



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

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

Papel do inflamassoma NLRP3 em modelo de infecção sistêmica por *Sporothrix schenckii*

Amanda Costa Gonçalves

Araraquara

2016



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

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

Papel do inflamassoma NLRP3 em modelo de infecção sistêmica por *Sporothrix schenckii*

Amanda Costa Gonçalves

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: Prof^a Dr^a Iracilda Zeppone Carlos

Araraquara

2016

Ficha Catalográfica

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

G635p Gonçalves, Amanda Costa
Papel do inflamassoma NLRP3 em modelo de infecção sistêmica
por *Sporothrix schenckii* / Amanda Costa Gonçalves. – Araraquara, 2016
155 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. Inflamassoma NLRP3. 2. Citocinas. 3. Piroptose. 4. *Sporothrix
schenckii*. I. Carlos, Iracilda Zeppone, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

AMANDA COSTA GONÇALVES

PAPEL DO INFLAMASSOMA NLRP3 EM MODELO DE INFECÇÃO SISTÊMICA POR *Sporothrix schenckii*

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Doutor(a) em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Araraquara, 09 de dezembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA



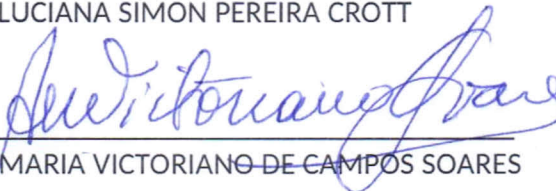
IRACILDA ZEPPONE CARLOS



FERNANDA DE FREITAS ANÍBAL



LUCIANA SIMON PEREIRA CROTT



ANGELA MARIA VICTORIANO DE CAMPOS SOARES



CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO

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 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por meio da concessão da bolsa de doutorado (Processo nº 2013/03190-5).

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a
quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante.”

Augusto Branco

DEDICATÓRIA

Àqueles que são minha essência:

Meus pais, Mara Izilda e José Roberto

Meu noivo, Ricardo

Amo vocês!!!

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais, **Mara Izilda e José Roberto**, por todo incentivo e por não medirem esforços para a realização desta etapa.

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

À minha orientadora, **Profa Dra Iracilda Zeppone Carlos**, pelo direcionamento acadêmico durante todos estes anos, pela oportunidade de tornar possível essa conquista acadêmica e pela confiança depositada em mim.

Ao **Prof Dr Dário Simões Zamboni** por ter cedido os animais utilizados neste estudo.

Ao **Prof Dr Cleverton Roberto de Andrade** pela ajuda na análise histológica.

À minha amiga e técnica do laboratório, **Marisa Campos Polesi Placeres**, pela ajuda durante todas as etapas, pela companhia diária, apoio, carinho e amizade.

Ao amigo de trabalho, **Lucas Souza Ferreira**, pela ajuda nos infinitos experimentos e no desenvolvimento da tese e artigos.

À equipe do **Laboratório de Imunologia Clínica**, Lucas, Francine, Juliana, Malú, Camila, Carol, Deivys, Damiana e Prof Alexander pela amizade e pelos momentos compartilhados.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo apoio financeiro por meio da concessão da bolsa de doutorado (Processo nº 2013/03190-5).

Aos professores que compõem a banca, pela disposição e interesse em avaliar este trabalho.

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 !!!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Graus Celsius

ASC - *Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain*

BHI – *Brain heart infusion*

BSA – Soro albumina bovina

CO₂ – Dióxido de Carbono

DAMP - *Damage-associated molecular pattern*

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dpi – dia pós-infecção

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

EROS – Espécies reativas do oxigênio

F1 – Fração álcali-insolúvel

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

FLICA - *Fluorescent-labeled inhibitor of caspases*

g - Força gravitacional

g – Grama

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

IFN-γ - Interferon gama

IL - Interleucina

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

IRN – Intermediários reativos do nitrogênio

IRO – Intermediários reativos do oxigênio

KO - *Knockout*

LeY – Extrato lipídico

LPS - Lipopolissacarídeo

mL - Mililitro

mM - Milimolar

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

MyD88 – *Myeloid differentiation primary response gene 88*

NaNO₂ – Nitrito de sódio

NaOH - Hidróxido de sódio

NF- κ B – Fator nuclear kappa B

ng – Nanogramas

NK - *Natural killer*

NLR - *NOD-like receptor*

NLRP3 - *NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3*

nmols – Nanomols

NO - Óxido Nítrico

NOD - *Nucleotide-binding oligomerization domain*

PAMP - *Pathogen-associated molecular pattern*

PBS - Solução salina tamponada de fosfatos

PE – Ficoeritrina

PECs - Células do exsudato peritoneal

pg – Picogramas

PI – Iodeto de propídeo

pmol – Picomol

pNPP – p-Nitrofenil fosfato

PRR - *Pattern recognition receptor*

DS - Desvio padrão

TGF- β - *Transforming Growth Factor β*

Th – Linfócito T *helper*

TLR – *Toll-like receptor*

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TRIF – *Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domaind containing adaptor protein inducing*

UFC – Unidades formadoras de colônias

UV - Ultra-violeta

WT - *Wild-type*

μ g - Micrograma

μ L - Microlitro

μ mols – Micromols

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma das atividades desenvolvidas	48
Figura 2. Determinação das unidades formadoras de colônias presentes no baço dos animais infectados por <i>S. schenckii</i>	61
Figura 3. Determinação da presença de fungo no baço dos animais infectados com <i>S. schenckii</i>	62
Figura 4. Determinação do índice esplênico	63
Figura 5. Determinação dos parâmetros esplênicos	64
Figura 6. Avaliação da toxicidade dos antígenos fúngicos nas culturas de macrófagos peritoneais	66
Figura 7. Avaliação da toxicidade dos diferentes estímulos em estudo quando expostos aos esplenócitos totais	67
Figura 8. Determinação da produção de óxido nítrico	69
Figura 9. Produção da citocina IL-1 β	71
Figura 10. Produção da citocina IL-17	72
Figura 11. Produção da citocina IL-18	74
Figura 12. Determinação da produção de IFN- γ	75
Figura 13. Determinação da ativação de caspase-1 e da morte celular por piroptose	77

Figura 14. Gráficos <i>dotplots</i> representativos da ativação de caspase-1	78
Figura 15. Determinação da presença de células Th17, Th1 e Th17/Th1	81
Figura 16. Gráficos <i>dotplots</i> representativos da expressão dos fatores de transcrição Tbet, ROR γ t e Tbet/ROR γ t	82
Figura 17. Determinação da presença de células T reguladoras	83
Figura 18. Determinação da presença de células T citotóxicas	85
Figura 19. Histogramas representativos da determinação de células T citotóxicas	86

SUMÁRIO

Lista de Abreviatuas e Siglas	VIII
Lista de Figuras	X
CAPÍTULO I	
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1. <i>Sporothrix schenckii</i> e a esporotricose	22
2.2. Imunologia e o <i>Sporothrix schenckii</i>	30
2.3. Receptores <i>Nod-like</i> e o inflamassoma	37
3. OBJETIVOS	45
3.1. Objetivo geral	45
3.2. Objetivos específicos	45
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	46
5. MATERIAIS E MÉTODOS	49
5.1. Microrganismo e condições de cultura	49
5.2. Reativação de <i>Sporothrix schenckii</i>	49
5.3. Obtenção dos antígenos de <i>Sporothrix schenckii</i>	49
5.3.1. Extrato lipídico	50
5.3.2. Fração álcali-insolúvel	50
5.4. Animais	51
5.5. Grupos experimentais	51

5.6. Método de infecção dos animais	51
5.7. Determinação do modelo experimental	52
5.7.1. Unidades formadoras de colônias	52
5.7.2. Análise histológica	52
5.7.3. Parâmetros e índices esplênicos	53
5.7.4. Teste de sobrevivência	53
5.8. Obtenção das células do exsudato peritoneal	53
5.9. Obtenção dos esplenócitos totais	54
5.10. Avaliação da viabilidade das células do exsudato peritoneal	54
5.11. Avaliação da viabilidade dos esplenócitos totais	55
5.12. Determinação da produção de óxido nítrico	55
5.13. Obtenção do sobrenadante da cocultura	56
5.14. Determinação da liberação <i>ex vivo</i> de citocinas	56
5.15. Marcação da caspase-1 ativa com FAM-FLICA	57
5.16. Fenotipagem dos esplenócitos	58
5.17. Análise dos resultados	59
6. RESULTADOS	60
6.1. O inflamassoma NLRP3 pode controlar a infecção por <i>S. schenckii</i>	60
6.2. O inflamassoma NLRP3 favorece a resposta inflamatória no baço durante a infecção .	63
6.3. Avaliação da toxicidade dos antígenos do fungo frente às células imunológicas do hospedeiro	65
6.4. A liberação de óxido nítrico é deficiente na ausência do receptor NLRP3 na fase inicial da infecção.....	68
6.5. O inflamassoma NLRP3 está relacionado à produção de IL-1 β e IL-17	70

6.6. A produção de IL-18, mas não de IFN- γ , parece ser dependente do inflamassoma NLRP3	73
6.7. A ativação do inflamassoma NLRP3 desencadeia maior expressão de caspase-1 e morte celular por piroptose	76
6.8. O desenvolvimento de células Th17 e Th17/Th1 é prejudicado na ausência do inflamassoma NLRP3	79
6.9. O inflamassoma não-funcional estimula o desenvolvimento de células T citotóxicas ..	84
7. DISCUSSÃO	87
8. CONCLUSÕES	98
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
 CAPÍTULO II	
1. Artigo	117
ANEXO	155

CAPÍTULO I

Resumo

A esporotricose é uma infecção fúngica causada pelas espécies do complexo *Sporothrix*, incluindo *Sporothrix schenckii sensu stricto*. Os receptores de reconhecimento padrão (PRRs), pertencentes às células da resposta imune inata, reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Uma classe de PRRs que tem sido associada ao reconhecimento de fungos é a dos receptores *Nod-like* (NLR). Após o reconhecimento de PAMPs, os receptores *NLR family pyrin domain-containing 3* (NLRP3), em conjunto com a molécula adaptadora *Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain* (ASC) e com a caspase-1, formam o inflamassoma NLRP3. Quando ativado, este complexo protéico promove a maturação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18, que influenciam no desenvolvimento das respostas imune Th17 e Th1, respectivamente. O inflamassoma NLRP3 também é responsável pela piroptose, uma morte celular inflamatória regulada por caspase-1. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o papel do inflamassoma NLRP3 em modelo de infecção sistêmica por *S. schenckii*, utilizando um camundongo selvagem (WT) e três diferentes camundongos knockout (KO): NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-}. Todos os animais KO foram mais suscetíveis que os WT na infecção por *S. schenckii*. A ativação do inflamassoma NLRP3 foi essencial para a liberação *ex vivo* de NO, IL-1 β , IL-17, IL-18, mas não para IFN- γ . Além disso, *S. schenckii* desencadeou maior expressão de caspase-1 ativa e maior porcentagem de células em piroptose nos animais WT. Em adição, o inflamassoma NLRP3 também foi crucial para a formação de respostas imunes adaptativas, visto que as frequências de células Th17 e Th1/Th17 estavam reduzidas nos animais KO infectados. Por outro lado, a ausência de ativação deste complexo proteico resultou em aumento da frequência de células T citotóxicas nesta infecção. Em conclusão, nossos resultados mostraram que o inflamassoma NLRP3 correlaciona o desencadeamento das respostas imunes inata e adaptativa no reconhecimento de *S. schenckii*, contribuindo com a resposta protetora do hospedeiro durante a infecção por este fungo.

Palavras chaves: Inflamassoma NLRP3, citocinas, piroptose e *Sporothrix schenckii*.

Abstract

Sporotrichosis is a mycosis caused by fungi from the *Sporothrix schenckii* species complex, whose prototypical member is *Sporothrix schenckii sensu stricto*. Pattern recognition receptors (PRRs) recognize and respond to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and shape the following adaptive immune response. A family of PRRs most frequently associated to fungal recognition is the nucleotide-binding oligomerization domain–like receptor (NLR). After recognition of a PAMP, NLR family pyrin domain–containing 3 (NLRP3) binds to apoptosis-associated speck–like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) and caspase-1 to form the NLRP3 inflammasome. When activated, this complex promotes maturation of the pro-inflammatory cytokines interleukin (IL)-1 β and IL-18 that influence the development of the Th17 and Th1 immune responses, respectively. In addition, the NLRP3 inflammasome is responsible for pyroptosis, a highly inflammatory cell death regulated by caspase-1. In this work, we aimed to evaluate the role of the NLRP3 inflammasome to the outcome of the *S. schenckii* infection using a wild-type mice (WT) and three different knockout mice (KO): NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-}, and Casp-1^{-/-}. All the KO mice were more susceptible to the infection than the WT during the *S. schenckii* infection. Furthermore, the NLRP3 inflammasome seems to be critical to the *ex vivo* release of NO, IL-1 β , IL-18, and IL-17, but not IFN- γ . The *S. schenckii* infection led to increased activation of caspase-1 and cell death by pyroptosis in WT mice. Also, a role for the inflammasome in shaping the adaptive immune response was suggested by lower frequencies of type 17 helper T (Th17) and Th1/Th17 cells in *S. schenckii*-infected KO mice. On the other hand, absence of any of the inflammasome components resulted in increased frequency of cytotoxic T cells in this infection. As a whole, our results indicate the NLRP3 inflammasome links the innate recognition of *S. schenckii* to the adaptive immune response, thus contributing to protective response in the infection by this fungus.

Keywords: NLRP3 inflammasome, cytokines, pyroptosis and *Sporothrix schenckii*.

1. Introdução

As infecções fúngicas têm aumentado de forma significativa nos últimos anos, uma vez que a utilização de antibióticos de amplo espectro e de terapias imunossupressoras, dentre outros fatores, têm facilitado o aparecimento de novos fungos patogênicos e o surgimento de doenças micóticas antes incomuns. Este fato tem se tornado um problema grave de saúde pública devido aos inúmeros prejuízos causados por micoses nos seres humanos e em outros animais (van de Veerdonk *et al.*, 2015). As espécies do complexo *Sporothrix*, incluindo *Sporothrix pallida*, *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix luriei*, *Sporothrix mexicana* e *Sporothrix schenckii sensu stricto* são os agentes etiológicos da esporotricose, uma doença micótica, que afeta os seres humanos e outros animais, caracterizada pela evolução aguda e crônica de lesões nodulares cutâneas ou subcutâneas que podem se disseminar para outros tecidos. A infecção do hospedeiro ocorre pela inoculação pós-traumática do fungo presente no solo, plantas e em matéria orgânica em decomposição, pela inalação de conídios ou ainda pela transmissão zoonótica, especialmente de cães e gatos (Barros *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2016).

A esporotricose tem sido relatada em vários países, e em muitos desses locais ocorreram epidemias desta doença, principalmente, naqueles localizados em regiões com climas tropicais e subtropicais. No entanto, por não ser uma doença de notificação compulsória, sua exata prevalência é desconhecida. No Brasil, os casos de esporotricose têm aumentado, pois, entre os anos de 1987 e 1997, foram diagnosticados 13 casos da doença em humanos, enquanto que uma epidemia, com mais de 750 humanos, 1.503 gatos e 64 cães doentes, foi observada entre os anos de 1998 e 2004 (Schubach *et al.*, 2008; Chakrabarti *et al.*, 2015). Na cidade do Rio de Janeiro, onde a esporotricose é hiperendêmica, a situação é especialmente preocupante, pois entre 1998 e 2009 foram confirmados aproximadamente 2.200 casos de humanos e 3.244 de felinos com a doença (Barros *et al.*, 2010).

A variedade de apresentações clínicas da esporotricose, assim como a regressão espontânea da doença em alguns casos, depende de diversos fatores, tais como a virulência e a profundidade da cepa inoculada, a carga do inóculo e o estado imunológico do hospedeiro (Barros *et al.*, 2011). As

formas mais graves da doença têm sido observadas, principalmente, em pacientes imunocomprometidos, como aqueles infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), diagnosticados com diabetes mellitus, com histórico de uso abusivo do álcool ou que fazem uso de drogas imunossupressoras, sugerindo que a patogenia da infecção por *S. schenckii* está intimamente relacionada aos mecanismos de defesa do hospedeiro (Vasquez-del-Mercado *et al.*, 2012; Govender *et al.*, 2015).

Os mecanismos imunológicos envolvidos na resistência e na suscetibilidade do hospedeiro à infecção por *S. schenckii* ainda não foram totalmente compreendidos (Carlos *et al.*, 2009), mas trabalhos realizados em nosso laboratório mostraram que há participação efetiva das respostas imunes inata, celular e humoral no combate a este patógeno (Carlos *et al.*, 2015). Foi demonstrado que as células T auxiliares do tipo 1 (Th1) e Th2 são desenvolvidas contra antígenos específicos presentes na parede celular de *S. schenckii* (Maia *et al.*, 2006) e, mais recentemente, o desenvolvimento de uma resposta Th17 protetora, com a participação de células Th17 e células mistas Th1/Th17, bem como a liberação *ex vivo* aumentada de interleucina (IL)-17 e IL-22, na infecção por *S. schenckii* (Ferreira *et al.*, 2015).

O reconhecimento inato de patógenos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) desempenha um papel crítico na resolução das infecções (Erwig e Gow, 2016). Para prevenir a invasão de patógenos, os PRRs monitoram os espaços intra e extracelulares a fim de reconhecerem e responderem aos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e aos padrões moleculares associados a danos celulares (DAMPs) (Guo *et al.*, 2015). Em fungos, as substâncias presentes na parede celular, tais como β -glucana, quitina e manana são os principais PAMPs reconhecidos pelos PRRs (Plato *et al.*, 2015).

Atualmente, há pelo menos cinco grandes famílias de PRRs que operam de forma coordenada para reconhecer os sinais de estresse produzidos pelas células durante uma infecção ou lesão celular: *Toll-like receptors* (TLRs), *C-type lectin receptors* (CLRs), *retinoic acid inducible gene-I* (RIG-I)-*like receptors* (RLRs), *absent-in-melanoma* (AIM)-*like receptors* (ALRs) e, mais

recentemente, os *nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs)* (Erwig e Gow, 2016; Kim *et al.*, 2016). Nesse sentido, estudos realizados em nosso laboratório, mostraram a importância dos receptores TLR-2 e TLR-4 no reconhecimento de *S. schenckii*, pois a ausência desses receptores reduziu de forma surpreendente a produção de citocinas e mediadores pró-inflamatórios (IL-1 β , TNF- α , IL-6, NO e H₂O₂), anti-inflamatórios (IL-10), morte celular por apoptose e índices de fagocitose, sugerindo uma participação importante desses receptores na esporotricose (Sassá *et al.*, 2009, 2012; Negrini *et al.*, 2013, 2014). Assim, há uma razão para se acreditar que outros PRRs possam participar no desencadeamento da resposta imune do hospedeiro contra *S. schenckii*.

Os receptores NLRs são PRRs encontrados no citosol de células granulocíticas e devido à sua localização atuam como uma segunda linha de defesa para o hospedeiro (Zoete *et al.*, 2014). Sabe-se que há vários subtipos dos receptores NLRs, como NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRC4, AIM2, dentre outros; e que cada um destes receptores possui capacidade específica para reconhecer determinados PAMPs e DAMPs (Saavedra *et al.*, 2015). Entretanto, o receptor NLRP3 surgiu como o mais versátil devido à sua ampla especificidade, pois tem sido associado ao reconhecimento de diversos agentes patogênicos, incluindo alguns importante fungos, como *Candida albicans* (Joly *et al.*, 2009; Hise *et al.*, 2009; van de Veerdonk *et al.*, 2011), *Aspergillus fumigatus* (Said Sadier *et al.*, 2010), *Cryptococcus neoformans* (Guo *et al.*, 2014) e *Paracoccidioides brasiliensis* (Tavares *et al.*, 2013; Ketelut-Carneiro *et al.*, 2015).

Após a sinalização e o reconhecimento de partículas estranhas, os receptores NLRP3 se ligam à molécula adaptadora *Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase recruitment domain* (ASC), que por sua vez, ativa a caspase-1, formando o inflamassoma NLRP3. Quando ativado, este complexo proteico por meio da clivagem mediada por caspase-1 promove a maturação da pró-IL-1 β e da pró-IL-18 em suas respectivas formas ativas (Ulland *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2016). Por sua vez, as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 contribuem para a defesa antifúngica do hospedeiro por aumentarem a capacidade antimicrobiana dos fagócitos e iniciarem as

respostas imunes adaptativas Th17 e Th1, respectivamente (van de Veerdonk *et al.*, 2011). Além de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, o inflamassoma NLRP3 também protege o hospedeiro contra os patógenos invasores por meio da piroptose, uma morte celular altamente inflamatória regulada pela caspase-1 (de Vasconcelos *et al.*, 2016).

