B.M.; VÁZQUEZ-VALLS, E.; GONZÁLEZ-MENDOZA, A. Efecto del yoduro de potasio sobre la respuesta inmune en la esporotricosis. **Ver. Iberoam. Micol.**, v. 14, p. 98-100, 1997.
- TÖTMEYER, S.; FOSTER, N.; KAISER, P.; MASKELL, D.J.; BRYANT, C.E. Toll-like receptor expression in C3H/HeN and C3H/HeJ mice during *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 11, p. 6653-6657, 2003.
- TOURE-BALDE, A.; ARIBOT, G.; TALL, A.; SPIEGEL, A.; ROUSSILHON, C. Apoptosis modulation in mononuclear cells recovered from individuals exposed to *Plasmodium falciparum* infection. **Parasite Immunol.**, v. 22, p. 307–318, 2000.
- TOURE-BALDE, A.; SARTHOU, J. L.; ARIBOT, G.; MICHEL, P.; TRAPE, J. F.; ROGIER, C.; ROUSSILHON, C. *Plasmodium falciparum* induces apoptosis in human mononuclear cells. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 744–750, 1996.
- TRAVASSOS, L.R. “*Sporothrix schenckii*”, In: SZANISZLO P.J. (Ed) **Fungal dimorphism, with emphasis on fungi pathogenic for humans**. New York: Plenum Press, 121-163, 1985.
- TRAVASSOS, L.R. Antigenic structures of *Sporothrix schenckii*, In: KURSTAK, E. (Ed) **Immunology of fungal diseases**. New York: Marcel Dekker, p. 193-221, 1989.

- TRAVASSOS, L.R.; LLOYD, K.O. *Sporothrix schenckii* and related species of *Ceratocystis*. **Microbiol. Rev.**, v. 44, p. 683-721, 1980.
- TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. **Adv. Immunol.**, v. 70, p. 83-243, 1998.
- TSUBOI, R.; SANADA, T.; TAKAMORI, K.; OGAWA, H. Isolation and properties of extracellular proteinases from *Sporothrix schenckii*. **J. Bacteriol.**, v. 169, n. 9, p. 4104-9, 1987.
- TSUNAWAKI, S.; SPORN, M.; DING, A.; NATHAN, C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor- β . **Nature**, v. 334, p. 260-262, 1988.
- UENOTSUCHI, T.; TAKEUCHI, S.; MATSUDA, T.; URABE, K.; KOGA, T.; UCHI, H.; NAKAHARA, T.; FUKAGAWA, S.; KAWASAKI, M.; KAJIWARA, H.; YOSHIDA, S.; MOROI, Y.; FURUE, M. Differential induction of Th1-prone immunity by human dendritic cells activated with *Sporothrix schenckii* of cutaneous and visceral origins to determine their different virulence. **Int Immunol.**, v.18, n. 12, p.1637-1646, 2006.
- URABE, H.; HONBO, S. Sporotrichosis. **Intern. J. Dermatol.**, v. 25, n. 4, p. 255-257, 1986.
- URBAN, J.L.; SHEPARD, H.M.; ROTHSTEIN, J.L.; SUGARMAN, B.J.; SCHREIBER, H. Tumor necrosis factor: a potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 83, n. 14, p. 5233-5237, 1986.
- VAN DER GRAAF, C.A.; NETEA, M.G. VERSCHUEREN; I., VAN DER MEER, J.W.; KULLBERG, B.J. Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 7458-7464, 2005.
- VAN DUIN, D.; A. CASADEVALL, AND J. D. NOSANCHUK. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibility to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, p. 3394-3400. 2002.
- VAN OOSTVELDT, K.; DOSOGNE, H.; BURVENICH, C.; PAAPE, M.J.; BROCHEZ, V.; VAN DEN EECKHOUT, E. Flow cytometric procedure to detect apoptosis of bovine polymorphonuclear leukocytes in blood. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 70, p. 125-133, 1999.
- VASQUEZ-TORRES, A.; JONES-CARSON, J.; WAGNER, R.D.; WARNER, T.; BALISH, E. Early resistance of interleukin-10 knock-out mice to acute systemic candidiasis. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 670-674, 1999.
- VAUX, D.L. Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 90, n. 3, p. 786-9, 1993.