Por ser importante para o desencadeamento da resposta imune do hospedeiro frente a vários agentes agressores e devido a seu papel protetor em várias doenças, incluindo as fúngicas, o inflamassoma NLRP3 tem sido um alvo promissor para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (van de Veerdonk *et al.*, 2015). Recentemente, mostramos que macrófagos peritoneais de camundondos Balb/c infectados com *S. schenckii* tiveram reduzida atividade de caspase-1, concomitantemente à diminuição da secreção de IL-1 β e IL-18 na 4^a e 6^a semanas pós-infecção (Gonçalves *et al.*, 2015). Interessantemente, essa redução na atividade de caspase-1 ocorreu no mesmo período em que foram relatados, em modelos experimentais semelhantes, aumento da multiplicação fúngica no baço e fígado, assim como imunossupressão, dos animais infectados com *S. schenckii* (Carlos *et al.*, 2009, 2015), sugerindo-se, portanto, o envolvimento do inflamassoma na esporotricose.

Por fim, devido à importante participação dos receptores TLR-2 e TLR-4 no reconhecimento de *S. schenckii* e as evidências do envolvimento do inflamassoma nesta infecção, muito provavelmente, outros PRRs podem estar envolvidos com a proteção do hospedeiro na esporotricose. Deste modo, considerando o crescente número de casos de esporotricose e a importância do inflamassoma NLRP3 nas infecções fúngicas, tornou-se relevante compreender o papel deste complexo proteico na regulação da resposta imune do hospedeiro na infecção por *S. schenckii*, possibilitando assim o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a prevenção e o tratamento desta doença.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. *Sporothrix schenckii* e a esporotricose

A esporotricose é uma doença micótica que acomete os seres humanos e outros animais, e é caracterizada pela evolução aguda e crônica de lesões nodulares cutâneas ou subcutâneas que podem se disseminar para outros tecidos. *Sporothrix schenckii* foi por muito tempo considerado o único agente etiológico desta doença, no entanto, atualmente, sabe-se que este fungo faz parte das espécies do complexo *Sporothrix*, que incluem *Sporothrix pallida* (antes denominado *Sporothrix albicans*), *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix luriei*, *Sporothrix mexicana*, *Sporothrix chilensis* e *Sporothrix schenckii sensu strictu* (Oliveira *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2013, 2015; Chakrabarti *et al.*, 2015).

O primeiro caso de esporotricose foi relatado nos Estados Unidos por Benjamim Schenk em 1898. Em 1990, Hektoen and Perkins relataram um segundo caso da doença e, após isolamento do microrganismo, verificaram que se tratava do mesmo agente identificado por Schenk e deram-no o nome de *Sporothrix schenckii* (Schenk, 1898; Hektoen e Perkins, 1900). No Brasil, Adolpho Lutz e Splendore, em 1907, foram os primeiros a relatarem o aparecimento da esporotricose em animais ao isolarem o patógeno da mucosa oral de ratos (Lacaz *et al.*, 2002). *S. schenckii* pertence ao reino Fungi e durante vários anos, pertenceu à divisão Eumycota, subdivisão Deuteromycotina, classe Hyphomycetes, ordem Moniliales e família Moniliaceae (Lacaz *et al.*, 1998). Depois de uma revisão substancial taxonômica dos fungos por Guarro *et al.* (1999), foi caracterizado na divisão Ascomycota, classe Pyrenomycetes, ordem Ophiostomatales e família Ophiostomataceae.

O fungo termodimórfico *S. schenckii* apresenta a forma miceliar em temperaturas entre 25 °C e 30 °C e os micélios são caracterizados pela presença de hifas delgadas, hialinas, septadas e ramificadas, com presença de conídios organizados em grupos. Essas colônias filamentosas, macroscopicamente, apresentam coloração de branco a creme, que se tornam escuras a negras e, subsequentemente, enrugadas, com o passar das semanas (Lopes-Bezerra *et al.*, 2006). Já a fase

leveduriforme ocorre a 37 °C e as leveduras *S. schenckii* apresentam estrutura oval sem a presença de conídios e são parasíticas, ou seja, a forma que se aloja no tecido do hospedeiro. As colônias leveduriformes são lisas com coloração acastanhada a creme (Valentin-Berrios *et al.*, 2009).

A infecção por *S. schenckii* geralmente ocorre pela inoculação pós-traumática de conídios deste fungo no hospedeiro, uma vez que o agente etiológico da esporotricose está amplamente distribuído na natureza, principalmente em solos, plantas e materiais orgânicos em decomposição (La Hoz *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2014). No entanto, a doença também pode ser adquirida pela inalação dos conídios, embora esta seja uma forma de transmissão mais rara, já que a esporotricose não apresenta a via pulmonar como foco primário da infecção (Aung *et al.*, 2013).

A prevalência da esporotricose era descrita em homens, porém no decorrer dos últimos anos a incidência de mulheres contaminadas com *S. schenckii* tem aumentado, nivelando a portatividade da doença em ambos os sexos (Bonifaz *et al.*, 2010). A infecção por *S. schenckii* tem sido correlacionada com a atividade profissional e recreacional dos pacientes, pois ao analisar os fatores envolvidos, verificou-se que a maioria dos acometidos exercia atividades diretamente relacionadas ao solo e à vegetação, tais como agricultura, horticultura, floricultura, mineração, pesca e exploração da madeira (Morris-Jones, 2002). No entanto, atualmente, veterinários, cuidadores de animais, proprietários de gatos e manipuladores deste fungo em laboratórios são considerados novas categorias de risco para o desenvolvimento desta infecção (Barros *et al.*, 2011).

A transmissão zoonótica é substancial na esporotricose, sendo que a maioria dos casos foi relatada em áreas de condições socioeconômicas desfavoráveis das grandes cidades (Chakrabarti *et al.*, 2015). Os felinos domésticos, em particular, carregam grande número do fungo em suas unhas e na cavidade oral, transmitindo a infecção para humanos. No entanto, outros animais, como cães, tatus, cavalos, camelos, macacos, ratos e papagaios, assim como peixes e golfinhos, podem ser vetores para esta doença (Reis *et al.*, 2009; Barros *et al.*, 2011). Um estudo realizado pelo Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, no Rio de Janeiro, Brasil, mostrou que 83% dos pacientes e

85% dos cães doentes tiveram contato com gatos contaminados e que 56% dos seres humanos relataram que foram mordidos ou arranhados por gatos com esporotricose (Schubach *et al.*, 2008).

Por não ser uma doença de notificação compulsória, a exata prevalência e incidência da esporotricose é desconhecida. Mas, sabe-se que esta doença tem distribuição mundial e é especialmente endêmica nas regiões de clima tropical e subtropical (Alba-Fierro *et al.*, 2014). A doença já foi reportada na Europa (França, Espanha, Portugal), Ásia (China, Índia, Japão), África (África do Sul), Américas do Norte (Estados Unidos e Canadá); Central (México, Guatemala) e do Sul (Brasil, Colômbia, Venezuela, Peru) e Austrália (Chakrabarti *et al.*, 2015).

Após o grande número de casos relatados na França durante a primeira parte do século passado, por razões desconhecidas, o número dos casos diminuiu e a doença raramente é relatada na Europa (Chakrabarti *et al.*, 2015). No Japão, de 1946 a 1982, cerca de 155 casos foram relatados anualmente, mas este índice reduziu para 50 casos por ano (Lyon *et al.*, 2003). Já em 2005, na África do Sul, a estimativa de incidência anual da esporotricose era de 48 a 60 casos por cada cem mil habitantes (Neyra *et al.*, 2005). Nos Estados Unidos da América, o maior surto de esporotricose ocorreu em 1988 e envolveu 84 casos em 15 diferentes estados, afetando trabalhadores envolvidos em programas de reflorestamento (Burns *et al.*, 2009). Em regiões hiperendêmicas, como no Peru, uma taxa de ocorrência entre 48 a 98 casos por 100.000 pessoas foi descrita, enquanto que no México a proporção é de 25 casos por 1.000 habitantes (Pappas *et al.*, 2000; Bonifaz *et al.*, 2013).

No Brasil, o número de casos de esporotricose tem aumentado, pois entre os anos de 1987-1997 foram observados 13 casos de esporotricose em humanos, enquanto que entre 1998 e 2004 foi observada uma epidemia da doença, já que foram reportados mais de 750 casos em humanos, 1.503 em gatos e 64 em cães infectados com *S. schenckii* (Schubach *et al.*, 2008). Especialmente na cidade do Rio de Janeiro, onde a transmissão zoonótica da esporotricose é hiperendêmica, entre 1998 e 2009 foram descritos 2.200 pacientes contaminados com *S. schenckii* e 3.244 casos de esporotricose felina (Oliveira *et al.*, 2011; Barros *et al.*, 2004, 2010; Freitas *et al.*, 2010, 2014). Hoje, a esporotricose é uma das principais causas de hospitalização e mortalidade no Rio de Janeiro

entre as doenças fúngicas (Silva *et al.*, 2012). Na região sul do Brasil foram encontrados 103 casos de esporotricose em animais, entre cães e gatos, durante os últimos dez anos (Madrid *et al.*, 2012).

A esporotricose apresenta diversas manifestações clínicas e pode ser classificada como cutânea disseminada ou fixa, linfocutânea, mucosa e extracutânea (Vasquez-del-Mercado *et al.*, 2012). Diversos fatores, como a virulência e a profundidade da cepa inoculada, a carga do inóculo e o estado imunológico do hospedeiro, podem influenciar nas diferentes formas clínicas da doença (Barros *et al.*, 2011). A imunossupressão, independente da causa, provoca pré-disposição para as formas mais graves da doença (Govender *et al.*, 2015). A infecção pelo vírus HIV, terapias imunossupressoras, o uso abusivo de álcool e a diabetes mellitus também têm sido descritos como fatores de suscetibilidade para a infecção com *S. schenckii* (Vasquez-del-Mercado *et al.*, 2012).

A forma cutânea da doença é caracterizada pelo aparecimento de lesões verrucosas ou de pápulas que ficam limitadas ao local da inoculação do fungo (cutânea fixa) ou que se espalham em várias partes do corpo (cutânea disseminada), sendo a face e os membros superiores e inferiores as regiões mais acometidas (Roldán-Marín *et al.*, 2009). Por outro lado, a forma linfocutânea é caracterizada pela presença de nódulos eritematosos que podem ser ulcerativos ou necróticos, com posterior aparecimento de nódulos linfáticos que resultam em linfoedema (Bonifaz *et al.*, 2010). A forma mucosa da esporotricose é a mais rara e se desenvolve como lesões verrucosas, granulomatosas ou ulcerativas que afetam os olhos, provocando sinais clínicos de dacriocistite, e anexos, como palato, faringe, traqueia ou nariz (Fontes *et al.*, 2007; Freitas *et al.*, 2014).

A esporotricose extracutânea inclui as formas osteoarticular, pulmonar e sistêmica, sendo estas caracterizadas como as mais graves da doença (Orofino-Costa, 2010). Estes casos, geralmente, ocorrem em pacientes imunocomprometidos, sugerindo que *S. schenckii* é um patógeno oportunista (Freitas *et al.*, 2011), mas casos pulmonares também foram relatados em pacientes imunocompetentes (Aung *et al.*, 2013). A forma sistêmica é a mais grave, pois envolve o acometimento de múltiplos órgãos, podendo, inclusive, afetar o sistema nervoso central e nervos periféricos e causar meningites e neuropatias significativas (Freitas *et al.*, 2011). Em pacientes HIV

positivos, a forma sistêmica pode ser manifestada como uma síndrome imune inflamatória depois de iniciada a terapia com antiretrovirais (Gutierrez-Galhardo *et al.*, 2010; López-Romero *et al.*, 2011).

Os fatores de virulência são definidos como características presentes em determinados microrganismos que permite ou favorece o crescimento deste patógeno no hospedeiro. *S. schenckii* apresenta vários destes fatores, incluindo: o dimorfismo, a termotolerância, a síntese de ergosterol peróxido, a produção de melanina, a presença de adesinas e proteases, e os componentes da parede celular (Nascimento *et al.*, 2008; Ruiz-Baca *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2009, 2010). Em relação ao dimorfismo, *S. schenckii* é capaz de modificar sua morfologia e fisiologia para enfrentar novas condições, assim como para se evadir da resposta imune do hospedeiro. Portanto, o dimorfismo tanto em nichos ecológicos quanto em diferentes hospedeiros é relevante para a patogenicidade deste fungo (Nemecek *et al.*, 2006, Casadevall *et al.*, 2003; Gauthier e Klein, 2008). Em um outro trabalho, foi demonstrado que isolados fúngicos com baixa termotolerância apresentaram maior incidência de esporotricose na forma cutânea fixa, enquanto que isolados com maior termotolerância, apresentaram maior incidência da doença na forma linfocutânea, sugerindo uma ligação entre a termotolerância e a virulência deste patógeno (Mesa-Arango *et al.*, 2002).

Outro componente isolado da membrana das formas leveduriformes de *S. schenckii* e que está envolvido com sua virulência é o ergosterol, podendo atuar como um mecanismo de escape do fungo das espécies reativas de oxigênio durante a fagocitose por meio da formação do ergosterol peróxido (Sgarbi *et al.*, 1997; Carlos *et al.*, 2003). Por outro lado, tem sido relatado que a melanização dos conídios protege *S. schenckii* da radiação ultravioleta e que, durante a infecção, a presença de melanina afeta os mecanismos de defesa do hospedeiro, pois este pigmento torna os conídios do fungo mais resistentes à ação de intermediários reativos do nitrogênio e do oxigênio e à fagocitose que aqueles conídios não produtores de melanina (Romero-Martinez *et al.*, 2000; Morris-Jones *et al.*, 2003; Almeida-Paes *et al.*, 2009; Madrid *et al.*, 2010).

A aderência dos patógenos às células endoteliais e epiteliais, bem como em componentes da matriz extracelular, é essencial para uma invasão eficaz do microrganismo. As adesinas, localizadas na superfície da célula, favorecem a adesão do patógeno aos tecidos do hospedeiro e, conseqüentemente, facilitam sua disseminação (Teixeira *et al.*, 2009, 2010). Alguns estudos têm mostrado que componentes da parede celular de *S. schenckii* estão envolvidos na aderência deste fungo às células hospedeiras e na tentativa de desenvolver uma vacina contra este patógeno, imunizações com anticorpos monoclonais contra adesinas deste microrganismo têm obtido sucesso em modelo experimental murino (Figueiredo *et al.* 2004; Nascimento *et al.*, 2008). A capacidade de adesão de *S. schenckii* também pode estar associada à presença de proteases, uma vez que algumas enzimas extracelulares, como as fosfatases ácidas, serinas, colagenase, parecem desempenhar importante papel na interação das leveduras *S. schenckii* com macrófagos e outras células do hospedeiro (Hogan *et al.*, 1996; Nascimento e Almeida, 2005; Sandoval-Bernal *et al.*, 2010).

Adicionalmente, os componentes da parede celular de *S. schenckii*, incluindo glicoproteínas, lipídeos, polissacarídeos e carboidratos, são as principais estruturas do fungo envolvidas na interação com o hospedeiro. A fração glicoproteica isolada da parede celular de *S. schenckii* é denominada peptídeo-ramnomanana e é composta por ramnose, manose, galactose e proteína (Lloyd e Bitoon, 1971; Shimonaka *et al.*, 1975; López-Romero *et al.*, 2011). Como exemplo, pode-se citar a glicoproteína de 70 kDa (gp70) que medeia a interação do fungo com as proteínas da matriz extracelular do tecido hospedeiro, suportando que esta glicoproteína tem papel de adesina (Ruiz-Baca *et al.*, 2009, Teixeira *et al.*, 2009). Outro componente da parede celular de *S. schenckii* é de natureza lipídica e parece desempenhar um papel importante no desenvolvimento desta micose, uma vez que foi capaz de inibir a fagocitose em ensaios *in vitro* (Carlos *et al.*, 2003). Ainda assim, moléculas de ácido siálico presentes na superfície de *S. schenckii* desempenham importante papel na patogenicidade deste fungo, uma vez que a remoção enzimática dos resíduos de ácido siálico das formas infectantes de *S. schenckii* tornou o fungo mais suscetível à fagocitose (Oda *et al.*, 1983).

Além disso, as formas saprofíticas não infectantes contêm menos resíduos de ácido siálico em sua superfície (Alviano *et al.*, 1999).

Em continuidade, os polissacarídeos da parede celular de *S. schenckii* incluem glicose, manose, galactose, polímeros de α - e β -glucanas, galactomanana e quitina (Kanetsuna e Carbonell, 1970; Kanetsuna *et al.*, 1972). As β -glucanas podem ser álcalis solúveis ou insolúveis e ambas são encontradas nos dois estágios morfológicos de *S. schenckii*. As glucanas alcalinas solúveis presentes em leveduras de *S. schenckii* contêm ligações $\beta(1,3)$, $\beta(1,6)$ e $\beta(1,4)$ na proporção de 44%, 28% e 28%, respectivamente. Enquanto, as glucanas alcalinas insolúveis, que compõem a fração F1, contêm ligações $\beta(1,3)$, $\beta(1,6)$ e $\beta(1,4)$ numa proporção de 66%, 29% e 5 %, respectivamente (Previato *et al.*, 1979, López-Romero *et al.*, 2011). Por serem substâncias altamente imunogênicas, os componentes da parede celular de *S. schenckii* têm se destacado para o desenvolvimento de vacinas e testes sorológicos para o diagnóstico e tratamento da esporotricose (Alba-Fierro *et al.*, 2014). Em nosso laboratório, os diferentes antígenos presentes na parede celular de *S. schenckii* têm sido extensivamente estudados sobre o tipo de resposta imunológica que induzem, os receptores de reconhecimento padrão envolvidos no seu reconhecimento e as correspondentes vias de sinalização que são ativadas (Carlos *et al.*, 2015).

Em adição aos dados expostos, os fungos possuem grande probabilidade de agravar seus mecanismos de patogenicidade no meio ambiente, pois adquirem a capacidade de adesão às superfícies e de formar biofilmes, competir com outros microrganismos e lidar com mudanças de fatores físicos (temperatura, radiação ultravioleta e umidade), químicos (pH, metais, osmolaridade, hidrocarbonetos, pesticidas) e biológicos (microrganismos) (Pérez-Sánchez *et al.*, 2010). Portanto, a interação entre o ambiente, o patógeno e o hospedeiro tem efeito fundamental na diversidade, frequência e distribuição de espécies do complexo *Sporothrix* e os casos de esporotricose. Assim, as condições adversas no habitat natural do fungo podem desencadear a expressão de diferentes fatores de virulência que proporcionam vantagens de sobrevivência a este patógeno tanto no ambiente como nos tecidos hospedeiros (Rodrigues *et al.*, 2014).

Interessantemente, estudos mostraram que *S. schenckii* pode modificar sua virulência em resposta a determinados estressores ambientais (Téllez *et al.*, 2014). Nesse sentido, *S. schenckii* foi capaz de resistir à influência de radiações ultravioletas (UV), no entanto foram observadas alterações morfológicas das colônias fúngicas dependendo da cepa e da dose de luz UV (Torres-Guerrer e Arenas-López, 1998). Em adição, cepas *S. schenckii* que tiveram contato e que degradaram hidrocarbonetos voláteis foram relacionadas com as formas mais graves da doença em humanos, causando especialmente infecções neurológicas em indivíduos imunocompetentes (Prenafeta-Boldú *et al.*, 2006). Subsequente, a interação de fungos dimórficos, incluindo *S. schenckii*, com a ameba de solo *Acanthamoebae castellanii* mostrou que a ingestão da levedura por essa ameba resultou na morte do parasita e no aumento do crescimento fúngico, fato que contribuiu com a patogenicidade dos fungos devido à seleção dos mesmos no ambiente (Steenbergen *et al.*, 2004).

Para o tratamento de todas as formas de esporotricose, atualmente, é utilizado o itraconazol. Contudo, para as formas mais simples da doença e em países sub-desenvolvidos, a solução saturada de iodeto de potássio continua sendo o fármaco de primeira escolha. Outra opção, é a terbinafina, que tem sido eficaz no tratamento da esporotricose cutânea. Entretanto, para o tratamento da doença em estágios avançados, durante a gravidez e em pacientes imunodeprimidos, a anfotericina B é o fármaco utilizado inicialmente, sendo seguido pelo itraconazol durante o restante do tratamento até a recuperação do paciente (Mahajan *et al.*, 2014). Apesar da eficácia geral destes fármacos, diversos problemas permanecem, incluindo a terapia crônica, manifestações de toxicidade e resistência fúngica, que limitam a utilização destes princípios ativos. Por isso, é imprescindível a pesquisa de novos agentes que possam ser ativos contra as espécies do complexo *Sporothrix* (Batista-Duharte *et al.*, 2015).

2.2. Imunologia e o *Sporothrix schenckii*

A resposta imunológica efetiva contra os fungos requer a contribuição coordenada das respostas imune inata e adaptativa. A imunidade inata consiste de uma série de mecanismos desenvolvidos inicialmente para combater um agente invasor que tem a capacidade de induzir a ativação das células da resposta adaptativa por meio da apresentação de antígenos, co-estimulação e produção de diversos mediadores imunológicos. Já a resposta imune adaptativa, sob estimulação do sistema inato, desempenha um papel crucial na resposta imune devido à ativação da imunidade celular e humoral, que reconhece com especificidade os diversos antígenos e promove a expansão clonal das células T e B, resultando na remoção alvo das partículas estranhas (Green *et al.*, 2000; Charalampos e Roilides, 2005; Wüthrich *et al.*, 2012).

Sabe-se que as respostas imunológicas do hospedeiro participam do progresso e da regressão da esporotricose, indicando que a patogenia desta infecção está intimamente ligada aos mecanismos de defesa do hospedeiro (Carlos *et al.*, 2009). Contudo, os mecanismos imunológicos envolvidos na prevenção e no controle de infecções por *S. schenckii* ainda não foram completamente elucidados, mas estudos mostram a participação das respostas imunes inata, celular e humoral, e estas parecem ser desencadeadas por diferentes antígenos obtidos de *S. schenckii* (Carlos *et al.*, 2015).

Os tipos de células predominantes utilizadas para a defesa antifúngica na resposta imune inata incluem as células imunes não clássicas, como células epiteliais, células endoteliais e plaquetas; e as células imunes clássicas, como os macrófagos, células dendríticas (DC), neutrófilos, células *natural killer* (NK) e células linfoides inatas (ILCs). Além disso, as células pertencentes ao sistema imune inato são caracterizadas pela presença de receptores com ampla especificidade. No entanto, é importante compreender que existem várias outras populações celulares que podem contribuir para respostas antifúngicas, embora permaneçam pouco caracterizadas no contexto das infecções fúngicas (Becker *et al.*, 2015).

A eliminação de microrganismos por macrófagos depende da fagocitose, da apresentação de antígenos às células T, da liberação de citocinas e agentes microbicidas, como os intermediários reativos do oxigênio (IRO), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2); e do nitrogênio (IRN), como o óxido nítrico (NO) (Mlambo e Sigola, 2003; Pluddemann *et al.* 2011; Trzeciak-Ryczek *et al.*, 2015). A produção de NO, que pode ser induzida por $IFN-\gamma$, é um fator determinante para a defesa inata do hospedeiro frente a diversas infecções, incluindo as fúngicas, devido a seus efeitos citotóxicos e por ser um mediador da atividade fagocítica dos macrófagos (Green *et al.*, 2000; Gonzalez *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2010). Nesse sentido, o componente lipídico da parede celular de *S. schenckii* foi capaz de inibir a fagocitose deste patógeno e induzir elevada liberação de NO e $TNF-\alpha$ em cultura de macrófagos peritoneais (Carlos *et al.*, 2003). Em contrapartida, a liberação de IL-1 β , IL-2 e H_2O_2 foi importante para controlar a infecção por *S. schenckii* durante a fase inicial da esporotricose, mas em seguida favoreceu a disseminação fúngica, principalmente, devido à atividade imunossupressora de H_2O_2 (Maia *et al.*, 2016).

A interação entre os fagócitos, as células T e os antígenos microbianos promove uma resposta imunológica eficaz e importante para o desenvolvimento da resistência do hospedeiro a uma variedade de infecções fúngicas (Tachibana *et al.*, 1999; Romani, 2011). Nessa interação, ocorre a participação das citocinas, que possuem a capacidade de modular a inflamação e a resposta imunológica no decorrer de episódios traumáticos ou infecciosos, pois são responsáveis pelo crescimento e diferenciação de diferentes tipos celulares (Muller, 2002). Assim, torna-se claro que as citocinas desempenham papel fundamental na regulação da resposta do hospedeiro contra fungos, uma vez que podem influenciar o tipo celular envolvido no combate ao patógeno (Becker *et al.*, 2003; Balloy *et al.*, 2005; Charalampos e Roilides, 2005).

De acordo com a presença de determinadas citocinas, os macrófagos podem desempenhar diferentes papéis em resposta aos microrganismos e desenvolverem mais de um fenótipo funcional: clássico (M1) ou alternativo (M2). As citocinas pró-inflamatórias, como $IFN-\gamma$ e IL-12, direcionam os macrófagos para a ativação M1, que podem contribuir com a lesão tecidual e a patogênese. Já as

citocinas anti-inflamatórias, como o TGF- β , direcionam para a ativação M2, que promovem a angiogênese e a remodelação e reparação dos tecidos (Mosser and Edwards, 2008). Em nosso laboratório, mostramos, com base na expressão de CD197 e CD121b (Células M1) ou CD23 e CD206 (células M2), que ocorreu predominância de células M2 durante todo o período experimental com *S. schenckii*. No entanto, ocorreu aumento da liberação *ex vivo* de IL-12 e NO nas 2ª e 4ª semanas após a infecção, sugerindo que os macrófagos M1 estão presentes neste período. Por outro lado, sugeriu-se o predomínio de macrófagos M2 no final da infecção (6ª e 8ª semanas), já que neste período ocorreu o pico da liberação *ex vivo* de IL-10 e TGF- β (Alegranci *et al.*, 2013).

Como dito anteriormente, para impedir a invasão dos agentes agressores, as células do sistema imune inato possuem receptores que reconhecem e respondem aos padrões moleculares associados a agentes patogênicos (PAMPs) e à presença de danos ou estressores celulares (DAMPs) (Latz *et al.*, 2013). Esses receptores são conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e têm a função de monitorar o espaço extra e intracelular contra sinais de infecção ou de lesão celular, desencadeando mecanismos iniciais que são críticos para a defesa do hospedeiro (Kanneganti *et al.*, 2007; Vera-Cabrera *et al.*, 2012). Em fungos, as substâncias presentes na parede celular, tais como β -glucana, quitina e manana são os principais PAMPs reconhecidos pelos PRRs (Plato *et al.*, 2015).

Atualmente, há pelo menos cinco grandes famílias de PRRs que operam de forma coordenada para reconhecer os sinais de estresse produzidos pelas células durante uma infecção ou lesão celular: *Toll-like receptors* (TLRs), *C-type lectin receptors* (CLRs) *RIG-I-like receptors* (RLRs), *AIM-like receptors* (ALRs) e, mais recentemente, os *NOD-like receptors* (NLRs). Os TLRs e CLRs estão localizados na membrana plasmática, enquanto os RLRs, ALRs e os NLRs são PRRs intracelulares (Erwig e Gow, 2016; Kim *et al.*, 2016).

A participação dos receptores TLR2 e TLR4 já foi reportada na esporotricose. Estudos prévios do laboratório avaliaram o envolvimento de TLR-2 na resposta imune induzida por *S. schenckii* e mostraram que este receptor interfere de forma surpreendente na produção de citocinas e

mediadores pró-inflamatórios, pois em animais TLR2^{-/-} houve ausência completa da produção de TNF- α , IL-1 β , IL-12, IL-10 e NO e da resposta Th1 (Negrini *et al.*, 2013, 2014). Já a participação do receptor TLR4 foi avaliada em animais TLR-4 deficientes (C3H/HeJ) e TLR-4 normais (C3H/HePas) e os níveis de mediadores pró-inflamatórios (IL-1 β , TNF- α , IL-6, NO e H₂O₂), anti-inflamatórios (IL-10), assim como a expressão de NF- κ B e a morte celular por apoptose, estavam reduzidos nos animais com deficiência no receptor TLR-4 (Sassá *et al.*, 2009, 2012). Portanto, pode-se sugerir que a ausência de TLR-2 e TLR-4 prejudicou o desencadeamento da resposta imune do hospedeiro, uma vez que estes receptores participam do reconhecimento de *S. schenckii*.

O sistema imune adaptativo, sob estimulação do sistema inato, desempenha um papel crucial na resposta imune com participação imprescindível das células B e T. As células T têm receptores diversificados para os antígenos e a expansão clonal dessas células resulta na remoção do agente alvo. As células T duplo positivas (CD4⁺CD8⁺) são reguladas negativamente para CD4 ou CD8 no timo e, então, são liberadas como únicas positivas para CD4 (células T *helper*) ou CD8 (células T citotóxicas), conhecidas como células T *naive*. Por sua vez, as células T *naive* podem assumir diversos fenótipos efetores ou de memória, sendo este passo inicial determinante para as possíveis diferenciações de cada linhagem das células T e, portanto, para o papel que cada célula desempenhará na imunidade do hospedeiro (Luckheeram *et al.*, 2012).

As células T CD8 positivas possuem diferenciação limitada e têm como principal função promover a morte direta de células infectadas por meio da secreção de enzimas citotóxicas, incluindo perforina e granzimas (Nguyen *et al.*, 2015). A resposta imune das células T CD8 possui uma fase primária de expansão e diferenciação efetora, seguida pela formação de células de memória. Caso o antígeno seja re-encontrado, ocorre a segunda fase, que é caracterizada pela expansão e diferenciação secundária mais rápida dessas células (Bedoui *et al.*, 2016).

Por outro lado, as células T *helper* são capazes de se diferenciarem em, pelo menos, sete subtipos celulares com características fenotípicas e funcionais específicas: Th1, Th2, Th17, Treg, Th9, Th22, células foliculares (Tfh). Essas células contribuem com a eliminação dos agentes

patogênicos, principalmente, por meio da secreção de citocinas que coordenam a atividade de outras células imunes (Zhu e Paul, 2010; Nakayamada *et al.*, 2012). As células Th1 expressam o fator de transcrição *T-box expressed in T cells* (T-bet) e produzem IL-12 e IFN- γ , que tem função de ativar os fagócitos e promover proteção para o hospedeiro frente a patógenos intracelulares. As células Th2 expressam *GATA-binding protein 3* (GATA-3), produzem IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e IL-25 e promovem a maturação da célula B mediada por resposta de anticorpos. As células Th17 expressam o fator de transcrição *Retinoic-related orphan receptor γ t* (ROR γ t) e são células essenciais na defesa do hospedeiro contra fungos e bactérias extracelulares, devido, principalmente, às ações da citocina pró-inflamatória IL-17, como também da IL-22 e IL-21. As células Treg expressam o fator de transcrição *Forkhead box P3* (Foxp3) e têm a capacidade de manter a homeostase imune através da secreção das citocinas imunossupressoras, incluindo IL-10 e TGF- β (Huang *et al.*, 2012). As células Th9 são produtoras da IL-9 e refletem uma adaptação das células Th2 devido à presença de microambientes distintos, as células Th22 que secretam IL-22 e estão relacionadas com a inflamação da pele, e, por fim, as células Tfh que são responsáveis pela diferenciação dos linfócitos B na resposta imune (Murphy e Stockinger, 2010; Sage e Sharpe, 2015).

Em trabalhos prévios do laboratório, foram observados baixos níveis de iNOS e NO na fase inicial (1ª e 2ª semanas) e final (9ª e 10ª semanas) da infecção, ao contrário do período entre a 4ª e 7ª semanas em que os níveis destes mediadores foram elevados. A determinação de IFN- γ e IL-12 estavam de acordo com a detecção de iNOS/NO, mostrando a presença de resposta imune celular ao longo do processo infeccioso. Entretanto, a produção de IL-4 estava aumentada entre a 5ª e 6ª semanas, o que sugere uma participação de resposta Th2 neste período. Portanto, a resposta imune celular participou como um mecanismo dependente de NO ao longo da infecção, enquanto a resposta imune humoral estava presente nos estágios avançados da esporotricose (Maia *et al.*, 2006). Em trabalhos anteriores, Carlos *et al.* (1992, 1994, 1999) já observaram depressão da resposta imune celular e aumento da carga fúngica no fígado e baço dos animais infectados com *S. schenckii* entre a 4ª e a 6ª semanas pós-infecção. Essa depressão na imunidade indicou um

agravamento da doença, que pode ter ocorrido devido à produção reduzida de IL-1 β e do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) pelos macrófagos.

Algumas células, quando diferenciadas, mantêm determinado fenótipo como estado final de diferenciação. Entretanto, outras células, quando expostas a um microambiente distinto, podem alterar seu fenótipo, o que confere uma característica de plasticidade às células T. As células Th17 são diferenciadas pela presença de TGF- β e IL-6, que promovem a transcrição do fator ROR γ t, enquanto que a IL-23 é necessária apenas para estabilizar este fenótipo. No entanto, a IL-23 em associação com a IL-1 β , independente de TGF- β , são capazes de induzir o desenvolvimento de células Th17 positivas tanto para o fator de transcrição ROR γ t quanto para T-bet, produzindo células altamente patogênicas que são conhecidas como células mistas Th17/Th1 (Ghoreschi *et al.*, 2010; Nakayamada *et al.*, 2012).

Em concordância com isso, temos demonstrado que o reconhecimento de antígenos de *S. schenckii* por DCs leva ao desenvolvimento de resposta Th17/Th1 *in vitro* (Verdan *et al.*, 2012). Mais recentemente, continuando nessa linha de raciocínio, analisamos a resposta Th17/Th1 *in vivo* e, mostramos a presença de uma resposta de Th17 protetora, por meio do desenvolvimento de células Th17 e células mistas Th17/Th1, bem como pela liberação *ex vivo* aumentada de IL-17 e IL-22. Além disso, a fim de avaliar a importância da resposta Th17 ao hospedeiro no controle da infecção por *S. schenckii*, animais Balb/c foram tratados com um anti-IL-anticorpo monoclonal neutralizante (mAb) para IL-23, e isto promoveu diminuição acentuada da liberação de IL-17 e IL-22, sendo estas diretamente correlacionadas com a capacidade do hospedeiro em controlar a infecção por este fungo (Ferreira *et al.*, 2015).

Pelo fato da esporotricose ser uma micose oportunista, uma possível limitação sobre o uso de vacinas em pacientes imunossuprimidos é que esses podem não desenvolver respostas protetoras. No entanto, a imunização passiva de anticorpos protetores pode ser um tratamento preventivo, rápido e eficaz ou mesmo uma alternativa terapêutica (Almeida *et al.*, 2012). Estudos utilizando mAb contra a gp70 de *S. schenckii* como uma vacina terapêutica em camundongos infectados com

S. schenckii e *S. brasiliensis* altamente virulentos, resultaram na redução da carga fúngica no baço e no fígado desses animais, pois como a gp70 tem função de adesina, os mAb provavelmente inibiram a adesão do fungo aos tecidos hospedeiros, e consequentemente, ocorreu diminuição da infecção (Nascimento *et al.*, 2008; de Almeida *et al.*, 2015). Em adição, a transferência passiva dos mAB foi capaz de aumentar a resposta imune mediada por células devido a produção de IFN- γ , de TNF- α e o índice fagocítico (Nascimento *et al.*, 2008; Franco *et al.*, 2012).

Neste sentido, nosso laboratório identificou uma proteína de 46 kDa de *S. schenckii* com características de adesina que reagiu com soros de camundongos vacinados com proteínas da parede celular de *S. schenckii* adjuvadas com hidróxido de alumínio. A opsonização das leveduras *S. schenckii* com esse soro imune aumentou a taxa de fagocitose e inibiu a adesão do fungo aos fibroblastos. Além do mais, a transferência passiva desse soro a camundongos não vacinados gerou significativa proteção, após esses animais serem infectados com o fungo, devido à queda das unidades formadoras de colônias (UFC) no baço e no fígado desses animais (Portuondo *et al.*, 2016).

2.3. Receptores *Nod-like* e o inflamassoma

Os receptores *Nod-like* (NLRs) estão presentes no citoplasma celular e, devido a esta localização, atuam como segundos sensores de defesa do hospedeiro, pois reconhecem PAMPs ou DAMPs que não foram reconhecidos pelos receptores transmembrânicos (Philpott *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2016). Estruturalmente, os NLRs são formados por três domínios: (I) um domínio na porção C-terminal formado por repetições de leucina (LRR), que tem a função de reconhecer as moléculas microbianas ou os mediadores endógenos de estresse; (II) um domínio NACHT (também denominado NOD) na região central, composto de nucleosídeo trifosfatados que medeia à auto-oligomerização do receptor; e, por fim, (III) um domínio efetor na região N-terminal, que é necessário para a transdução de sinal. Devido à presença deste domínio na região N-terminal, a família dos receptores NLRs pode ser dividida em alguns subgrupos, incluindo os NLRP (NLRP1, NLRP3), com presença do domínio pirina (PYD); e os NLRC (NLRC4), com presença do domínio CARD. Ainda há estudos sobre o inflamassoma AIM2, que pertence à família dos receptores ALRs, pois tem um domínio PYD, assim como um domínio HIN2000 para detecção de dsDNA (Elliot *et al.*, 2015).

Após o reconhecimento e a sinalização da presença de partículas estranhas, os receptores NLRs formam complexos multiproteicos pentaméricos ou heptaméricos chamados inflamassomas. Os inflamassomas podem ser compostos por três componentes principais: um receptor NLR (tais como NLRP1, NLRP3, NLRC4 ou AIM2), uma molécula adaptadora *Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase recruitment domain* (ASC) e uma caspase inflamatória. Alguns inflamassomas, como o NLRP1, não dependem de ASC para serem ativados, enquanto outros, como o NLRC4, podem ser ativados utilizando outras moléculas adaptadoras (Lu *et al.*, 2015). Os inflamassomas canônicos são responsáveis por ativarem a caspase-1 (Davis *et al.*, 2011; Paiva-Oliveira *et al.*, 2012; Lima-Junior *et al.*, 2013), enquanto os inflamassomas não-canônicos, a caspase-11 (Ulland *et al.*, 2015). A ativação do inflamassoma confere proteção ao hospedeiro frente a diversos patógenos, uma vez que desempenha importante papel na resposta imune inata e

promove ação modulatória sobre o sistema imune adaptativo (Martinon *et al.*, 2002; Ciraci *et al.*, 2012).

Os receptores NLRP1, NLRP3, NLRC4 e AIM2 formam os inflamassomas mais estudados. Mas, recentemente, NLRP2, NLRP6, NLRP7, NLRP10, NLRP12, RIG-I, Pyrin e IFI16 têm sido implicados na formação de inflamassomas, no entanto pesquisas adicionais devem ser realizadas para estabelecer o papel preciso da formação e ativação desses inflamassomas. Três dos 22 membros dos receptores NLRs já conhecidos foram descritos em humanos: os NLRP1, NLRP3 e NLRC4 (Lamkanfi *et al.*, 2014; Elliot *et al.*, 2015). Em adição, os receptores NLRs atuam como moléculas sensoras e determinam a especificidade do inflamassoma por meio do reconhecimento específico de determinados produtos microbianos ou sinais de estresse celular (Yang *et al.*, 2012; Bauernfeind *et al.*, 2013; Zamboni e Lima-Junior *et al.*, 2015).

O receptor NLRP1 apresenta papel protetor contra a infecção por *Bacillus anthracis* por meio do reconhecimento de sua toxina letal, o NLRP6 é importante para regular a homeostasia da mucosa intestinal e prevenir a auto-inflamação, o NLRC4 participa da restrição intracelular de bactérias via reconhecimento de flagelina e o AIM2 é essencial para o reconhecimento do DNA de bactérias e vírus (Rathinam *et al.*, 2010; Anand *et al.*, 2011; Pereira, 2011; Tomalka *et al.*, 2011; Elinav *et al.*, 2012). No entanto, o receptor NLRP3 surgiu como o mais versátil devido à sua ampla especificidade em mediar a resposta imune do hospedeiro frente a bactérias (Toma *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013), fungos (Hise *et al.*, 2009; Veerdonk *et al.*, 2011; Tavares *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2014; Mao *et al.*, 2014), vírus (Rajan *et al.*, 2011; Ito *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2015) e parasitas (Lima-Junior *et al.*, 2013; Gorfú *et al.*, 2014), assim como a produtos de células hospedeiras danificadas, como cristais de ácido úrico, ATP, HMGB1 e as proteínas de choque térmico hsp70 e hsp90 (Mariathasan *et al.*, 2006; Martinon *et al.*, 2006; Halle *et al.*, 2008; Lamkanfi e Dixit, 2014).