- VAUX, D.L., HAECKER, G., STRASSER, A. An evolutionary perspective on apoptosis. **Cell**, v. 76, n. 5, p. 777-779, 1994.
- VIRIYAKOSOL, S.; FIERER, J.; BROWN, G.D.; KIRKLAND, T.N. Innate immunity to the pathogenic fungus *Coccidioides posadasii* is dependent on Toll-like receptor 2 and Dectin-1. **Infect Immun.**, v. 73, n. 3, p. 1553-1560, 2005.
- VISINTIN, A.; MAZZONI, A.; SPITZER, J.H.; WYLLIE, D.H.; DOWER, S.K.; SEGAL, D.M. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 166, p. 249–255, 2001.
- VODOVOTZ, Y.; BOGDAN, C.; PAIK, J.; XIE, Q.W.; NATHAN, C. Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. **J. Exp. Med.**, v. 178, n. 2, p. 605-613, 1993.
- VOLL, R.E.; HERRMANN, M.; ROTH, E.A.; STACH, C.; KALDEN, J.R.; GIRKONTAITE, I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. **Nature**, v. 390, p. 350-351, 1997.
- VON KNETHEN, A.; CALLSEN, D.; BRÜNE, B. NF- κ B and AP-1 activation by nitric oxide attenuated apoptotic cell death in RAW 264.7 macrophages. **Mol. Biol. Cell**, v. 10, p. 361-372, 1999.
- VON KNETHEN, A.; CALLSEN, D.; BRÜNE, B. Superoxide attenuates macrophage apoptosis by NF- κ B and AP-1 activation that promotes cyclooxygenase-2 expression. **J. Immunol.**, v. 163, n. 5, p. 2858-2866, 1999.
- WANG, J.E.; WARRIS, A.; ELLINGSEN, E.A.; JØRGENSEN, P.F.; FLO, T.H.; ESPEVIK, T.; SOLBERG, R.; VERWEIJ, P.E.; AASEN, A.O. Involvement of CD14 and Toll-Like Receptors in Activation of Human Monocytes by *Aspergillus fumigatus* Hyphae. **Infection Immun.** v. 69, n. 4, p. 2402–2406, 2001.
- WATSON, J.; RIBLET, R. Genetic control of responses to bacterial lipopolysaccharides in mice. I. Evidence for a single gene that influences mitogenic and immunogenic responses to lipopolysaccharides. **J. Exp. Med.**, v. 140, p. 1147-1161, 1974.
- WATTS, C. Location, location, location: identifying the neighborhoods of LPS signaling. **Nature**, v. 9, p. 343-345, 2008
- WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. The induction of apoptosis by bacterial pathogens. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 53, p. 155–187, 1999.
- WEISS, S.J.; LOBUGLIO, A.F. Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. **Lab. Invest.**, v. 47, n. 1, p. 5-18, 1982.
- WELSH, R.D. Sporotrichosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 223, p. 1123–1126, 2003.

- WHITESIDE, T.L. Cytokine assays. **Biotechniques**, Suppl: 4 – 8, 10, 12 – 5, 2002.
- WILLIAMS, M.S.; NOGUCHI, S.; HENKART, P.S.; OSAWA, Y. Nitric oxide synthase plays a signalling role in TCR-triggered apoptotic death. **J. Immunol.**, v. 161, p. 6526-6531, 1998.
- WISSINK, S.; VAN HEERDE, E.C.; VAND DER BURG, B.; VAN DER SAAG, P.T. A dual mechanism mediates repression of NF-kappa B activity by glucocorticoids. **Mol. Endocrinol.** v. 12, p. 355–363, 1998.
- WOLF, S.F.; TEMPLE, P.A.; KOBAYASHI, M.; YOUNG, D.; DICIG, M.; LOWE, L.; DZIALO, R.; FITZ, L.; FERENZ, C.; HEWICK, R.M.; KELLEHER, K.; HERRMANN, S.H.; CLARK, S.C.; AZZONI, L.; CHAN, S.H.; TRINCHIERI, G.; PERUSSIA, B. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and Natural Killer cells. **J. Immunol.**, v. 146, p. 3074-3081, 1991.
- WONG, H.L.; WELCH, G.R.; BRANDES, M.E.; WAHL, S.M. IL-4 antagonizes induction of Fc gamma RIII (CD16) expression by transforming growth factor-beta on human monocytes. **J. Immunol.**, v. 147, n. 6, p. 1843-1848, 1991.
- WRIGHT, S.D.; DETMERS, P.A.; AIDA, Y.; ADAMOWSKI, R.; ANDERSON, D.C.; CHAD, Z.; KABBASH, L.G.; PABST, M.J. CD18-deficient cells respond to lipopolysaccharide in vitro. **J. Immunol.**, v. 144, n. 7, p. 2566-2571, 1990.
- WRIGHT, S.D.; RAMOS, R.A.; TOBIAS, P.S.; ULEVITCH, R.J.; MATHISON, J.C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. **Science**, v. 249, p. 1431-1433, 1990.
- WU-HSIEH, B.A.; CHEN, W.; LEE, H.-J. Nitric Oxide Synthase Expression in Macrophages of Histoplasma capsulatum-Infected Mice Is Associated with Splenocyte Apoptosis and Unresponsiveness. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 11, p. 5520–5526, 1998.
- YAMAMOTO, K.; OHMOTO, M.; MATSUMOTO, S.; NAGANO, T.; KOBASHI, H.; OKAMOTO, R.; TSUJI, T. Activated liver macrophages in human liver diseases. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 10, suppl. 1, p. S72-S76, 1995.
- YAMAMOTO, M.; SATO, S.; MORI, K.; HOSHINO, K.; TAKEUCHI, O.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. **J Immunol.**, v.169, n. 12, p. 6668-6672, 2002.
- YAMAMOTO, Y.; KLEIN, T.W.; FRIEDMAN, H. Involvement of mannose receptor in cytokine interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses, but not in chemokine macrophage inflammatory protein 1 α (MIP-1 α), MIP-2, and