Após a sinalização promovida pelo reconhecimento de PAMPs ou DAMPs, os receptores NLRP3 se ligam à molécula adaptadora ASC, que por sua vez ativa a enzima caspase-1, formando o

inflamassoma NLRP3 (Martinon *et al.*, 2009; Anand *et al.*, 2011). Quando ativada, a caspase-1 tem a função de promover a clivagem da pró-IL-1 β e pró-IL-18 em suas respectivas formas ativas. Por sua vez, a IL-1 β e a IL-18 contribuem com a defesa do hospedeiro contra as infecções microbianas por aumentarem as propriedades antimicrobianas dos fagócitos e iniciarem as respostas imunes adaptativas Th17 e Th1, respectivamente (van de Veerdonk *et al.*, 2011). Recentemente, mostramos que macrófagos peritoneais de camundondos Balb/c infectados com *S. schenckii* tiveram reduzida atividade de caspase-1, concomitantemente à diminuição da secreção de IL-1 β e IL-18, na 4^a e 6^a semanas pós-infecção (Gonçalves *et al.*, 2015). Interessantemente, essa redução na atividade de caspase-1 ocorreu no mesmo período em que foram relatados, em modelos experimentais semelhantes, aumento da multiplicação fúngica no baço e fígado, assim como imunossupressão, dos animais infectados com *S. schenckii* (Carlos *et al.*, 2009). Deste modo, podemos sugerir um importante envolvimento do inflamassoma na esporotricose.

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória que atua como importante mediador imunológico, pois apresenta papel protetor nas infecções bacterianas, virais e fúngicas, uma vez que é essencial para induzir o desenvolvimento da resposta imune Th17 (Sutton *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010). Por sua vez, as células Th17 secretam, dentre outras citocinas, a IL-17 que protege o hospedeiro de vários agentes agressores por induzir a formação de uma resposta inflamatória (Romagnani *et al.*, 2009; Romani, 2011). Por outro lado, a IL-18 está relacionada com o desenvolvimento das células Th1, pois atua como fator de indução da produção de IFN- γ , uma citocina que tem ação central na imunidade protetora contra fungos (Romani, 2011; Espinosa e Rivera, 2012).

Ao contrário da maioria das citocinas, a IL-1 β e a IL-18 não são secretadas pela via clássica que envolve o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático, pois são produzidas como proteínas precursoras biologicamente inativas, que devem ser clivadas para se tornarem ativas. A expressão de pró-IL-1 β e pró-IL-18 é regulada por meio de transcrição mediada por vias de sinalização, principalmente, pela via NF- κ B, sendo clivadas em suas formas ativas pela caspase-1 (Lamkanfi *et al.*, 2014). No entanto, a pró-IL-18 é constitutivamente expressa em vários tipos

celulares, principalmente em macrófagos, podendo ser clivada em sua forma ativa, além da caspase-1, por outras proteases, como a granzima B, que está presente principalmente em células T CD8⁺, células NK e neutrófilos, indicando que essas células contribuem com a disponibilidade de IL-18 ativa em condições inflamatórias independente da ativação do inflamassoma (Dinarello *et al.*, 2013; van de Veerdonk *et al.*, 2011).

Como dito anteriormente, os inflamassomas não-canônicos são formados pela caspase-11 e, recentemente, foi mostrado que esta protease pode promover a ativação indireta do inflamassoma, pois atua sobre a caspase-1, estimulando a maturação das citocinas pró-inflamatórias pró-IL-1 β ou pró-IL-18. Provavelmente, a ativação da caspase-11 é desencadeada pelo reconhecimento de componentes do LPS presente em bactérias Gram negativas intracelulares, como *Escherichia coli*, *Citrobacter rodentium* e *Vibrio cholerae*, em um mecanismo independente do receptor TLR4 (Zoete *et al.*, 2014). Embora os seres humanos não expressem a caspase-11, estudos recentes indicam que a caspase-4 e caspase-5 em células humanas atuam de forma semelhante a esta protease (Kayagaki *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2015).

Além da produção de potentes mediadores pró-inflamatórios, o inflamassoma NLRP3 defende o hospedeiro dos agentes invasores por piroptose (piro = fogo; ptose = liberação), uma morte celular altamente inflamatória regulada pela caspase-1. Durante o processo de piroptose, ocorre formação de poros na membrana plasmática da célula que promovem inchaço citoplasmático, levando a célula à lise osmótica, e consequentemente, ao extravazamento do conteúdo celular, liberando, principalmente, LDH e IL-1 β (Malireddi *et al.*, 2013; Wellington *et al.*, 2014). A formação do inflamassoma NLRP3 também está relacionada com o recrutamento de populações celulares associadas com a resposta imunológica para restringir a replicação microbiana, assim como com a rápida produção de eicosanoides que promovem maior inflamação e permeabilidade vascular (Kumar *et al.*, 2011; Lamkanfi *et al.*, 2011; Paiva-Oliveira *et al.*, 2012; Strowig *et al.*, 2012).

A morte das células infectadas e, conseqüentemente, a morte do agente infectante, pode promover uma eficiente eliminação do patógeno, conferindo proteção ao hospedeiro. Várias formas de morte celular foram descritas, incluindo mecanismos inflamatórios e não inflamatórios (Bergsbaken *et al.*, 2009; Accarias *et al.*, 2015). A piroptose foi, inicialmente, confundida com a apoptose, pois ambas são processos celulares de auto-destruição mediado por caspases. No entanto, o mecanismo característico de cada uma dessas mortes celulares são diferentes. A piroptose é altamente inflamatória, enquanto a apoptose não é inflamatória pelo fato de promover a absorção do conteúdo celular (Bergsbaken *et al.*, 2009; Accarias *et al.*, 2015).

A ativação do inflamassoma NLRP3 ocorre por dois processos, sendo que o primeiro sinal resulta na transcrição da pró-IL-1 β , pró-IL-18 e dos componentes do inflamassoma, enquanto o segundo sinal, que pode ser iniciado por uma variedade de estímulos, resulta na ativação efetiva do inflamassoma. O segundo passo é claramente necessário para a ativação do NLRP3, entretanto a exigência da separação dessas etapas é menos clara para os inflamassomas NLRP1, NLRC4 e AIM2 (Ulland *et al.*, 2015).

A primeira fase, conhecida como *priming*, ocorre antes ou concomitante com o sinal secundário específico para a ativação do inflamassoma NLRP3. Esta fase ocorre por meio do reconhecimento de PAMPs ou DAMPs pelos receptores TLRs, de interleucina-1 (IL-1R) e de fator de necrose tumoral (TNFR), que sinalizam via MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*), TRIF (*domain-containing adapter-inducing interferon- β*) ou NF- κ B (*nuclear factor- κ B*), a transcrição da pró-IL-1 β , pró-IL-18 e dos componentes do inflamassoma no núcleo celular, que são, então, expressos e liberados para o citosol (Zoete *et al.*, 2014; Elliott *et al.*, 2015). Descobertas recentes têm mostrado que, em conjunto com o *priming*, ocorre a preparação dos componentes do inflamassoma NLRP3 já presentes no citosol por diversas reações químicas (Guo *et al.*, 2015).

A segunda fase de ativação do inflamassoma NLRP3 está relacionada de fato com a clivagem das formas pró-IL-1 β , pró-IL-18 em suas respectivas formas ativas, pois nesta etapa ocorre a ativação da caspase-1 que é responsável pela ativação destas citocinas pró-inflamatórias.

Estes mecanismos secundários de ativação ainda não foram completamente elucidados, mas estudos sugerem três principais vias envolvidas: (I) efluxo de potássio (K^+), (II) ruptura e acidificação lisossomal e (III) produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) (Lamkanfi *et al.*, 2014; Jo *et al.*, 2016). Mais recentemente, estudos têm demonstrado que o aumento do cálcio intracelular (Ca^{2+}), a translocação de NLRP3 para a mitocôndria e a liberação de DNA mitocondrial também podem estar envolvidos com a ativação deste inflamassoma (Elliott *et al.*, 2015; Jo *et al.*, 2016).

A ativação do inflamassoma NLRP3 depende de baixas concentrações de K^+ nos compartimentos intracelulares. Estudos sugerem que o efluxo de K^+ ocorre por meio da ativação do receptor purinérgico P2X7 pela presença do ATP extracelular, ou ainda pela presença de poros na membrana celular formados, via panexina-1, por toxinas, como nigericina, maitotoxinas e hemolisinas. Estes poros também permitem a entrada de produtos microbianos no citoplasma, ativando o inflamassoma NLRP3 (Ferreira *et al.*, 1997, 2006; Mariathasan *et al.*, 2006; Kanneganti *et al.*, 2007). A confirmação que o efluxo de K^+ é necessária para a ativação do inflamassoma NLRP3 foi demonstrada pela perda da atividade deste complexo proteico quando o canal de K^+ foi bloqueado (Latz *et al.*, 2013; Zoete *et al.*, 2014).

A ruptura e acidificação lisossomal durante a fagocitose de partículas exógenas ou endógenas também foi relacionada com a ativação do inflamassoma NLRP3. A presença de enzimas lisossomais, como a catepsina B, no citosol celular, rompem o fagolisossomo, e então partículas estranhas estariam livres no citoplasma, desencadeando a ativação do inflamassoma NLRP3. Isto foi confirmado porque o inibidor da catepsina B (CA-074-Me) inibiu parcialmente a ativação do inflamassoma NLRP3. A acidificação lisossomal também leva à ruptura do fagolisossomo, pois a inibição desta acidificação, com o inibidor de ATPase de H^+ (bafilomicina A), diminuiu a ativação do inflamassoma NLRP3 (Halle *et al.*, 2008; Hornung *et al.*, 2008; van de Veerdok *et al.*, 2011). O aumento intracelular de Ca^{2+} também pode estar envolvido na ativação deste inflamassoma, pois elevadas quantidades deste íon são liberadas com a desestabilização dos lisossomos (Murakami *et al.*, 2012; Latz *et al.*, 2013; Zoete *et al.*, 2014; Elliot *et al.*, 2015).

Outro mecanismo envolvido na ativação secundária do inflamassoma NLRP3 é a produção de EROs, no entanto sua função exata ainda não foi totalmente esclarecida (Zoete *et al.*, 2014). Inicialmente, achava-se que as EROs produzidas intracelularmente por meio do sistema NADPH oxidase ativassem o inflamassoma NLRP3, mas animais e humanos com células defeituosas em NADPH oxidase tiveram a ativação normal deste complexo proteico (Dostert *et al.*, 2008; Hornung *et al.*, 2008; van Bruggen *et al.*, 2010). Porém, outros estudos apontam que as EROs liberadas pela mitocôndria se ligam diretamente ao NLRP3, podendo ativar este inflamassoma (Zhou *et al.*, 2011; Heide *et al.*, 2013).

Como já exposto, o inflamassoma NLRP3 pode apresentar atividade protetora ao hospedeiro, mas sua ativação desregulada pode desencadear diversas patologias devido ao dano tecidual provocado pelo excesso de respostas imune e inflamatória (Elliott *et al.*, 2015). As patologias associadas a este inflamassoma incluem doenças auto-imunes e auto-inflamatórias (arterosclerose), doenças neurodegenerativas (esclerose múltipla, doença de Alzheimer e doença de Parkinson) e distúrbios metabólicos (diabetes tipo 2 e obesidade), assim como artropatia, isquemia do coração e doença renal, doença vascular, dentre outras (Guo *et al.*, 2015).

Nesse sentido, estudos têm mostrado que algumas moléculas fisiológicas atuam como reguladoras do inflamassoma NLRP3. As moléculas A20 (*tumor necrosis factor alpha-induced protein*) e AhR (*aryl hydrocarbon receptor*) são reguladores negativos do inflamassoma NLRP3, pois inibem a sinalização de NF- κ B e a transcrição efetiva de NLRP3, respectivamente (Huai *et al.*, 2014; Vande Wall *et al.*, 2014). Além disso, há moléculas que impedem a montagem do complexo do inflamassoma NLRP3, uma vez que o NO que inibe a formação de ASC, CARD8 (*caspase recruitment domain 8*) se liga diretamente ao NLRP3, e LRRFIP2 (*leucine-rich repeat Fli-I-interacting protein 2*) inibe a ativação de caspase-1 (Jin *et al.*, 2013; Mao *et al.*, 2013; Ito *et al.*, 2014). Por fim, o CO (monóxido de carbono) e TRIM30 (*tripartite-motif protein 30*) podem controlar, em partes, a ativação do inflamassoma NLRP3, pois modulam a geração de EROs (Hu *et al.*, 2010; Jung *et al.*, 2015). Deste modo, um bom equilíbrio deve ser mantido entre a ativação e a

inibição do inflamassoma NLRP3 para permitir que o sistema imunológico elimine os patógenos sem causar danos ao hospedeiro (Latz *et al.*, 2013). Portanto, diante do exposto, tornou-se imprescindível avaliar a influência do inflamassoma NLRP3 na infecção por *S. schenckii*.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar o papel do inflamassoma NLRP3 na modulação da resposta imune na infecção sistêmica experimental por *S. schenckii*.

3.2. Objetivos específicos

- estabelecer modelo experimental em camundongos C57BL/6 WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Caspase-1^{-/-} ao longo da infecção;
- analisar o estado de ativação dos macrófagos por meio da liberação de óxido nítrico na presença do fungo;
- observar a produção das citocinas IL-1 β , IL-18, IL-17 e IFN- γ no sobrenadante da cocultura de macrófagos peritoneais e esplenócitos totais;
- quantificar a ativação de caspase-1 nos macrófagos peritoneais provenientes dos diferentes camundongos em estudo;
- analisar a presença das subpopulações de linfócitos T *helper* (TCD4) e citotóxicos (TCD8) durante o curso da infecção.

4. Delineamento experimental

O fungo termodimórfico *S. schenckii* apresenta as formas de micélio e levedura. Para a manutenção da sua forma miceliar, este fungo foi mantido em meio ágar micobiótico (Mycosel®). Para realizar a reversão para sua fase leveduriforme, que é a forma infectante utilizada neste trabalho, o tapete fúngico miceliar foi transferido para caldo de infusão de cérebro e coração (BHI). A partir desta massa de leveduras foram realizadas as extrações dos antígenos fúngicos, o extrato lipídico (LeY) e fração álcali-insolúvel (F1), que foram utilizados em alguns experimentos propostos neste estudo.

Os animais utilizados foram camundongos *Wild-Type* e *Knockout*: WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Caspase-1^{-/-} com *background* C57BL/6. Estes animais foram divididos em oito grupos experimentais, sendo quatro grupos infectados (WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Caspase-1^{-/-}) e quatro grupos não infectados (WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Caspase-1^{-/-}). Os animais infectados receberam a inoculação intraperitoneal de 10⁶ leveduras de *S. schenckii*, enquanto os não infectados receberam a inoculação, pela mesma via, de 200 µL de PBS.

Após a inoculação do fungo ou do PBS, o modelo experimental foi determinado pelo teste de sobrevivência, parâmetros e índice esplênicos, análise histológica pela coloração de Grocott-Gomori e contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs) presentes no baço dos animais em estudo, para comparar os animais geneticamente modificados com os WT. Deste modo, foi possível estabelecer o curso da infecção e avaliar os melhores períodos para dar prosseguimento ao estudo. Os dias 7, 14 e 21 foram determinados para analisar os diversos parâmetros imunológicos, pois nestes períodos os diferentes animais apresentaram maior suscetibilidade, decréscimo e final da infecção por *S. schenckii*, respectivamente.

Após a determinação do modelo experimental, os animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais foram eutanasiados em Câmara de CO₂ para obtenção das células do exsudato peritoneal (PECs) e das células esplênicas totais. Os macrófagos peritoneais, obtidos pela aderência das PECs, foram estimulados com os antígenos fúngicos (LeY e F1), lipopolissacarídeo (LPS)

como controle positivo ou apenas meio de cultura (RPMI-C) como controle negativo. Desta cultura, o sobrenadante foi utilizado para a dosagem da produção de óxido nítrico (NO) pela reação de Griess, enquanto as células aderentes foram utilizadas para o teste de viabilidade celular pelo método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyl-tetrazolium). Além disso, os macrófagos peritoneais foram utilizados para verificar a ativação de caspase-1, por meio do reagente Flica (Fluorescent Labeled Inhibitors of Caspases - FAM-YVAD-FMK).

Os esplenócitos totais também foram expostos aos antígenos fúngicos LeY e F1, concanavalina A (Con-A) utilizada como controle positivo e apenas RPMI-C como controle negativo. Estas células foram utilizadas para o teste de viabilidade celular por meio do método do MTT, assim como para a fenotipagem com marcadores específicos para quantificar a presença das subpopulações dos linfócitos T auxiliares (Th17 – CD3+CD4+ROR γ t+, Th1 – CD3+CD4+Tbet+, Th17/Th1 – CD3+CD4+Tbet+ROR γ t+ e Treg – CD3+CD4+CD25+FoxP3+) e dos linfócitos T citotóxicos (CD3+CD8+). Com ambos os tipos celulares, macrófagos peritoneais e esplenócitos totais, foi realizada uma cocultura, que foi exposta aos antígenos fúngicos LeY e F1, LPS e Con-A e RPMI-C por 24 horas. O sobrenadante do cocultivo celular foi utilizado para determinar a produção das citocinas IL-1 β , IL-18, IL-17 e IFN- γ por teste imunoenzimático (ELISA).

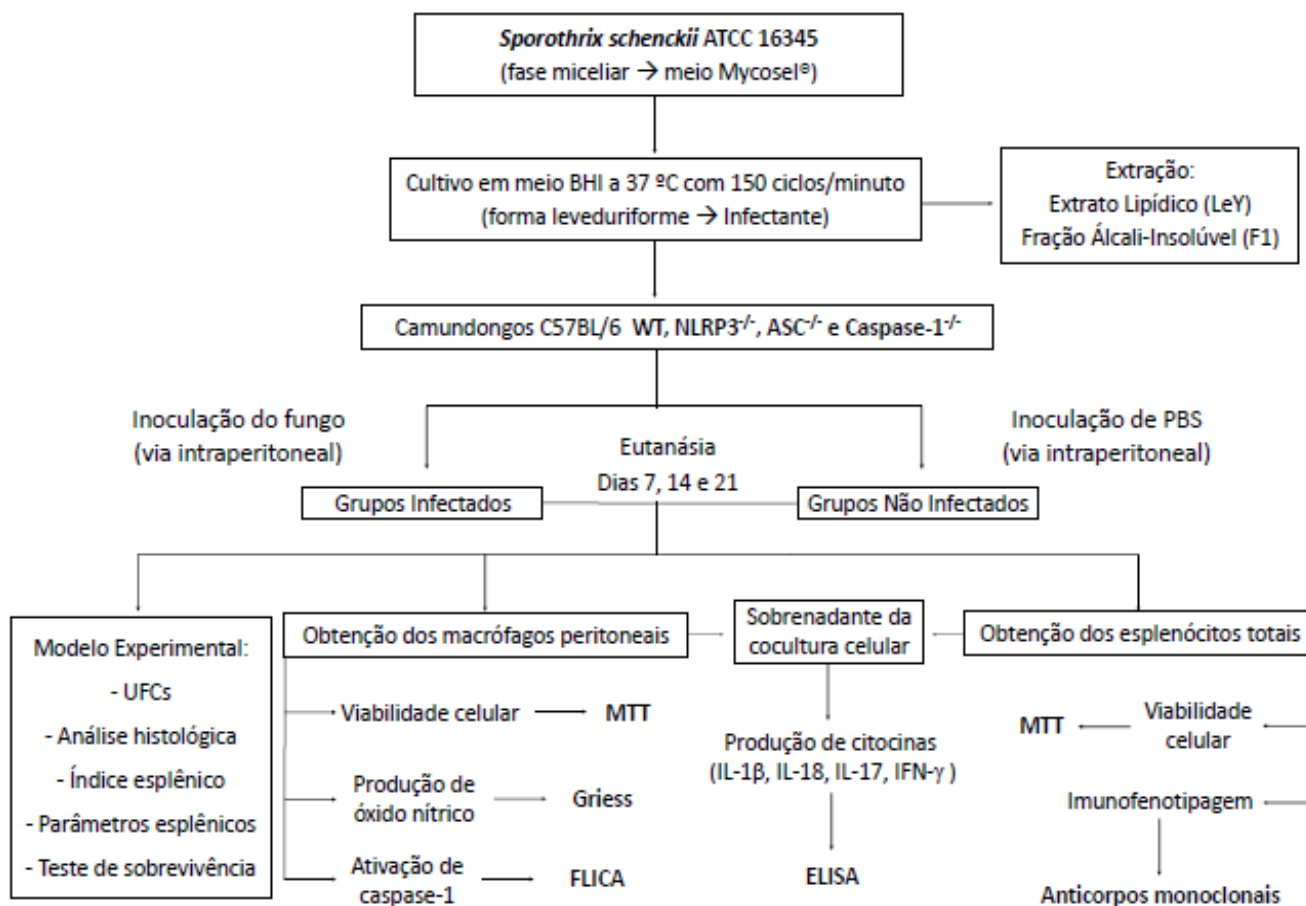


Figura 1. Fluxograma das atividades desenvolvidas. Camundongos WT, NLRP3^{-/-} ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} com *background* C57BL/6 infectados e não infectados com *S. schenckii* durante os dias 7, 14 e 21 foram avaliados em diversos parâmetros imunológicos conforme descrito no fluxograma das atividades desenvolvidas. °C – Graus celsius, ASC - *Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain*, BHI – *Brain heart infusion*, ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, FLICA - *Fluorescent-labeled inhibitor of caspases*, IFN-γ - *Interferon gama*, IL – *interleucina*, MTT - *Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio*, NLRP3 - *NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3*, UFC – *Unidades formadoras de colônias*, WT - *Wild-Type*.