- KC responses, caused by attachment of *Candida albicans* to macrophages. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 1077-1082, 1997.
- YANG, H.; YOUNG, D.W.; GUSOVSKY, F.; CHOW, J.C. Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated Toll-like receptor 4: MD-2 is required for activation of mitogen-activated protein kinases and Elk-1. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 20861-20866, 2000.
- YAP, G.; PESIN, M.; SHER, A. Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN γ production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, v. 165, p. 628–631, 2000.
- YOSHIIKE, T.; LEI, P.C.; KOMATSUZAKI, H.; OGAWA, H. Antibody raised against extracellular proteinases of *Sporothrix schenckii* in *S. schenckii* inoculated hairless mice. **Mycopathologia**, v. 123, n. 2, p. 69-73, 1993.
- YU, H.S.; CHANG, K.L.; YU, C.L.; LI, H.F.; WU, M.T.; WU, C.S.; WU, C.S. Alterations in IL-6, IL-8, GM-CSF, TNF- α , and IFN- γ release by peripheral mononuclear cells in patients with active vitiligo. **J. Invest. Dermatol.**, v. 108, n. 4, p. 527-529, 1997.
- ZAMBONI, D.S.; CAMPOS, M.A.; TORRECILHAS, A.C.; KISS, K.; SAMUEL, J.E.; GOLENBOCK, D.T.; LAUW, F.N.; ROY, C.R.; ALMEIDA, I.C.; GAZZINELLI, R.T. Stimulation of toll-like receptor 2 by *Coxiella burnetii* is required for macrophage production of pro-inflammatory cytokines and resistance to infection. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 52, p. 54405-54415, 2004.
- ZHANG, F. X.; KIRSCHNING, C. J.; MANCINELLI, R.; XU, X.P.; JIN, Y.; FAURE, E.; MANTOVANI, A.; ROTHE, M.; MUZIO, M.; ARDITI, M. Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor- κ B through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 7611–7614, 1999.
- ZHANG, G.; GHOSH, S. Toll-like receptor-mediated NF- κ B activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity, **J. Clin. Invest.**, v. 107, p.13–19, 2001.
- ZHANG, G.; GURTU, V.; MA, J.T.; KAIN, S.R. Sensitive detection of apoptosis using enhanced color variants of annexin V conjugates. In. ZHU, L., CHUN, J. Eds. **Apoptosis Detection and Assay Methods**. California: BioTechniques Books, 143p, 1998.
- ZIEGLER-HEITBROCK, H.W.; FINGERLE, G.; STROBEL, M.; SCRAUT, W.; STELTER, F.; SCHUTT, C.; PASSLICK, B.; PFORTE, A. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. **Eur. J. Immunol.**, v. 23, n. 9), p. 2053-2058, 1993.

ZUGHAIER, S.M.; SHAFER, W.M.; STEPHENS, D.S. Antimicrobial peptides and endotoxin inhibit cytokine and nitric oxide release but amplify respiratory burst response in human and murine macrophages. **Cell. Microbiol.**, v, 7, n. 9, p. 1251-1262, 2005.

ZWILLING, B.S.; EISENSTEIN, T.K. Eds. **Macrophage-Pathogen Interactions**. New York: Marcel Dekker, p. 634, 1994.

9. Apêndice

Tabela 2 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂ – em nmols/2x10⁵ células) para os grupos testados

Linhagem	Semanas	Animais Infectados										Animais Não Infectados (Normais)									
		PMA	PBS	ExoAg	LeL	LeM	PMA	PBS	ExoAg	LeL	LeM	PMA	PBS	ExoAg	LeL	LeM					
C3H/HePas	2 ^a	17,16 ± 5,14	0 ± 0	8,85 ± 0,57	7,52 ± 0,44	18,67 ± 4,25	7,62 ± 1,48	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	12,68 ± 2,70	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	12,68 ± 2,70					
	4 ^a	25,34 ± 7,95	0 ± 0	0 ± 0	8,49 ± 0,85	75,22 ± 14,99	23,63 ± 2,23	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	24,03 ± 2,05	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	24,03 ± 2,05					
	6 ^a	1,88 ± 0,47	0 ± 0	0 ± 0	8,22 ± 2,432	19,50 ± 1,18	17,99 ± 3,92	0 ± 0	0 ± 0	0,91 ± 0,60	21,43 ± 0,91	1,32 ± 1,58	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	21,43 ± 0,91					
	8 ^a	6,51 ± 3,34	0 ± 0	0 ± 0	8,07 ± 1,50	25,43 ± 4,06	21,12 ± 2,67	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	28,51 ± 5,88	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	28,51 ± 5,88					
	10 ^a	8,28 ± 1,33	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	7,64 ± 2,47	18,81 ± 3,20	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	7,76 ± 2,01	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	7,76 ± 2,01					
C3H/HeJ	2 ^a	7,34 ± 1,08	0 ± 0	0,13 ± 0,29	4,77 ± 0,41	11,39 ± 1,38	10,11 ± 1,53	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	5,81 ± 0,59	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	5,81 ± 0,59					
	4 ^a	12,20 ± 2,27	0 ± 0	0,20 ± 0,17	1,42 ± 0,53	6,14 ± 2,61	11,00 ± 1,53	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	5,16 ± 0,81	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	5,16 ± 0,81					
	6 ^a	6,90 ± 2,51	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	3,26 ± 2,93	9,73 ± 1,38	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	5,41 ± 0,87	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	5,41 ± 0,87					
	8 ^a	13,55 ± 1,73	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	2,45 ± 0,30	10,52 ± 2,39	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	6,12 ± 1,54	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	6,12 ± 1,54					
	10 ^a	6,16 ± 0,81	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	12,88 ± 2,79	10,83 ± 0,46	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	5,03 ± 0,75	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	5,03 ± 0,75					

Tabela 3 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de NO (em $\mu\text{mol}/5 \times 10^5$ células) para os grupos testados

Linhagem	Semanas	Animais Infectados										Animais Não Infectados (Normais)									
		LPS	RPMI	ExoAg	LeL	LeM	LPS	RPMI	ExoAg	LeL	LeM	LPS	RPMI	ExoAg	LeL	LeM					
C3H/HePas	2 ^a	37,28 ± 5,53	0,21 ± 0,11	0,33 ± 0,28	17,74 ± 3,68	2,29 ± 0,76	48,06 ± 8,63	0,31 ± 0,34	0,46 ± 0,26	20,22 ± 2,80	1,94 ± 0,26										
	4 ^a	65,96 ± 6,19	0 ± 0	0,74 ± 0,24	37,28 ± 5,63	1,07 ± 1,17	103,02 ± 11,05	0,10 ± 0,22	2,24 ± 0,99	5,77 ± 0,96	0,55 ± 0,28										
	6 ^a	68,83 ± 6,45	0 ± 0	0,21 ± 0,26	42,68 ± 3,50	0,40 ± 0,17	62,25 ± 6,14	0 ± 0	0,33 ± 0,17	0,58 ± 0,06	0,55 ± 0,15										
	8 ^a	70,90 ± 5,79	0,01 ± 0,02	0 ± 0	73,84 ± 1,95	0,51 ± 0,24	85,66 ± 13,39	0,80 ± 1,61	0,26 ± 0,17	60,77 ± 5,28	0,59 ± 0,22										
	10 ^a	65,85 ± 4,91	0 ± 0	0,15 ± 0,28	50,96 ± 5,90	0,45 ± 0,09	63,23 ± 5,28	5,02 ± 0,94	6,86 ± 1,47	46,28 ± 2,54	15,74 ± 2,22										
C3H/HeJ	2 ^a	2,30 ± 0,38	0 ± 0	0,01 ± 0,03	3,62 ± 0,81	0,44 ± 0,28	4,15 ± 0,72	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0										
	4 ^a	10,42 ± 0,77	0 ± 0	0,64 ± 0,08	28,31 ± 3,05	0,73 ± 0,35	3,81 ± 0,47	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0										
	6 ^a	8,89 ± 3,99	0 ± 0	0,22 ± 0,31	1,69 ± 0,15	0,54 ± 0,14	3,12 ± 0,43	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0										
	8 ^a	3,61 ± 0,40	0 ± 0	0,18 ± 0,35	0,27 ± 0,32	0,63 ± 1,02	3,22 ± 0,53	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0										
	10 ^a	2,19 ± 0,56	0,03 ± 0,06	0,10 ± 0,23	4,76 ± 1,10	0,67 ± 0,24	2,63 ± 0,80	0,44 ± 0,35	9,387 ± 0,97	0,15 ± 0,02	0,63 ± 0,32										

Tabela 4 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de IL-1 β (em pg/mL) para os grupos testados

Linhagem	Semanas Fstudas	Animais Infectados										Animais Não Infectados (Normais)									
		LPS	RPMI	ExoAg	LeL	LeM	LPS	RPMI	ExoAg	LeL	LeM	LPS	RPMI	ExoAg	LeL	LeM					
C3H/HePas	2 ^a	527,23 \pm 12,82	0 \pm 0	52,38 \pm 1,17	443,60 \pm 44,57	163,48 \pm 2,04	214,43 \pm 5,26	0 \pm 0	0 \pm 0	229,00 \pm 7,66	0 \pm 0	0 \pm 0	229,00 \pm 7,66	0 \pm 0	0 \pm 0						
	4 ^a	222,43 \pm 11,12	4,75 \pm 0,90	25,15 \pm 1,26	179,73 \pm 6,62	0 \pm 0	148,77 \pm 22,65	0 \pm 0	24,17 \pm 9,82	130,80 \pm 26,99	0 \pm 0	0 \pm 0	130,80 \pm 26,99	26,93 \pm 9,26	0 \pm 0						
	6 ^a	397,68 \pm 74,30	0 \pm 0	31,95 \pm 1,99	251,85 \pm 14,35	36,73 \pm 0,98	102,67 \pm 14,53	0 \pm 0	0 \pm 0	35,13 \pm 5,55	0 \pm 0	0 \pm 0	35,13 \pm 5,55	0 \pm 0	0 \pm 0						
	8 ^a	314,50 \pm 24,90	0 \pm 0	74,30 \pm 6,06	433,50 \pm 16,35	22,95 \pm 2,51	188,13 \pm 8,23	3,20 \pm 0,61	7,33 \pm 1,27	124,90 \pm 34,04	0 \pm 0	0 \pm 0	124,90 \pm 34,04	0 \pm 0	0 \pm 0						
	10 ^a	247,05 \pm 23,04	17,88 \pm 1,25	75,95 \pm 9,95	315,35 \pm 22,42	92,55 \pm 3,90	235,13 \pm 8,23	0 \pm 0	0 \pm 0	107,33 \pm 8,17	80,27 \pm 6,54	0 \pm 0	0 \pm 0	107,33 \pm 8,17	80,27 \pm 6,54						
C3H/HeJ	2 ^a	134,68 \pm 9,68	60,08 \pm 7,23	8,00 \pm 0,75	321,80 \pm 8,33	44,65 \pm 1,83	0 \pm 0	0 \pm 0	11,37 \pm 3,83	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	11,37 \pm 3,83	0 \pm 0	0 \pm 0						
	4 ^a	156,72 \pm 9,14	21,23 \pm 2,04	0,75 \pm 0,13	166,98 \pm 4,09	24,28 \pm 2,84	0 \pm 0	0 \pm 0	167,59 \pm 21,64	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	167,59 \pm 21,64	0 \pm 0	0 \pm 0						
	6 ^a	60,58 \pm 11,55	2,75 \pm 0,39	0 \pm 0	54,95 \pm 8,34	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	19,85 \pm 1,08	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	19,85 \pm 1,08	0 \pm 0	0 \pm 0						
	8 ^a	32,96 \pm 1,28	0,74 \pm 0,14	53,70 \pm 4,72	36,67 \pm 2,12	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	94,43 \pm 25,13	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	94,43 \pm 25,13	0 \pm 0	0 \pm 0						
	10 ^a	118,76 \pm 24,74	0 \pm 0	0 \pm 0	177,85 \pm 17,96	70,09 \pm 5,73	0 \pm 0	0 \pm 0	128,28 \pm 6,44	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	128,28 \pm 6,44	0 \pm 0	0 \pm 0						