5. Materiais e Métodos

5.1. Microrganismo e condições de cultura

A cepa *Sporothrix schenckii* ATCC 16345, gentilmente cedida pela Fundação Oswaldo Cruz e originalmente obtida de um caso humano de infecção pulmonar difusa (Baltimore, MD) foi utilizada neste estudo. O fungo foi mantido em sua forma miceliar a 25 °C em meio de cultura sólido Mycosel® (BD Biosciences). Para obtenção da forma leveduriforme, a massa de crescimento fúngico em forma miceliar foi transferida para meio líquido BHI (Difco) e cultivada a 37 °C sob agitação constante de 150 ciclos por minuto, por um período de 12 dias, até que se tenha obtido uma conversão hifa-levedura acima de 90% (Ferreira *et al.*, 2015).

5.2. Reativação do *Sporothrix schenckii*

Para manutenção da virulência, a cepa *S. schenckii* ATCC 16345 foi reativada periodicamente. Para realização deste procedimento, camundongos da linhagem C57BL/6 WT foram inoculados, via intraperitoneal, com 100 µL de uma suspensão de células leveduriformes *S. schenckii*, com concentração de 1×10^8 células/mL em solução de PBS. Após sete dias de infecção, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ para remoção do baço, que foi macerado e plaqueado em ágar Sabouraud. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por sete dias e, após o crescimento das colônias fúngicas, estas foram repassadas para tubos contendo meio Mycosel® para proliferação do fungo na forma miceliar.

5.3. Obtenção dos antígenos de *Sporothrix schenckii*

Após a proliferação de *S. schenckii* em sua fase miceliar, o tapete fúngico foi transferido para 100 mL de meio de cultura BHI líquido, a 37 °C, com constante agitação de 150 ciclos por minuto. Após sete dias, 12,5 mL desta suspensão fúngica foram transferidos para 250 mL de meio de cultura BHI líquido e esta se manteve em agitação, novamente, por sete dias. Em seguida, foram

transferidos 50 mL desta suspensão fúngica para 1000 mL de meio de cultura BHI líquido, que ficou em agitação, novamente, por sete dias para obtenção total de leveduras. Esse procedimento foi realizado a fim de obter-se um volume final suficiente da suspensão fúngica para a extração dos antígenos do fungo *S. schenckii*: Extrato lipídico (LeY) e Fração álcali-insolúvel (F1) (Carlos *et al.*, 1999).

5.3.1. Extrato lipídico

Para obtenção do extrato lipídico (LeY) foram necessárias sucessivas extrações do lipídeo presente nas leveduras *S. schenckii* com os seguintes sistemas solventes: clorofórmio:metanol (C:M) (2:1, v/v) e (1:1, v/v) e clorofórmio:metanol:água (C:M:H) (4:8:3, v/v). Em seguida, o extrato obtido foi concentrado em rotaevaporador até a secura. O resíduo lipídico foi ressuspenso em meio RPMI e sonicado até obtenção de uma solução homogênea (Carlos *et al.*, 1999). A concentração de uso escolhida foi de 31,25 µg/mL.

5.3.2. Fração álcali-insolúvel

Para a extração da fração álcali-insolúvel (F1), as leveduras de *S. schenckii* foram tratadas com clorofórmio:metanol (C:M) (2:1, v/v) e (1:1, v/v), e clorofórmio:metanol:água (C:M:H) (4:8:3, v/v) para retirada dos lipídeos da parede celular, e após centrifugação, a 405 x *g* por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado. O resíduo foi tratado com NaOH 1N sob leve agitação durante 2 horas e posteriormente centrifugado a 405 x *g* durante 5 minutos, este processo foi repetido por quatro vezes. Os resíduos álcali-insolúveis de cada centrifugação foram reunidos e lavados com água destilada até neutralização do pH (7,0). Em seguida, o resíduo total foi lavado com etanol absoluto, acetona e éter etílico e em seguida foi seco à temperatura ambiente, ressuspenso em PBS e sonicado até obtenção de uma solução homogênea (Kanetsuna *et al.*, 1969; Carlos *et al.*, 1999). A concentração de uso escolhida foi de 62,50 µg/mL.

5.4. Animais

Camundongos Wild-Type (WT), NLRP3 knockout (NLRP3^{-/-}), ASC knockout (ASC^{-/-}) e Caspase-1 knockout (Caspase-1^{-/-}) com *background* C57BL/6, machos, pesando entre 18 e 25 g, com aproximadamente quatro semanas de idade, cedidos pelo Prof. Dr. Dario Simões Zamboni do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP), foram utilizados no estudo. Estes animais foram mantidos em gaiolas com condições ambientais de temperatura e umidade estáveis (23 ± 2 °C e 56 ± 2 % de umidade relativa do ar) e ciclos de claro/escuro de 12 horas e receberam água e ração esterilizadas, *ad libitum* (Gonçalves *et al.*, 2015). Todos os procedimentos realizados com os animais estavam de acordo com as regras do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, Parecer Comitê de Ética nº 17/2013 (Anexo).

5.5. Grupos experimentais

Neste estudo foram utilizados oito grupos experimentais: os grupos infectados por *S. schenckii* (WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Caspase-1^{-/-}) e os grupos não infectados (WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Caspase-1^{-/-}). Os experimentos se deram nos dias 7, 14 e 21 pós-inoculação, pois nestes períodos os diferentes animais apresentaram maior suscetibilidade, decréscimo e final da infecção por *S. schenckii*, respectivamente.

5.6. Método de infecção dos animais

A infecção dos animais foi realizada com a forma leveduriforme de *S. schenckii*, obtida pela transferência de uma parte da massa de crescimento fúngico em forma miceliar para meio de cultura BHI líquido (Difco), da qual, após 7 dias de cultivo a 37 °C sob agitação constante de 150 ciclos por minuto, uma alíquota contendo 1×10^7 leveduras foi transferida para um novo caldo BHI e cultivada por mais 5 dias nas mesmas condições. Este procedimento garantiu que a cultura

utilizada para as infecções estivesse em fase logarítmica de crescimento e com uma taxa de conversão hifa-levedura de aproximadamente 100%. A suspensão foi ajustada à concentração de 5×10^6 células/mL e, cada animal, foi inoculado intraperitonealmente, com 200 μ L desta suspensão contendo 1×10^6 leveduras. Os animais dos grupos não infectados receberam a inoculação intraperitoneal de 200 μ L de PBS (Ferreira *et al.*, 2015).

5.7. Determinação do modelo experimental

5.7.1. Unidades formadoras de colônias

A avaliação da carga fúngica foi avaliada por meio da contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) presentes no baço dos animais. Este órgão foi retirado de forma asséptica e macerado em RPMI-C. Em diluições pré-determinadas, alíquotas deste macerado foram plaqueadas em ágar Mycosel[®], para permitir a contagem adequada das colônias do fungo presentes neste órgão. As UFCs foram contadas após 3 dias de incubação à temperatura ambiente (Ferreira *et al.*, 2015).

5.7.2. Análise histológica

A análise histológica dos baços dos animais infectados e não infectados foi realizada pela coloração Gomori-Grocott (Grocott, 1955) que impregna o fungo pela prata, deixando *S. schenckii* com coloração marrom-dourado, possibilitando analisar e quantificar a presença deste patógeno nas amostras. Após o corte dos baços, as lâminas foram coradas conforme indicações do fabricante (Easy Path). Brevemente, o ácido crômico foi adicionado na quantidade suficiente para cobrir o corte e esperou-se 10 minutos. A seguir, a lâmina foi lavada em água corrente por três minutos e depois seca. Adicionou-se solução de bissulfito sobre o corte e esperou-se 30 segundos. A lâmina foi lavada em água corrente, depois água destilada e seca. Uma solução de água destilada com solução de metanamina e nitrato de prata e bórax, na proporção 2:2:1, foi preparada e colocada sobre as lâminas dentro de um recipiente úmido, que permaneceu de 25 a 50 minutos em estufa a 70

°C. Assim que o corte adquiriu uma coloração caramelo, a lâmina foi lavada com água destilada e seca. Depois, foi coberta com solução de cloreto de ouro por um minuto. Novamente a lâmina foi lavada em água corrente e seca. A lâmina foi coberta com solução de hipossulfito e, após um minuto, lavada como anteriormente. Por último, foi adicionado solução de verde luz por 20 segundos e lavou-se a lâmina rapidamente em água corrente. Após secar, a lâmina foi desidratada com álcool ascendente até o xilol e montadas para análise. Cada baço foi classificado de acordo com a presença do fungo (0 – ausência, 1 – baixa, 2 – moderada, 3 – elevada, 4 – extrema). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (LEICA DM2500) e as fotos foram capturadas através do *software* do próprio aparelho.

5.7.3. Parâmetros e índices esplênicos

Para análise dos parâmetros esplênicos (peso, comprimento e largura) e do índice esplênico (comprimento x largura x diâmetro), os baços dos animais infectados e não infectados foram removidos, pesados em balança de precisão (Boeco, Germany) e medidos com auxílio de paquímetro digital (Mitutoyo Sul Americana Ltda, Ind. Bras.) (Negrini *et al.*, 2013).

5.7.4. Teste de sobrevivência

Os animais infectados e não infectados foram acompanhados por 70 dias para avaliação da sobrevivência (van de Veerdonk *et al.*, 2011).

5.8. Obtenção das células do exsudato peritoneal

Os animais infectados e não infectados foram previamente inoculados com 3 mL de tioglicolato de sódio 3%, três dias antes de serem eutanasiados em câmara de CO₂. Após eutanásia, estes animais tiveram o peritônio exposto. Posteriormente, foram inoculados 5,0 mL de PBS estéril, pH 7,4, gelado; na cavidade abdominal, aplicando-se leve massagem para estimular a liberação dos macrófagos peritoneais. A suspensão celular resultante foi coletada e centrifugada a 300 x g por 5

minutos a 4 °C e lavada com PBS estéril. Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma) contendo 2β-mercaptoetanol (Sigma) a 2×10^{-5} M, penicilina 100 U/mL (Sigma), estreptomicina 100 U/mL (Sigma), L-glutamina 2 mM (Sigma) e 5% de soro fetal bovino (Cultilab), sendo o meio assim composto designado de RPMI-1640 completo (RPMI-C) (Alegranci *et al.*, 2013). A concentração das células foi determinada por contagem em câmara de Neubauer (Boeco, Germany) por corante de Lázarus e ajustada à concentração de 5×10^6 células/mL em RPMI-C.

5.9. Obtenção dos esplenócitos totais

Os animais infectados e não infectados foram eutanasiados em câmara de CO₂. Em seguida, o peritônio foi aberto e exposto para a extração do baço de forma asséptica em câmara de fluxo laminar Classe 100 (Veco). Os baços foram retirados e macerados em 2 mL de RPMI-C em uma placa de Petri com *cell strainer* com poros de 100 µm (BD Biosciences) com auxílio do êmbolo de uma seringa para liberação das células. À suspensão resultante foram adicionados 6 mL de solução hipotônica de cloreto de amônio (0,17 M) e incubada por 5 minutos em gelo para lise das hemácias. As células do baço foram separadas do sobrenadante por centrifugação a 300 x g por 5 minutos a 4 °C, lavadas com RPMI-C e ressuspensas em 1mL do mesmo meio (Negrini *et al.*, 2012). A concentração das células foi determinada por contagem em câmara de Neubauer (Boeco, Germany) pela técnica de exclusão com azul de Trypan (0,04%) e ajustada à concentração de 1×10^7 células/mL em RPMI-C.

5.10. Avaliação da viabilidade das células do exsudato peritoneal

A viabilidade dos macrófagos peritoneais foi verificada pela metodologia do MTT (Mosmann, 1983). Em placa de cultura de tecido de 96 cavidades de fundo plano foram distribuídos 100 µL por poço das suspensões dos macrófagos peritoneais de animais infectados e não infectados, ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL em meio de cultura RPMI-C, em presença de 100

μL dos antígenos LeY, F1, LPS (controle positivo) ou somente RPMI-C (controle negativo). As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂. Às células aderentes foram adicionados 100 μL de uma solução de MTT a 1 mg/mL. A placa foi incubada por mais 3 horas nas mesmas condições. Após esta incubação, os sobrenadantes foram descartados e as células aderentes foram tratadas com 100 μL de isopropanol para solubilizar os cristais de formazana. A leitura da densidade óptica foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan ASCent, Labsystems) em UV/visível para microplacas em 540 nm com filtro de referência em 620 nm.

5.11. Avaliação da viabilidade dos esplenócitos totais

Em placa de cultura de tecidos de 96 cavidades de fundo plano foram distribuídos 100 μL por cavidade das suspensões de células do baço de animais infectados e não infectados, ajustadas à concentração de 1×10^7 células/mL em meio de cultura RPMI-C, em presença de 100 μL dos antígenos LeY, F1, Con-A (controle positivo) ou somente RPMI-C. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C em estufa com tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific). Após este período, foram acrescidos 20 μL por cavidade de uma solução de MTT a 5 mg/mL. A placa foi incubada por mais 3 horas nas mesmas condições. Ao término desta incubação, as placas foram centrifugadas a 800 x g por 10 minutos a 10 °C. Os sobrenadantes foram descartados e adicionou-se 100 μL de isopropanol (Mallinckrodt Chemical) para solubilizar os cristais de formazana (Mosmann modificado, 1983). A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro UV/visível para microplacas (Multiskan ASCent, Labsystems) em 540 nm com filtro de referência de 620 nm.

5.12. Determinação da produção de óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) foi quantificado por meio do acúmulo de nitrito no sobrenadante da cultura dos macrófagos peritoneais pela reação de diazotação com o reagente de Griess (Green *et al.*, 1982). As células do exsudato peritoneal de animais infectados e não infectados foram cultivadas a 5×10^6 células/mL em RPMI-C na presença dos antígenos LeY, F1, LPS (controle positivo) ou somente RPMI-C por 24 horas a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após esta incubação, alíquotas de 50 µL do sobrenadante da cultura destas células foram colocadas em contato com 50 µL da solução de Griess. Após 10 minutos de incubação, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foi realizada a leitura da absorvância em espectrofotômetro UV/Visível para microplacas (Multiskan ASCent, Labsystems) em 540 nm.

5.13. Obtenção do sobrenadante da cocultura

Para a obtenção do sobrenadante da cocultura foram cultivados 500 µL das células do exsudato peritoneal dos animais infectados e não infectados, na concentração de 5×10^6 células/mL em RPMI-C, em placas de cultura de tecidos de 48 cavidades de fundo chato por 1 hora a 37 °C com 5 % de CO₂ para aderência dos macrófagos. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados e às células aderentes foram acrescentados 500 µL do LeY, F1, LPS (controle positivo), Con-A (controle positivo) ou somente RPMI-C (controle negativo), juntamente com 500 µL dos esplenócitos totais, obtidos dos mesmo animais, na concentração de 1×10^7 células/mL em RPMI-C. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C em estufa com 5% de CO₂ (Forma Scientific) (Gonçalves *et al.*, 2015). Após este período, os sobrenadantes das coculturas foram coletados, centrifugados a 35060 x g por 10 minutos a 4 °C, aliquotados e estocados em freezer a – 80°C para dosagem das citocinas.

5.14. Determinação da liberação *ex vivo* de citocinas

As citocinas IL-1β, IL-18, IL-17 e IFN-γ foram determinadas por ELISA (eBioscience) nos sobrenadantes da cocultura de macrófagos peritoneais e esplenócitos totais de acordo com as

instruções do fabricante. Brevemente, as placas foram adsorvidas com 100 µL por poço das soluções com anticorpo de captura diluídos nas concentrações sugeridas pelo fabricante e incubadas *overnight* a 4 °C. Após lavagens (PBS - Tween 20 a 0,05% - v/v), as placas foram incubadas com 200 µL de tampão de bloqueio (PBS – 10% Soro Fetal Bovino) por poço por 1 hora em temperatura ambiente. Após lavagens, foram adicionados 100 µL por poço do padrão de citocinas ou dos sobrenadantes das coculturas celulares a serem testados e as placas foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. Novamente foram lavadas e incubadas com 100 µL por poço dos anticorpos de detecção biotinilados por mais uma 1 hora à temperatura ambiente. Após novas lavagens, as placas foram incubadas com avidina–peroxidase por 30 minutos à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e incubadas com 100 µL por poço do substrato TMB por 15 minutos em temperatura ambiente, em local protegido da luz, com posterior bloqueio da reação com de 50 µL de H₂SO₄ 2M por poço. Nestas reações há formação de cromóforos que tiveram sua absorvância lida em espectrofotômetro UV/Visível para microplacas (Multiskan ASCent, Labsystems) em 450 nm. As concentrações das citocinas específicas nos sobrenadantes foram determinadas comparando-se a densidade óptica dos poços contendo as amostras com uma curva padrão obtidas pelas densidades nos poços contendo as citocinas recombinantes de concentração conhecida. O limite de detecção para as diferentes citocinas foi de 7,8 pg/mL.

5.15. Marcação da caspase-1 ativa com FAM-FLICA

Após a obtenção e aderência das células do exsudato peritoneal (item 5.10) dos animais infectados e não infectados, 500 µL dessas células, na concentração de 1×10^6 células/mL em RPMI-C, foram cultivados em placas de cultura de tecidos de 48 cavidades por 1 hora a 37 °C com 5 % de CO₂. Decorrido este período, o sobrenadante foi descartado e as células foram transferidas para tubos de citometria com o auxílio de *cell scraper*. Às células foram adicionados 10 µL do reagente Flica (FAM-YVAD-FMK caspase-1 FLICA™ Kit, Immunochemistry Technologies), que se liga covalentemente à caspase-1 ativa. As suspensões celulares foram homogeneizadas e

incubadas por 1 hora em estufa a 37 °C com tensão constante de 5 % CO₂. Em seguida, as células foram lavadas com *wash buffer* 1X e centrifugadas por 5 minutos a 300 x g. As células foram ressuspensas em 200 µL de *wash buffer* 1X, com acréscimo de 2 µL de PI (iodeto de propídio). As células foram homogeneizadas, mantidas em gelo e ao abrigo da luz (Dupont *et al.*, 2009). Para a análise em citômetro de fluxo foram feitas estratégias de *gating* para excluir as células aderidas entre si (*doublets*) e para isso as células foram selecionadas pelos parâmetros FSC-A (Área) e FSC-H (Altura). As amostras foram analisadas a partir dos eventos totais dentro da exclusão de *doublets*, com *threshold* ajustado para 1.800.000 no parâmetro FSC-H para exclusão do *debris* celular. Foram adquiridos pelo menos 40.000 eventos totais no citômetro de fluxo BD Accuri (Becton & Dickinson, San Diego, CA, USA). As amostras foram analisadas utilizando o *software* do próprio aparelho.