Tabela 5 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de IL-1 β (em pg/mL) nos soros dos camundongos para os grupos testados

Linhagem	Semanas Estudadas	Animais Infectados	Animais Não Infectados (Normais)
C3H/HePas	2 ^a	195,60 \pm 2,08	70,45 \pm 1,44
	4 ^a	60,95 \pm 10,22	0 \pm 0
	6 ^a	37,30 \pm 6,23	0 \pm 0
	8 ^a	39,65 \pm 8,14	20,60 \pm 2,42
	10 ^a	48,55 \pm 2,94	16,65 \pm 4,79
C3H/HeJ	2 ^a	31,37 \pm 2,12	24,97 \pm 3,10
	4 ^a	54,90 \pm 5,40	29,41 \pm 2,12
	6 ^a	129,1 \pm 22,566	55,04 \pm 5,75
	8 ^a	105,20 \pm 13,00	43,55 \pm 1,27
	10 ^a	51,33 \pm 8,87	25,63 \pm 1,87

Tabela 6 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de TNF- α (em pg/mL) para os grupos testados

Linhagem	Semanas	Fstudadas	Animais Infectados										Animais Não Infectados (Normais)									
			LPS	RPMI	ExoAg	LeL	LeM	LPS	RPMI	ExoAg	LeL	LeM	LPS	RPMI	ExoAg	LeL	LeM					
C3H/HePas	2 ^a	6892,62 ± 781,83	26,65±4,77	35,88± 1,26	2098,42± 293,10	150,58±14,29	2003,75± 321,54	40,75±13,03	42,48±8,24	122,81±41,00	92,77±3,18											
	4 ^a	6062,05± 894,03	115,56±10,76	215,46± 22,60	5599,01± 369,85	260,65±23,83	1783,85± 240,15	363,63±18,16	439,90±93,01	1826,95± 82,38	1423,64± 155,24											
	6 ^a	1808,18± 62,53	14,42±1,75	44,45±7,34	254,19±48,34	170,33±25,84	244,30±46,38	86,58±11,75	83,97±1,72	157,39±56,88	81,69±16,02											
	8 ^a	1559,69± 140,32	37,16±1,41	118,43±6,49	238,62±4,66	142,49±17,70	1681,46± 411,73	62,55± 3,70	35,32±5,60	35,54±6,13	46,68±8,17											
C3H/HeJ	10 ^a	556,15±47,99	62,84±6,64	65,43±0,71	98,64±17,40	57,94±1,77	208,31±17,63	37,67±6,36	23,39±6,34	47,93±11,34	28,18±2,78											
	2 ^a	278,49 ± 11,83	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	42,05 ± 4,55	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0											
	4 ^a	208,24± 18,60	0 ± 0	58,56±7,41	383,94± 29,11	0 ± 0	42,79±4,01	0 ± 0	26,96±5,70	0 ± 0	0 ± 0											
	6 ^a	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	145,37± 20,70	0 ± 0	17,05±2,80	0 ± 0	52,93±5,58	0 ± 0	26,49±2,34											
	8 ^a	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	48,33±0,64	0 ± 0	27,87± 1,57	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0											
10 ^a	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	149,86±8,55	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0												

Tabela 7 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de TNF- α (em pg/mL) nos soros dos camundongos para os grupos testados

Linhagem	Semanas Estudadas	Animais Infectados	Animais Não Infectados (Normais)
C3H/HePas	2 ^a	0 \pm 0	0 \pm 0
	4 ^a	21,09 \pm 2,099	9,551 \pm 1,124
	6 ^a	0 \pm 0	0 \pm 0
	8 ^a	34,681 \pm 10,2	8,01 \pm 2,225
	10 ^a	31,792 \pm 9,065	8,107 \pm 1,973
C3H/HeJ	2 ^a	0 \pm 0	0 \pm 0
	4 ^a	0 \pm 0	0 \pm 0
	6 ^a	0 \pm 0	0 \pm 0
	8 ^a	0 \pm 0	0 \pm 0
	10 ^a	0 \pm 0	0 \pm 0

Tabela 8 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de IL-12p70 (em pg/mL) para os grupos testados

Linhagem	Semanas	Animais Infectados										Animais Não Infectados (Normais)									
		LPS	RPMI	ExoAg	LeL	LeM	LPS	RPMI	ExoAg	LeL	LeM	LPS	RPMI	ExoAg	LeL	LeM					
C3H/HePas	2 ^a	1639,28±1,42	0 ± 0	0 ± 0	680,91±22,42	275,27±12,24	2086,98±46,57	0 ± 0	0 ± 0	426,40±78,23	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0						
	4 ^a	984,35±27,84	0 ± 0	0 ± 0	263,38±25,39	0 ± 0	649,59±26,92	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	30,23±1,12							
	6 ^a	142,48±8,54	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0							
	8 ^a	0 ± 0	0 ± 0	447,19±102,14	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	18,27±0,62	35,34±0,47	387,04±43,55	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0							
	10 ^a	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	165,01±17,14	24,00±0,47	123,23±10,08	151,00±25,89	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0							
C3H/HeJ	2 ^a	3936,45±72,17	1483,65±167,22	4017,75±39,0	5526,05±280,16	5049,55±710,92	665,88±190,91	90,32±20,35	62,14±12,28	51,91±2,38	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0							
	4 ^a	4236,75±493,87	2478,25±273,39	8633,55±661,40	3300,75±695,28	5636,35±256,11	966,28±66,83	420 ±48,04	159,85±24,78	424,10±56,21	89,67±7,79	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0							
	6 ^a	148,65±35,06	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	638,00±72,76	35,14±3,67	195,74±29,90	548,54±72,47	128,67±6,74	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0							
	8 ^a	344,68±26,28	27,85±6,69	609,67±50,15	292,83±29,37	595,62±45,40	596,18±45,95	136,51±20,05	76,31±16,02	1331,75±224,70	154,62±16,81	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0							
	10 ^a	855,50±50,64	877,75±30,78	879,88±48,89	1649,50±422,06	6200,63±352,84	774,75±63,50	668,00±12,25	190,17±3,22	626,83±83,09	158,69±28,94	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0							

Tabela 9 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de IL-12p70 (em pg/mL) nos soros dos camundongos para os grupos testados

Linagem	Semanas Estudadas	Animais Infectados	Animais Não Infectados (Normais)
C3H/HePas	2 ^a	0±0	0±0
	4 ^a	0±0	0±0
	6 ^a	0±0	0±0
	8 ^a	0±0	0±0
	10 ^a	0±0	0±0
C3H/HeJ	2 ^a	0±0	0±0
	4 ^a	0±0	0±0
	6 ^a	0±0	0±0
	8 ^a	0±0	0±0
	10 ^a	0±0	0±0

Tabela 10 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de IL-10 (em pg/mL) para os grupos testados

Linhagem	Semanas	Animais Infectados										Animais Não Infectados (Normais)									
		LPS	RPMI	ExoAg	LeL	LeM	LPS	RPMI	ExoAg	LeL	LeM	LPS	RPMI	ExoAg	LeL	LeM					
C3H/HePas	2 ^a	781,46±66,18	0±0	0±0	573,20±134,08	0±0	135,52±2,55	0±0	0±0	123,81±23,14	497,42±95,18	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0					
	4 ^a	944,94±17,98	0±0	0±0	890,68±69,68	0±0	143,03±35,38	0±0	0±0	166,24±25,41	445,13±100,12	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0					
	6 ^a	782,11±44,80	0±0	312,50±56,68	400,87±49,52	0±0	367,26±102,68	0±0	0±0	107,49±12,25	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0					
	8 ^a	0±0	1,60±3,58	0±0	0±0	0±0	440,56±30,64	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0					
	10 ^a	574,75±137,46	0±0	1252,18±241,04	1523,77±201,21	372,29±200,97	591,97±131,50	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0					
C3H/HeJ	2 ^a	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0					
	4 ^a	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0					
	6 ^a	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0					
	8 ^a	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0					
	10 ^a	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0					

Tabela 11 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de IL-10 (em pg/mL) nos soros dos camundongos para os grupos testados

Linhagem	Semanas Estudadas	Animais Infectados	Animais Não Infectados (Normais)
C3H/HePas	2 ^a	0±0	0±0
	4 ^a	0±0	9,24±8,52
	6 ^a	217,50±20,22	9,84±8,26
	8 ^a	0±0	10,06±8,96
	10 ^a	654,09±62,47	40,84±7,20
C3H/HeJ	2 ^a	0±0	0±0
	4 ^a	0±0	0±0
	6 ^a	0±0	0±0
	8 ^a	0±0	0±0
	10 ^a	0±0	0±0

Tabela 12 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de TGF- β (em pg/mL) para os grupos testados

Linhagem	Semanas	Fstudadas	Animais Infectados										Animais Não Infectados (Normais)									
			LPS	RPMI	ExoAg	LeL	LeM	LPS	RPMI	ExoAg	LeL	LeM	LPS	RPMI	ExoAg	LeL	LeM					
C3H/HePas	2 ^a	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0						
	4 ^a	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0						
	6 ^a	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0						
	8 ^a	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0						
	10 ^a	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0						
C3H/HeJ	2 ^a	1348,35 \pm 74,79	0 \pm 0	392,91 \pm 142,94	3125,99 \pm 204,03	2450,42 \pm 261,64	0,65 \pm 0,38	0,26 \pm 0,03	0,30 \pm 0,10	0,50 \pm 0,18	0,43 \pm 0,08											
	4 ^a	546,02 \pm 9,93	0 \pm 0	430,91 \pm 33,80	1413,26 \pm 349,62	711,79 \pm 62,71	0,35 \pm 0,02	0,44 \pm 0,04	0,35 \pm 0,05	0,42 \pm 0,02	0,39 \pm 0,09											
	6 ^a	176,96 \pm 23,32	0 \pm 0	95,66 \pm 2,16	1854,90 \pm 118,69	151,59 \pm 32,15	0,28 \pm 0,06	0,23 \pm 0,05	0,29 \pm 0,06	0,28 \pm 0,06	0,28 \pm 0,06											
	8 ^a	2071,76 \pm 16,49	0 \pm 0	385,49 \pm 72,95	3162,80 \pm 89,41	3269,16 \pm 134,93	0,34 \pm 0,08	0,95 \pm 0,29	1,40 \pm 0,29	0,36 \pm 0,11	0,44 \pm 0,18											
	10 ^a	1037,44 \pm 78,99	0 \pm 0	1103,30 \pm 118,47	2831,05 \pm 192,17	3363,05 \pm 405,76	0,31 \pm 0,07	0,35 \pm 0,29	0,64 \pm 0,29	0,33 \pm 0,10	0,40 \pm 0,16											

Tabela 13 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de TGF- β (em pg/mL) nos soros dos camundongos para os grupos testados