5.16. Fenotipagem dos esplenócitos

Os esplenócitos totais de animais infectados e controle foram avaliados quanto à presença das subpopulações dos linfócitos T *helper* (T CD4: Th17 – CD3+CD4+RORγt+, Th1 – CD3+CD4+T-bet+, Th17/Th1 – CD3+CD4+RORγt+T-bet+, Treg – CD3+CD4+CD25+FoxP3+) e dos linfócitos T citotóxicos (T CD8). Os seguintes anticorpos monoclonais anti-camundongo foram usados: anti-CD3 FITC (clone 17A2), anti-CD4 APC (clone RM4-5), anti-RORγt PE (clone B2D), anti-T-bet PerCP-Cy5.5 (clone eBio4B10), anti-Foxp3 PE-Cy7 (clone FJK-16s), anti-CD25 PE (clone PC61.5) e anti-CD8a FITC (clone 53-6.7); todos obtidos da eBioscience. As células foram distribuídas em tubos FACS (BD PharMingen, San Diego, USA), na concentração de 1 x 10⁶ células por tubo para realização da análise fenotípica das mesmas. As células foram lavadas com PBS/BSA 1% (solução tamponada contendo 1% albumina soro bovino) e posteriormente foram adicionados 0,5 µg dos anticorpos monoclonais extracelulares de interesse, CD3, CD4, CD25 e CD8; seguido de incubação de 30 minutos a 4 °C no escuro. Após esse período, as células foram novamente lavadas com PBS/BSA 1%, centrifugadas a 300 x g por 5 minutos a 4 °C. Após a

centrifugação, foram adicionados 100 µL de solução de fixação (BD Fixation Buffer) e estas foram incubadas por 30 minutos a 4 °C no escuro. Novas lavagens foram efetuadas com o tampão de permeabilização (BD Perm/Wash™) e às células foram adicionados 0,5 µg dos anticorpos monoclonais intracelulares de interesse, RORγt, T-bet e Foxp3; e estas foram incubadas, novamente, por 30 minutos a 4 °C no escuro. Em seguida, as células foram lavadas novamente com tampão de permeabilização e foram ressuspensas em 250 µL de PBS/BSA 1%. Os resultados finais foram obtidos pela subtração dos eventos relativos aos respectivos isotipos controle dos fluorocromos referentes aos anticorpos intracelulares, PE Rat IgG1κ; PerCP.Cy5.5 Rat IgG2ακ, PE Rat IgG2ακ e PE Rat IgG2ακ. Para a análise em citômetro de fluxo foram feitas estratégias de *gating* para excluir as células aderidas entre si (*doublets*) e para isso as células foram selecionadas pelos parâmetros FSC-A (Área) e FSC-H (Altura). As amostras foram analisadas a partir dos eventos totais dentro da exclusão de *doublets* e com *threshold* ajustado para 800.000 no parâmetro FSC-H para exclusão de *debris* celular. Foram adquiridos pelo menos 100.000 eventos totais no citômetro de fluxo BD Accuri (Becton & Dickinson, San Diego, CA, USA). As amostras foram analisadas utilizando o *software* do próprio aparelho.

5.17. Análise dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do software GraphPad Prism InStat 6.01 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA). Para comparação entre múltiplos grupos foi utilizada a análise de variância (*two-way* ANOVA ou *one-way* ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Diferenças nos valores entre dois grupos foram determinadas utilizando o teste *t* de Student. Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças que apresentaram valores de *P* igual ou menor a 0,05. As análises são representativas de três experimentos independentes e os resultados são representados como média acompanhada do desvio padrão (DP).

6. Resultados

6.1. O inflamassoma NLRP3 pode controlar a infecção por *S. schenckii*

Para avaliar o papel do inflamassoma NLRP3 no controle da infecção por *S. schenckii* e o desenvolvimento do processo infeccioso provocado por este patógeno no hospedeiro, a carga fúngica presente no baço dos animais WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} foi avaliada. A cinética da infecção foi definida pelos dias 7, 14 e 21 pós-inoculação do fungo nos animais, pois nestes períodos os hospedeiros apresentaram maior suscetibilidade ao patógeno, eliminação ativa do fungo e, por fim, controle e resolução da infecção. A carga fúngica presente no baço dos animais foi determinada pela contagem das UFCs e pelo corte histológico corado por Gomori-Grocott.

A carga fúngica no baço dos animais NLRP3^{-/-} foi maior que nos animais WT em todos os dias avaliados, mas, principalmente, no dia 7 pós-infecção (Figura 2). Estes resultados foram confirmados pela análise histológica, com exceção do dia 14 pós-infecção (Figura 3). Por outro lado, os animais ASC^{-/-} exibiram maior carga fúngica apenas no dia 7 pós-infecção, enquanto que os Casp-1^{-/-} nos dias 7 e 21 pós-infecção, quando comparados com os animais WT (Figura 2). Adicionalmente, a análise histológica confirmou os resultados encontrados pelas UFCs nesses animais, demonstrando maior presença de *S. schenckii* nos baços dos animais ASC^{-/-} no dia 7 pós-infecção e nos Casp-1^{-/-} nos dias 7 e 21 pós-infecção quando comparados com os animais WT (Figura 3). Curiosamente, no dia 14 pós-infecção, os animais Casp-1^{-/-} apresentaram carga fúngica semelhante aos animais WT. Apesar da dificuldade em eliminar o fungo, todos os animais KO foram, similarmente aos animais WT, capazes de sobreviver e eliminar completamente a infecção após 35 dias.

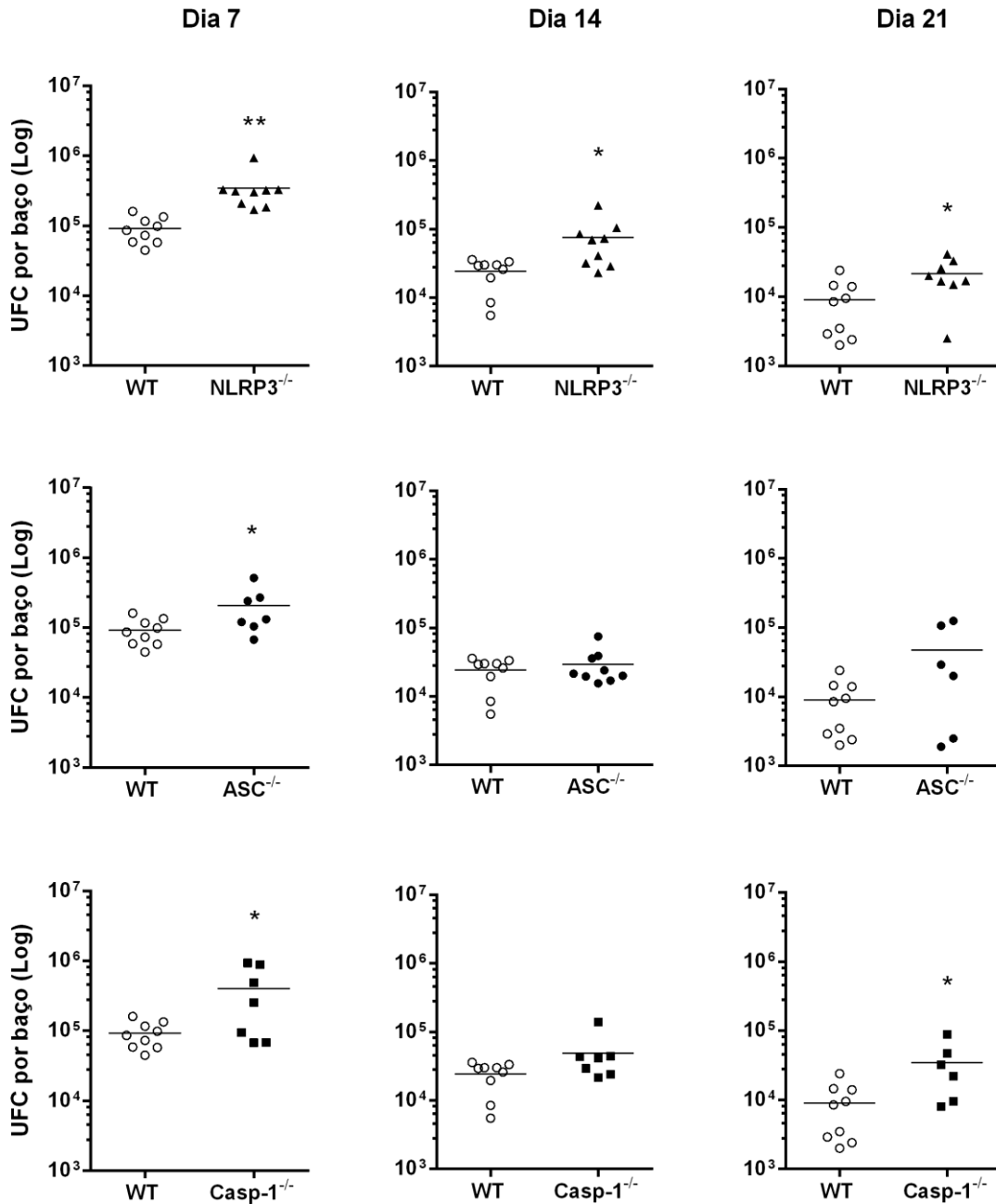


Figura 2. Determinação das unidades formadoras de colônias presentes no baço dos animais infectados por *S. schenckii*. A carga fúngica presente no baço de camundongos WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} com *background* C57BL/6 infectados com *S. schenckii* foi analisada pela recuperação das unidades formadoras de colônias (UFCs) nos dias 7, 14 e 21 pós-infecção. Os resultados estão apresentados em escala logarítmica e cada símbolo representado indica um animal em três experimentos independentes. A significância estatística foi determinada pelo teste *t* de Student e intervalo de confiança em 95%. **p*<0,05 e ***p*<0,01 para a comparação das médias dos animais NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} com WT.

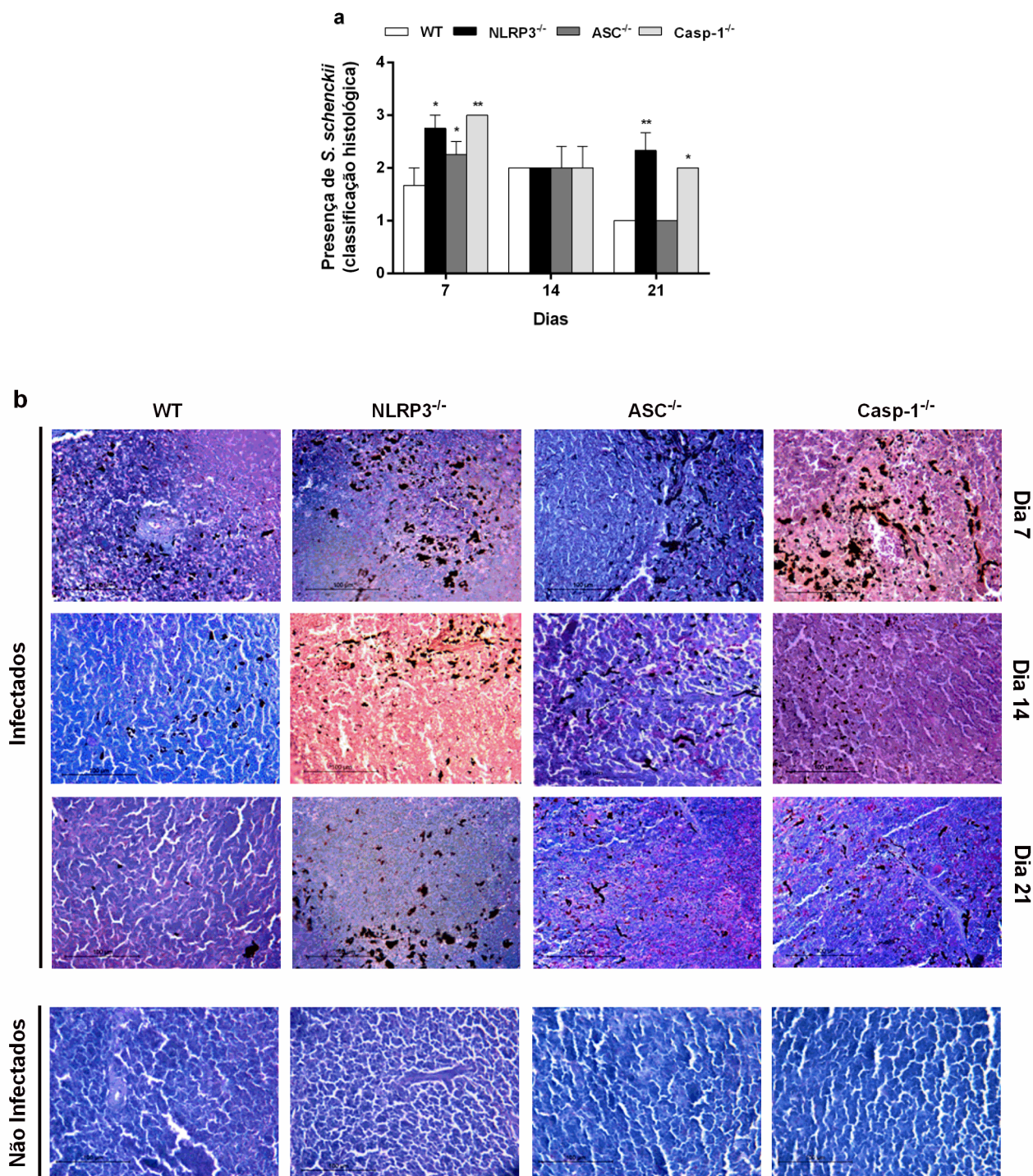


Figura 3. Determinação da presença de fungo no baço dos animais infectados com *S. schenckii*. (a) Carga fúngica de *S. schenckii* presente no baço de camundongos WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} com *background* C57BL/6 analisada pela contagem do número de organismos impregnados com prata pela utilização da coloração Gomori-Grocott nos dias 7, 14 e 21 pós-infecção. (b) Fotos representativas obtidas a partir do baço de camundongos WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} com *background* C57BL/6 infectados e não infectados com *S. schenckii* nos dias 7, 14 e 21 pela coloração de Gomori-Grocott. Os resultados estão apresentados como a média $\pm$ desvio padrão de dois experimentos independentes com 4 animais. A significância estatística foi determinada por ANOVA de 2 vias com pós-teste de Bonferroni e intervalo de confiança em 95%. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ para a comparação das médias dos animais NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} com WT.

6.2. O inflamassoma NLRP3 favorece a resposta inflamatória no baço durante a infecção

Para verificar a resposta imunológica e inflamatória dos diferentes animais frente ao *S. schenckii*, de forma indireta, os índices e parâmetros esplênicos foram analisados no decorrer da infecção. Os índices esplênicos encontrados nos animais NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} foi menor que nos animais WT nos dias 14 e 21 pós-infecção (Figura 4). Adicionalmente, entre os animais infectados, os parâmetros esplênicos, incluindo peso, comprimento e largura do baço, foram inferiores nos três tipos de animais KO quando comparados aos animais WT no dia 21 pós-infecção (Figura 5). Entre os animais WT e KO não infectados não houve diferença nos índices e parâmetros esplênicos durante todo o estudo.

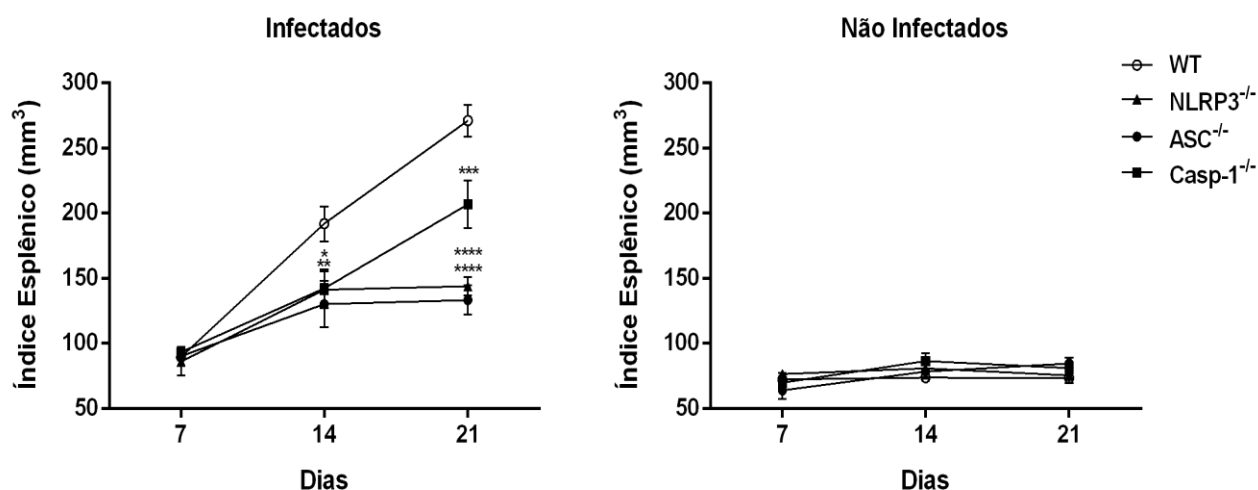


Figura 4. Determinação do índice esplênico. Índices esplênicos de camundongos WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} com *background* C57BL/6 infectados e não infectados com *S. schenckii* nos dias 7, 14 e 21. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes com 5 animais. Os resultados estão apresentados em milímetro (mm³). A significância estatística foi determinada por ANOVA de 2 vias com pós-teste de Bonferroni e intervalo de confiança em 95%. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ para a comparação das médias dos animais NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} com WT.

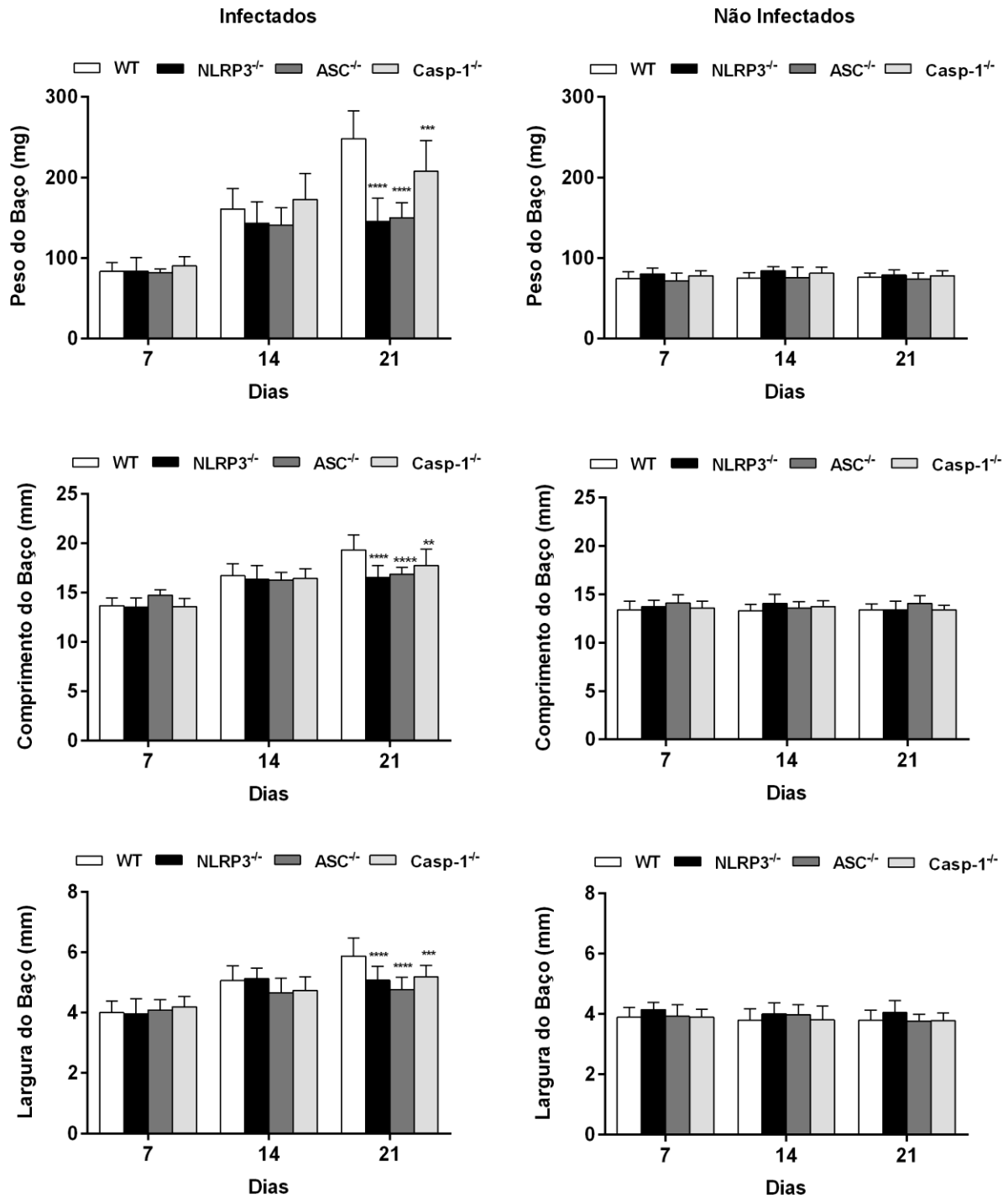


Figura 5. Determinação dos parâmetros esplênicos. Peso e medidas do baço de camundongos WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} com *background* C57BL/6 infectados e não infectados com *S. schenckii* nos dias 7, 14 e 21. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes com 5 animais. Os resultados estão apresentados em miligrama (mg) e milímetro (mm). A significância estatística foi determinada por ANOVA de 2 vias com pós-teste de Bonferroni e intervalo de confiança em 95%. **p<0,01; ***p<0,001 e ****p<0,0001 para a comparação das médias dos animais NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} com WT.

6.3. Avaliação da toxicidade dos antígenos do fungo frente às células imunológicas do hospedeiro

O teste de viabilidade celular foi realizado na cultura de macrófagos peritoneais e em esplenócitos totais para verificar se as condições de cultura e os antígenos fúngicos utilizados como estímulos poderiam ser tóxicos para estas células. Os percentuais das substâncias testadas foram calculados considerando como a maior viabilidade celular (100%) aquelas culturas realizadas somente em presença de meio RPMI-C.