Linhagem	Semanas Estudadas	Animais Infectados	Animais Não Infectados (Normais)
C3H/HePas	2 ^a	15186,01 \pm 209,21	1333,72 \pm 265,042
	4 ^a	2452,62 \pm 703,165	271,01 \pm 22,661
	6 ^a	3878,31 \pm 657,51	2552,25 \pm 14,451
	8 ^a	5598,70 \pm 1811,61	2341,15 \pm 925,84
	10 ^a	6222,94 \pm 1180,37	1083,37 \pm 442,39
C3H/HeJ	2 ^a	1078,07 \pm 69,74	452,09 \pm 78,19
	4 ^a	2078,73 \pm 129,72	683,57 \pm 103,29
	6 ^a	170,97 \pm 9,93	380,50 \pm 30,40
	8 ^a	0 \pm 0	288,00 \pm 14,14
	10 ^a	312,50 \pm 64,34	177,00 \pm 29,698

Tabela 14 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de IL-1 intracelular (MIF) para os grupos testados

Linhagem	Semanas Estudadas	Animais Infectados		Animais Não Infectados (Normais)	
		PMA + Ionomicina	RPMI	PMA + Ionomicina	RPMI
C3H/HePas	2 ^a	1822,333±514,737	915,333±38,695	1862,667±105,642	1651,333±319,052
	4 ^a	1451,667±203,905	529±99,685	2415,333±390,903	1666,667±279,303
	6 ^a	3803±802,971	2975±366,921	2194,333±163,635	1596,667±68,966
	8 ^a	478,5±124,669	165,75±17,193	2374±367,449	2078,667±194,068
	10 ^a	606,75±143,539	711,75±110,195	572,667±7,371	393,667±81,132
C3H/HeJ	2 ^a	56±4,32	0±0	61±4,243	12±1,414
	4 ^a	262±14,353	123,25±17,84	154,5±20,506	78±9,899
	6 ^a	132,5±25,013	110,75±11,325	270±8,485	132,5±7,778
	8 ^a	310,25±6,702	292,75±11,73	225±53,777	122,667±26,026
	10 ^a	174,25±15,543	40,25±17,783	213,333±61,273	162±27,221

Tabela 15 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de TNF- α intracelular (MIF) para os grupos testados

Linhagem	Semanas Estudadas	Animais Infectados		Animais Não Infectados (Normais)	
		PMA + Ionomicina	RPMI	PMA + Ionomicina	RPMI
C3H/HePas	2 ^a	942,333 \pm 8,083	2305,667 \pm 797,284	448,333 \pm 137,23	7028,667 \pm 124,396
	4 ^a	2978,667 \pm 723,31	3021 \pm 492,816	499 \pm 62,217	4498,333 \pm 394,842
	6 ^a	8338,667 \pm 980,986	21368,67 \pm 1714,202	2115,333 \pm 171,001	3154,667 \pm 117,798
	8 ^a	2182 \pm 681,694	1603,5 \pm 292,607	2067 \pm 70,406	8060,667 \pm 792,249
	10 ^a	715,25 \pm 40,352	913,5 \pm 124,821	528,333 \pm 88,822	336,667 \pm 35,162
C3H/HeJ	2 ^a	473 \pm 61,286	139 \pm 14,526	466,333 \pm 11,06	199,333 \pm 20,404
	4 ^a	415,667 \pm 110,206	174,333 \pm 18,877	440 \pm 84,611	169,333 \pm 23,459
	6 ^a	188 \pm 77,949	183 \pm 11,269	280,333 \pm 9,504	175 \pm 14,526
	8 ^a	292 \pm 52,374	208 \pm 19,079	420 \pm 116,825	186 \pm 17,521
	10 ^a	256,667 \pm 42,028	16 \pm 31,48	794 \pm 128,293	183 \pm 7

Tabela 16 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de IL-12 intracelular (MIF) para os grupos testados

Linhagem	Semanas Estudadas	Animais Infectados		Animais Não Infectados (Normais)	
		PMA + Ionomicina	RPMI	PMA + Ionomicina	RPMI
C3H/HePas	2 ^a	458±64,086	618,667±119,001	0±0	0±0
	4 ^a	1052,333±221,209	1017,667±257,617	0±0	0±0
	6 ^a	1629,5±71,928	102,25±13,276	0±0	0±0
	8 ^a	137,25±32,694	270,75±40,795	97,333±7,506	161±46,808
	10 ^a	182,25±2,754	58,5±6,191	140,333±23,629	86,667±7,024
C3H/HeJ	2 ^a	76,333±5,508	0±0	64,667±8,386	0±0
	4 ^a	153±6,557	148,667±14,048	151,333±27,934	223±14,107
	6 ^a	261,667±45,092	1162,333±199,239	149±22,716	114±5,292
	8 ^a	73,667±9,292	116,333±14,224	154,667±21,385	318,667±50,013
	10 ^a	0±0	0±0	142,667±21,548	145±29,597

Tabela 17 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de IL-10 intracelular (MIF) para os grupos testados

Linhagem	Semanas Estudadas	Animais Infectados		Animais Não Infectados (Normais)	
		PMA + Ionomicina	RPMI	PMA + Ionomicina	RPMI
C3H/HePas	2 ^a	134,333±9,292	282±145,351	0±0	0±0
	4 ^a	1569±335,26	1040±67,134	0±0	0±0
	6 ^a	144,667±12,055	272,667±11,06	0±0	0±0
	8 ^a	349,667±56,536	0±0	228±22,65	145±50,863
	10 ^a	109,333±5,508	65±4	168,667±3,215	70,333±4,726
C3H/HeJ	2 ^a	0±0	0±0	52,667±2,517	6±1
	4 ^a	256,333±27,538	123±42,579	165,333±6,429	34±3,606
	6 ^a	0±0	2,667±4,619	126,667±8,622	150,667±16,166
	8 ^a	55,667±4,509	124,667±20,404	156±31,432	155±31,48
	10 ^a	333,333±8,083	352,333±46,372	116,333±3,786	165,667±2,082

Tabela 18 – Médias e desvio padrão dos valores de produção de TGF- β intracelular (MIF) para os grupos testados

Linhagem	Semanas Estudadas	Animais Infectados		Animais Não Infectados (Normais)	
		PMA + Ionomicina	RPMI	PMA + Ionomicina	RPMI
C3H/HePas	2 ^a	109,667 \pm 8,021	873,333 \pm 114,001	0 \pm 0	0 \pm 0
	4 ^a	2179 \pm 143,042	1270,667 \pm 92,878	0 \pm 0	0 \pm 0
	6 ^a	199,667 \pm 13,429	16,333 \pm 4,163	0 \pm 0	0 \pm 0
	8 ^a	208,333 \pm 13,051	78 \pm 5,292	74,333 \pm 4,041	119 \pm 3,606
	10 ^a	231,667 \pm 15,308	85,333 \pm 4,509	58,333 \pm 7,234	84,333 \pm 4,509
C3H/HeJ	2 ^a	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
	4 ^a	58 \pm 4,359	110,333 \pm 10,504	257,667 \pm 16,073	75,333 \pm 3,512
	6 ^a	6 \pm 5,292	0 \pm 0	132,333 \pm 4,509	90,333 \pm 9,018
	8 ^a	141 \pm 45,527	187 \pm 65,59	247,333 \pm 87,934	95,333 \pm 9,292
	10 ^a	0 \pm 0	0 \pm 0	132,333 \pm 3,512	92,333 \pm 5,508

Tabela 19 – Médias e desvio padrão dos valores de NF-κB nos extratos nucleares (ng/mL) para os grupos testados

Linagem	Semanas Estudadas	Animais Infectados	Animais Não Infectados (Normais)
C3H/HePas	2 ^a	926,083±22,452	134,082±18,578
	4 ^a	265,553±27,491	202,283±70,922
	6 ^a	512,574±31,024	75,756±10,129
	8 ^a	242,331±25,332	69,97±13,134
	10 ^a	260,317±21,74	111,385±19,786
C3H/HeJ	2 ^a	506,662±90,77	0±0
	4 ^a	56,302±4,401	0±0
	6 ^a	143,553±27,583	0±0
	8 ^a	67,384±6,44	0±0
	10 ^a	70,896±4,254	39,556±6,449

Tabela 20 – Médias e desvio padrão dos valores de CD14/MD-2 (%) grupos testados

Linhagem	Semanas Estudadas	Animais Infectados		Animais Não Infectados (Normais)	
		CD14	MD-2	CD14	MD-2
C3H/HePas	2 ^a	14,33±0,95	0,43±0,49	4,33±1,40	0,20±0,20
	4 ^a	2,63±1,74	0,03±0,06	4,17±1,21	0,30±0,20
	6 ^a	21,57±1,36	0,33±0,29	5,27±0,90	0,70±0,56
	8 ^a	0,30±0,20	0,05±0,06	0,37±0,21	0,10±0
	10 ^a	0,28±0,05	0,05±0,06	0,60±0,20	0,33±0,12
C3H/HeJ	2 ^a	6,98±1,47	1,05±0,31	0,40±0,14	0,05±0,07
	4 ^a	5,20±1,94	0,25±0,13	1,25±0,92	0,15±0,07
	6 ^a	0,20±0,10	0 ± 0	0,25±0,07	0 ± 0
	8 ^a	0,18±0,04	0,04±0,05	0,25±0,07	0,10±0
	10 ^a	0,14±0,10	0,10±0,06	0,20±0,14	0,05±0,07

Tabela 21 – Médias e desvio padrão dos valores de apoptose/necrose (%) grupos testados

Linhagem	Semanas Estudadas	Animais Infectados		Animais Não Infectados (Normais)	
		Apoptose	Necrose	Apoptose	Necrose
C3H/HePas	2 ^a	27,43±0,12	15,37±2,67	14,30 ± 2,18	15,20 ± 1,80
	4 ^a	44,27±1,95	22,57±2,25	15,88 ± 1,21	16,32 ± 1,25
	6 ^a	53,50±4,15	15,87±0,90	10,25±0,13	13,35±1,79
	8 ^a	7,43±2,27	24,40±7,64	4,60±0,18	15,42±2,49
	10 ^a	22,47±6,70	18,43±1,50	17,78±3,93	13,90±2,96
C3H/HeJ	2 ^a	0,88±0,23	12,28±3,46	0,25±0,07	18,55±2,90
	4 ^a	3,98±0,62	9,15±0,95	0,20± 0	22,20±1,13
	6 ^a	1,08±0,64	16,33±2,43	0,15±0,07	23,90±3,54
	8 ^a	0,82±0,68	24,68±1,98	1,10±0,42	20,05±0,07
	10 ^a	0,18±0,40	29,38±5,66	0,15±0,07	24,70±2,40

10. Anexo 1



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



Protocolo CEP/FCF/CAr. nº 36/2005 – Animais em Pesquisa

Interessado: MICHELI FERNANDA SASSÁ

Orientador: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

Projeto: Participação dos receptores "toll like" na resposta imune durante a esporotricose experimental

Parecer nº 43/2005 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considera o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Participação dos receptores "toll like" na resposta imune durante a esporotricose experimental", estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA e é de PARECER FAVORÁVEL à sua execução.

Araraquara, 14 de dezembro de 2005.

Prof.ª. Dr.ª. MARIA VIRGINIA SCARPA GOMES DE OLIVEIRA
Coordenadora do CEP