As células dos animais infectados e não infectados, tanto os macrófagos peritoneais quanto os esplenócitos totais, de todas as linhagens dos camundongos, não apresentaram diferenças significativas em suas viabilidades quando expostas às condições de cultura ou aos estímulos fúngicos (Figuras 6 e 7). Assim, os macrófagos peritoneais e esplenócitos totais apresentaram viabilidade satisfatória mediante cultivo de 24 horas com os antígenos do *S. schenckii*, pois nas concentrações estudadas, 31,25 µg/mL para LeY e 62,50 µg/mL para F1, estes compostos não foram tóxicos para as células do hospedeiro, uma vez que as viabilidades celulares permaneceram maiores que 80%.

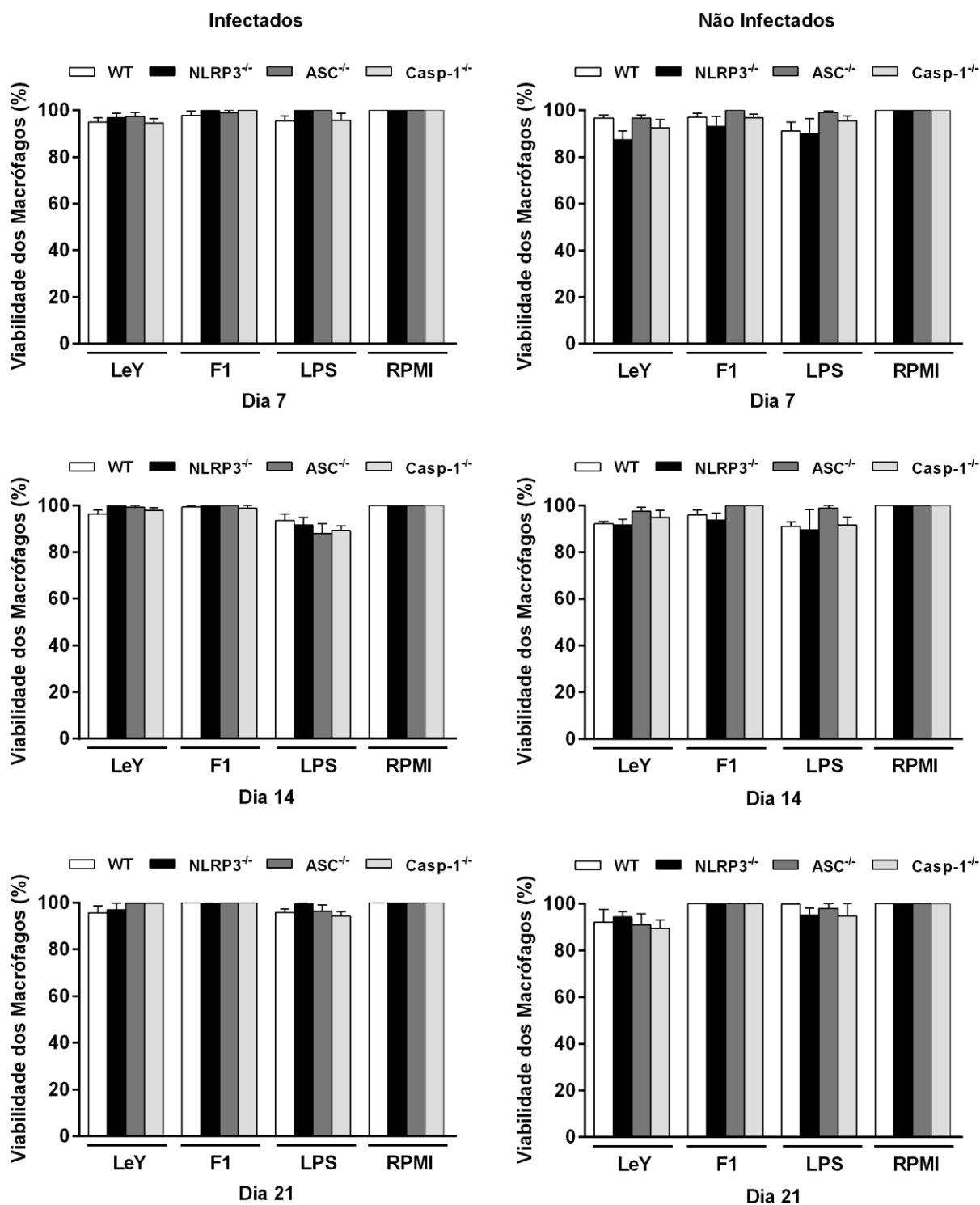


Figura 6. Avaliação da toxicidade dos antígenos fúngicos nas culturas de macrófagos peritoneais. Os macrófagos peritoneais de camundongos WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} com *background* C57BL/6 infectados e não infectados com *S. schenckii* foram cultivados em presença do LeY, F1, LPS ou somente em presença do meio RPMI-C durante os dias 7, 14 e 21. A viabilidade celular foi analisada pelo método do MTT. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de experimento feito em duplicata e são representativos de três experimentos independentes com 5 animais. Os resultados estão apresentados em percentual (%).

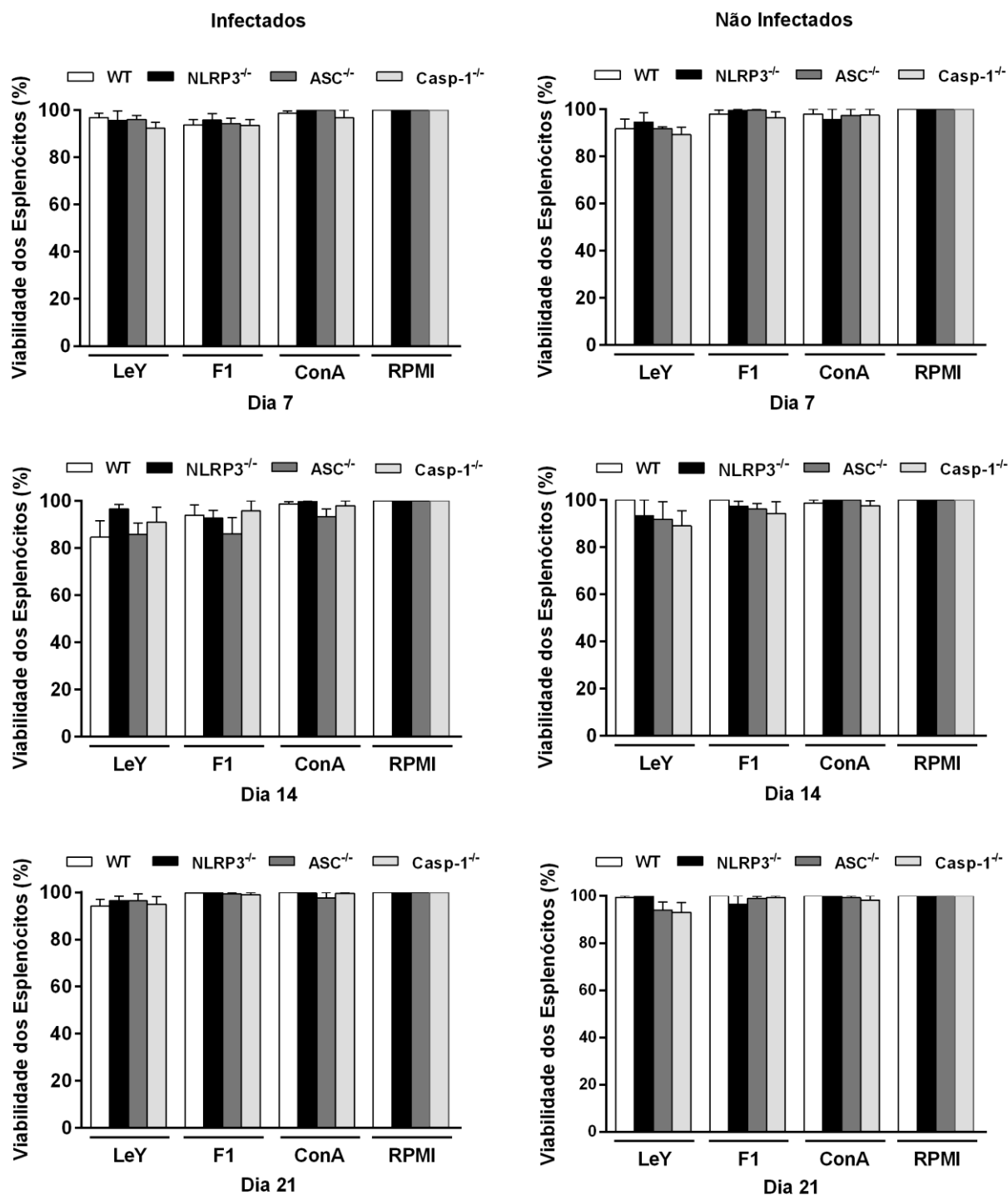


Figura 7. Avaliação da toxicidade dos diferentes estímulos em estudo quando expostos aos esplenócitos totais. Esplenócitos totais de camundongos WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} com *background* C57BL/6 infectados e não infectados com *S. schenckii* foram cultivados em presença do LeY, F1, ConA ou somente em presença do meio RPMI-C durante os dias 7, 14 e 21. A viabilidade celular foi analisada pelo método do MTT. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de experimento feito em duplicata e são representativos de três experimentos independentes com 5 animais. Os resultados estão apresentados em percentual (%).

6.4. A liberação de óxido nítrico é deficiente na ausência do receptor NLRP3 na fase inicial da infecção

Para avaliar a relação entre o inflamassoma NLRP3 e a resposta inflamatória durante a infecção por *S. schenckii*, os níveis de NO foram determinados no sobrenadante de macrófagos peritoneais desafiados com LeY e F1. Tanto frente à estimulação com LeY, quanto com F1, a liberação de NO pelas células dos animais ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} infectados foi semelhante à dos animais WT infectados durante todos os dias avaliados. Por outro lado, frente a ambas estimulações, a liberação de NO pelas células dos animais NLRP3^{-/-} infectados foi menor que aquela encontrada nos animais WT infectados somente no dia 7 pós-infecção (Figura 8). Nos animais não infectados a produção de NO foi baixa durante todos os dias do estudo.

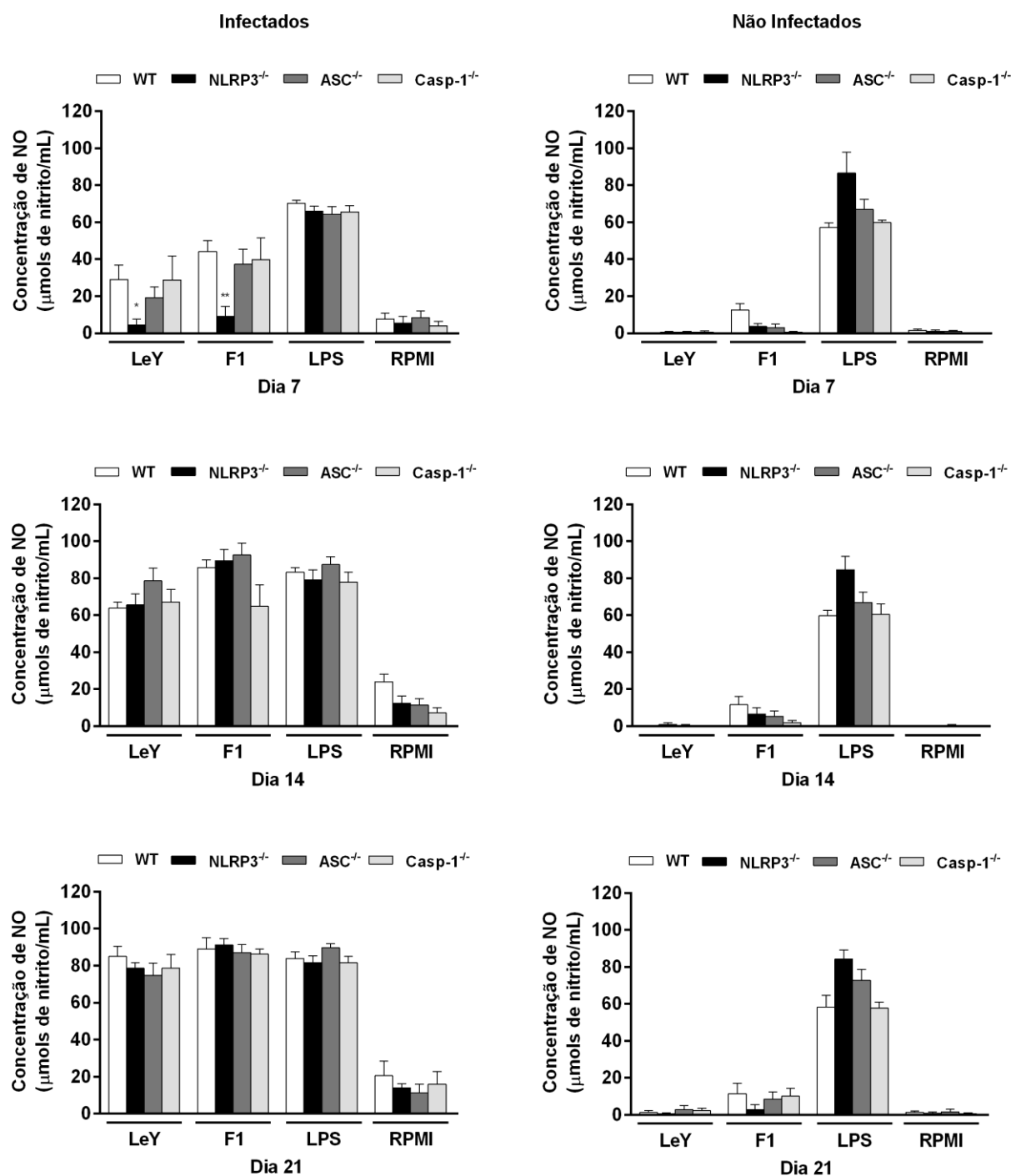


Figura 8. Determinação da produção de óxido nítrico. Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais de camundongos WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} com *background* C57BL/6 infectados e não infectados com *S. schenckii* durante os dias 7, 14 e 21 foram cultivados em presença do LeY, F1, LPS ou somente em presença do meio RPMI-C. A produção de NO foi avaliada pelo método de Griess. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão e são representativos de três experimentos independentes com 5 animais. A significância estatística foi determinada por ANOVA de 1 via com pós-teste de Bonferroni e intervalo de confiança em 95%. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ para a comparação das médias dos animais NLRP3^{-/-} com WT.

6.5. O inflamassoma NLRP3 está relacionado à produção de IL-1 β e IL-17

Dado que a ativação do inflamassoma NLRP3 resulta na produção de IL-1 β a partir do seu precursor inativo, a pró-IL-1 β , a liberação *ex vivo* desta citocina foi mensurada na co-cultura de macrófagos peritoneais e esplenócitos totais. Após a estimulação com LeY, a liberação de IL-1 β pelas células dos animais NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} infectados foi reduzida quando comparada aos animais WT infectados apenas no dia 14 pós-infecção. Por outro lado, após a estimulação com F1, a liberação de IL-1 β pelas células dos três tipos de animais KO infectados foi notavelmente diminuída quando comparado com os animais WT infectadas durante todos os dias avaliados (Figura 9).

Além disso, como a citocina IL-1 β é conhecida por induzir a produção de IL-17, esta última citocina também foi avaliada. Quando estimuladas com LeY, as células dos animais NLRP3^{-/-} liberaram níveis menores de IL-17 quando comparados com os animais WT apenas no dia 14 pós-infecção e, interessante, foram capazes de liberar mais IL-17 que dos animais WT no dia 21 pós-infecção. Por outro lado, as células dos animais ASC^{-/-} liberaram níveis menores de IL-17 durante todos os dias da infecção, enquanto que as células dos animais Casp-1^{-/-} nos dias 7 e 14 pós-infecção, quando comparados com os animais WT.

Ainda sobre a liberação de IL-17, quando estimulados com F1, as células dos animais NLRP3^{-/-}, apesar de terem uma liberação reduzida de IL-1 β durante todos os dias da infecção avaliados, mostraram níveis de IL-17 diminuídos quando comparados com os animais WT apenas nos dias 7 e 14 pós-infecção. Já os animais ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} infectadas mostraram reduzida liberação de IL-17 quando comparada com os WT infectados durante todo o período de estudo, coincidindo com a liberação de IL-1 β (Figura 10). A liberação de IL-1 β e IL-17 pelas células dos animais não infectados foi baixa durante todo o estudo.

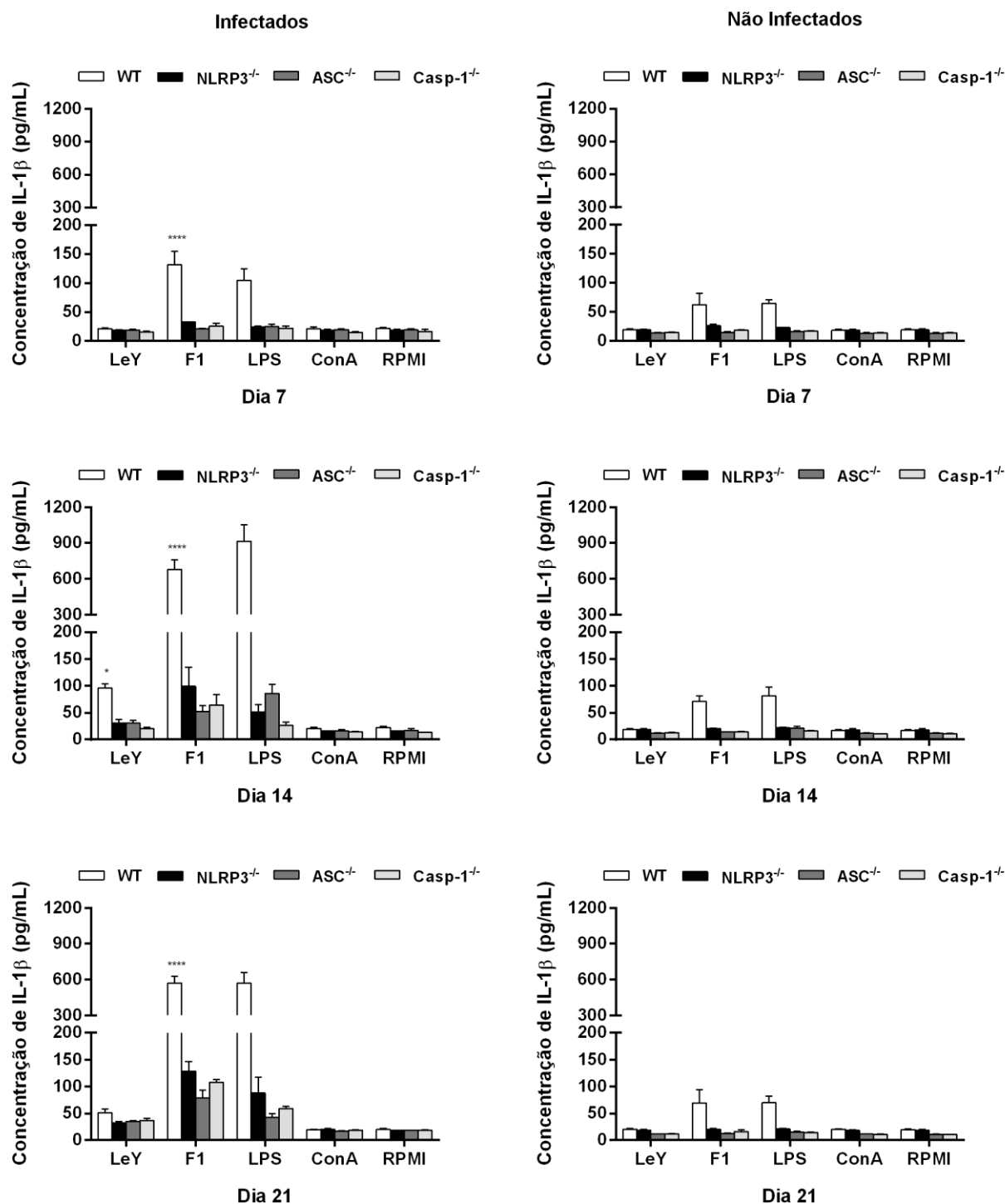


Figura 9. Produção da citocina IL-1β. Concentração de IL-1β liberada no sobrenadante da cocultura de macrófagos peritoneais e esplenócitos totais de camundongos WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} com background C57BL/6 infectados e não infectados com *S. schenckii* durante os dias 7, 14 e 21. As PECs, após aderência, e os esplenócitos totais de camundongos infectados e não infectados foram cultivados em presença de LeY, F1, LPS, Con-A ou somente em meio RPMI-C. Os resultados estão apresentados como a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes com 5 animais. A significância estatística foi determinada por ANOVA de 1 via com pós-teste de Bonferroni e intervalo de confiança em 95%. ** $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$ para a comparação das médias dos animais NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} com WT.

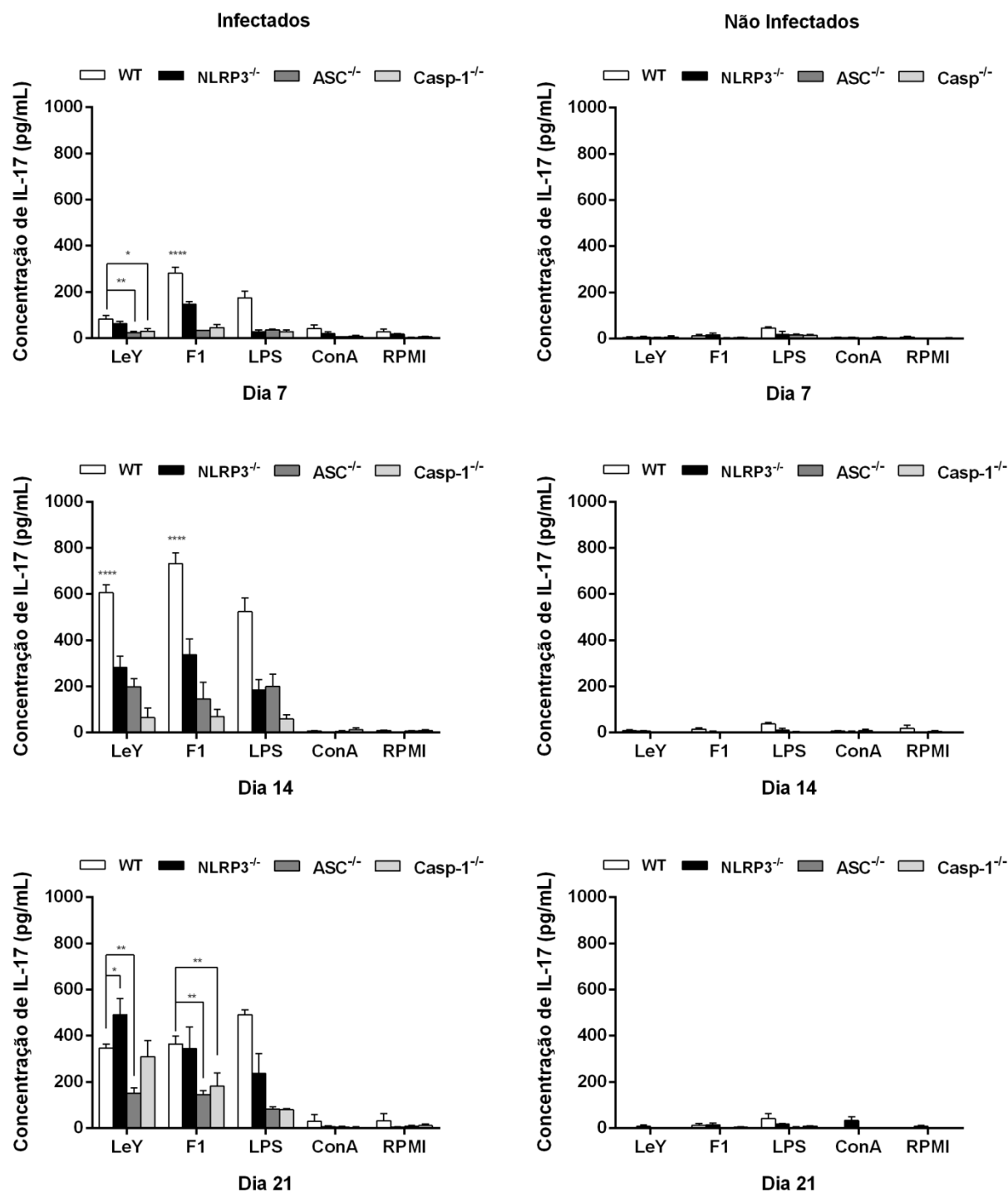


Figura 10. Produção da citocina IL-17. Concentração de IL-17 liberada no sobrenadante da cocultura de macrófagos peritoneais e esplenócitos totais de camundongos WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} com *background* C57BL/6 infectados e não infectados com *S. schenckii* durante os dias 7, 14 e 21. As PECs, após aderência, e os esplenócitos totais de camundongos infectados e não infectados foram cultivados em presença de LeY, F1, LPS, Con-A ou somente em meio RPMI-C. Os resultados estão apresentados como a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes com 5 animais. A significância estatística foi determinada por ANOVA de 1 via com pós-teste de Bonferroni e intervalo de confiança em 95%. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ para a comparação das médias dos animais NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} com WT.

6.6. A produção de IL-18, mas não de IFN- γ , parece ser dependente do inflamassoma NLRP3

Seguindo a ideia de que a ativação do inflamassoma NLRP3 também é responsável pela maturação da citocina IL-18, a liberação desta citocina também foi avaliada. A liberação de IL-18 pelas células dos animais NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} infectados, quando estimuladas tanto com LeY quanto com F1, foi marcadamente diminuída quando comparada com os animais WT infectados no dia 7 pós-infecção. Sobretudo, os animais ASC^{-/-} mostraram também prejudicada liberação de IL-18 no dia 21 pós-infecção, frente a ambos os estímulos (Figura 11).

Como uma das funções da IL-18 inclui a indução da produção de IFN- γ , os níveis de IFN- γ foram avaliados. Desta forma, esperavamos que a liberação de IFN- γ pelas células dos animais KO infectados fosse menor que aquela encontrada nos animais WT, principalmente no período inicial da infecção devido aos baixos níveis de IL-18 encontrados nos três grupos dos animais KO. No entanto, interessante, a liberação de IFN- γ não foi afetada nos grupos KO infectados, não havendo diferenças significativas na produção de IFN- γ entre os animais WT e KO infectados, com exceção dos animais NLRP3^{-/-} que liberaram maiores níveis de IFN- γ que os WT no dia 7 pós-infecção (Figura 12). A liberação de IL-18 e IFN- γ pelas células dos animais não infectados foi baixa em todos os dias de estudo.

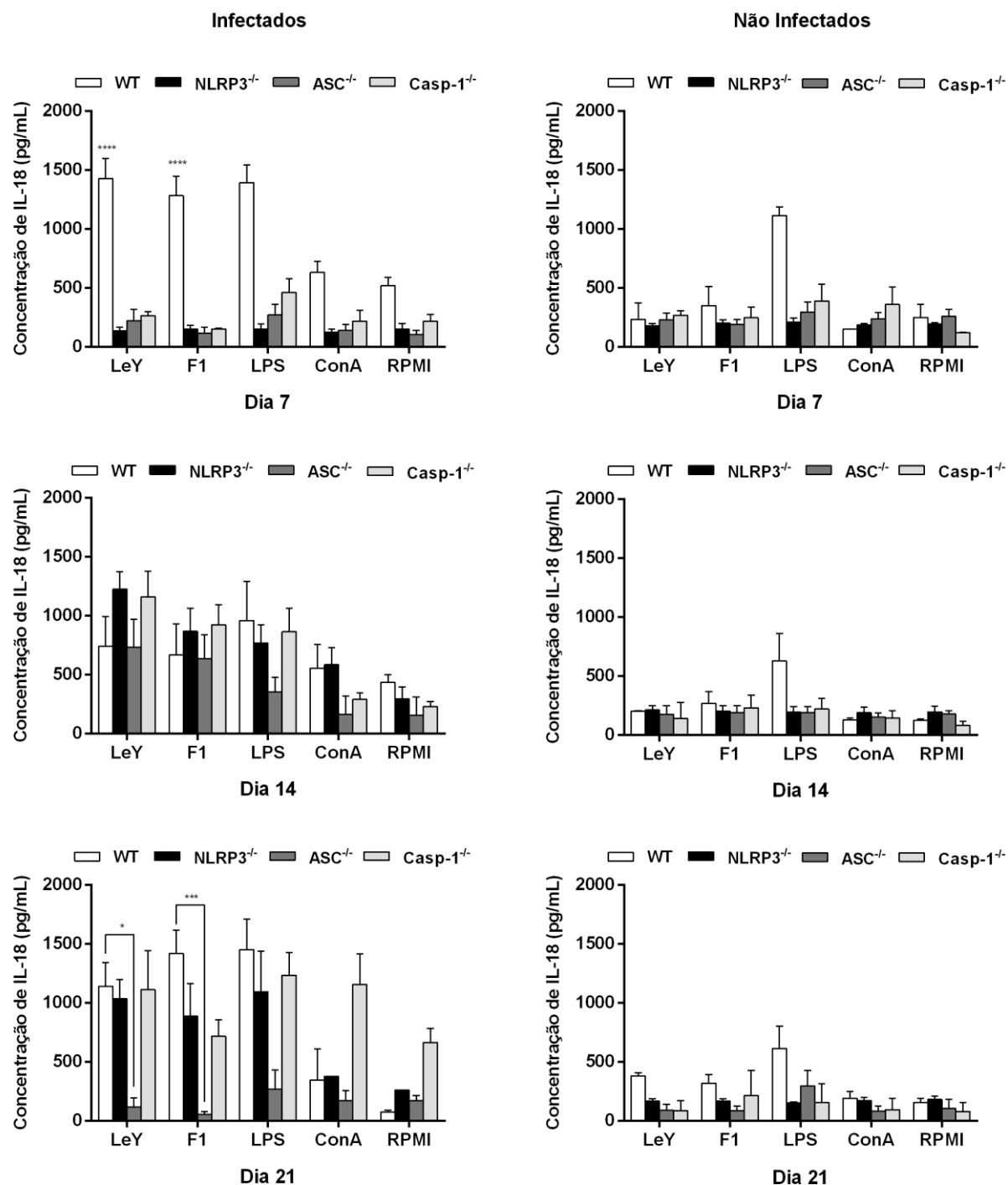


Figura 11. Produção da citocina IL-18. Concentração de IL-18 liberada no sobrenadante da cocultura de macrófagos peritoneais e esplenócitos totais de camundongos WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} com *background* C57BL/6 infectados e não infectados com *S. schenckii* durante os dias 7, 14 e 21. As PECs, após aderência, e os esplenócitos totais de camundongos infectados e não infectados foram cultivados em presença de LeY, F1, LPS, Con-A ou somente em meio RPMI-C. Os resultados estão apresentados como a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes com 5 animais. A significância estatística foi determinada por ANOVA de 1 via com pós-teste de Bonferroni e intervalo de confiança em 95%. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ para a comparação das médias dos animais NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} com WT.

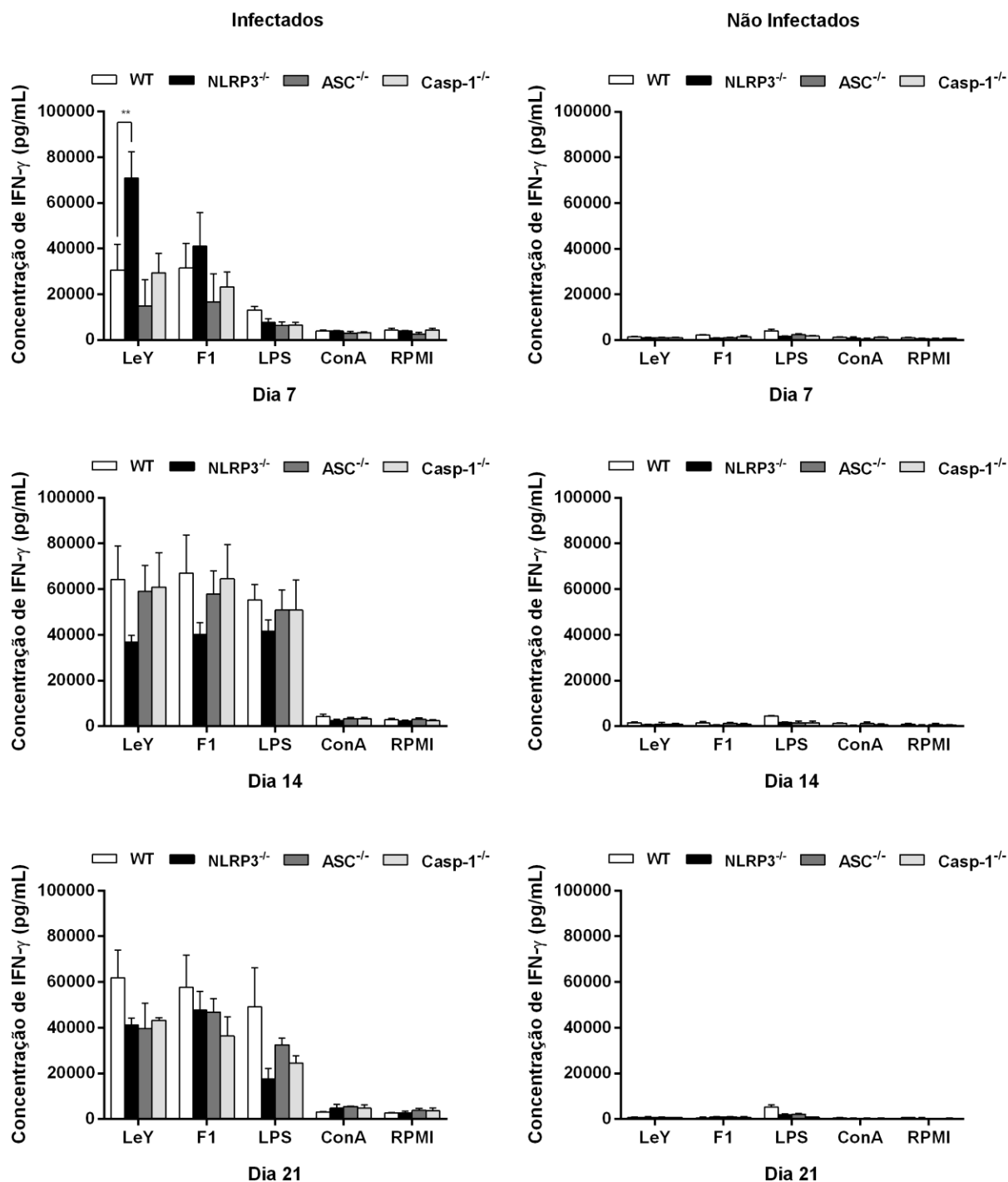


Figura 12. Determinação da produção de IFN- γ . Concentração de IFN- γ liberada no sobrenadante da cocultura de macrófagos peritoneais e esplenócitos totais de camundongos WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} com *background* C57BL/6 infectados e não infectados com *S. schenckii* durante os dias 7, 14 e 21. As PECs, após aderência, e os esplenócitos totais de camundongos infectados e não infectados foram cultivados em presença de LeY, F1, LPS, Con-A ou somente em meio RPMI-C. Os resultados estão apresentados como a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes com 5 animais.

6.7. A ativação do inflamassoma NLRP3 desencadeia maior expressão de caspase-1 ativa e morte celular por piroptose

Como a ativação do inflamassoma NLRP3 requer a caspase-1, a participação desta protease durante a infecção por *S. Schenckii* foi avaliada. A frequência de células com caspase-1 ativa foi semelhante entre os três tipos de animais KO e WT durante todos os dias da infecção avaliados, com exceção dos animais Casp-1^{-/-} que apresentaram menor frequência de células com caspase-1 ativa que os WT no dia 14 pós-infecção. No entanto, a expressão de caspase-1 ativa, medida pela mediana da intensidade de fluorescência – MFI, foi significativamente inferior nas células dos três tipos de animais KO que nos WT no dia 7 pós-infecção. Por conseguinte, neste mesmo dia da infecção, os animais NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} mostraram frequência inferior de células em piroptose que os WT (Figura 13). Os animais KO e WT não infectados mostraram baixa frequência de células com caspase-1 ativa, assim como baixa expressão desta protease e menor processo piroptótico durante todo o estudo.

Os gráficos *dotplots* da estratégia de *gating* para determinar as populações Flica e/ou PI positivas, nos macrófagos peritoneais dos camundongos WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} estão representados nos quadrantes correspondentes a cada marcador durante o dia 7 da infecção (Figura 14).

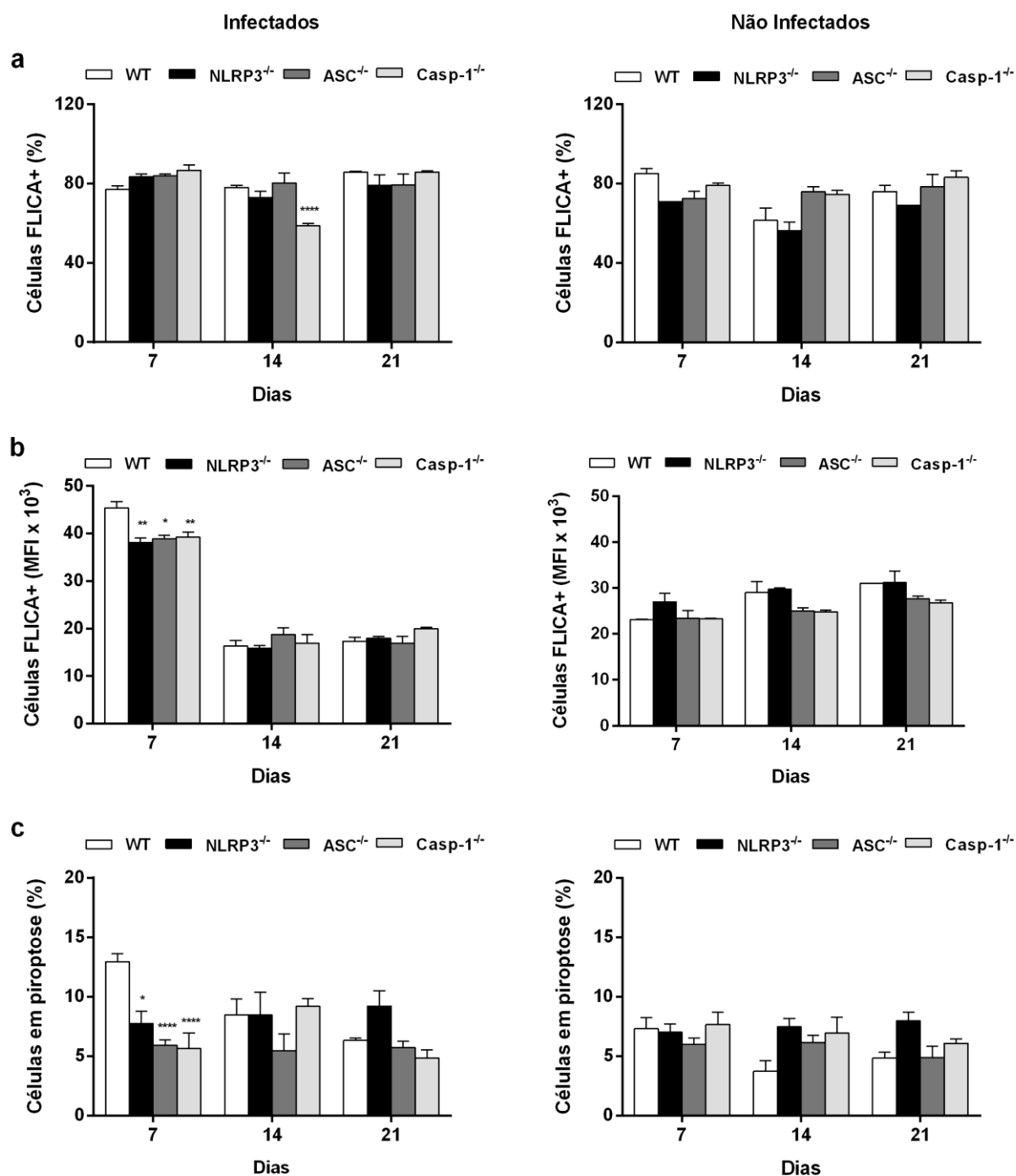


Figura 13. Determinação da ativação de caspase-1 e da morte celular por piroptose. Macrófagos peritoneais de camundongos WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} com *background* C57BL/6 infectados e não infectados com *S. schenckii* durante os dias 7, 14 e 21 foram marcados com *Fluorescent labeled inhibitor of caspases* (Flica) e iodeto de propídio (PI). **(a)** Porcentagem de macrófagos peritoneais positivos para caspase-1 ativa. **(b)** Valores médios das medianas da intensidade de fluorescência das células positivas para Flica. **(c)** Porcentagem de macrófagos peritoneais em morte celular por piroptose. Os dados estão apresentados como a média $\pm$ desvio padrão de um experimento com 3 animais. A significância estatística foi determinada por ANOVA de 2 vias com pós-teste de Bonferroni e intervalo de confiança em 95%. *p<0,05; **p<0,01 e ****p<0,0001 para a comparação das médias dos animais NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} com WT.

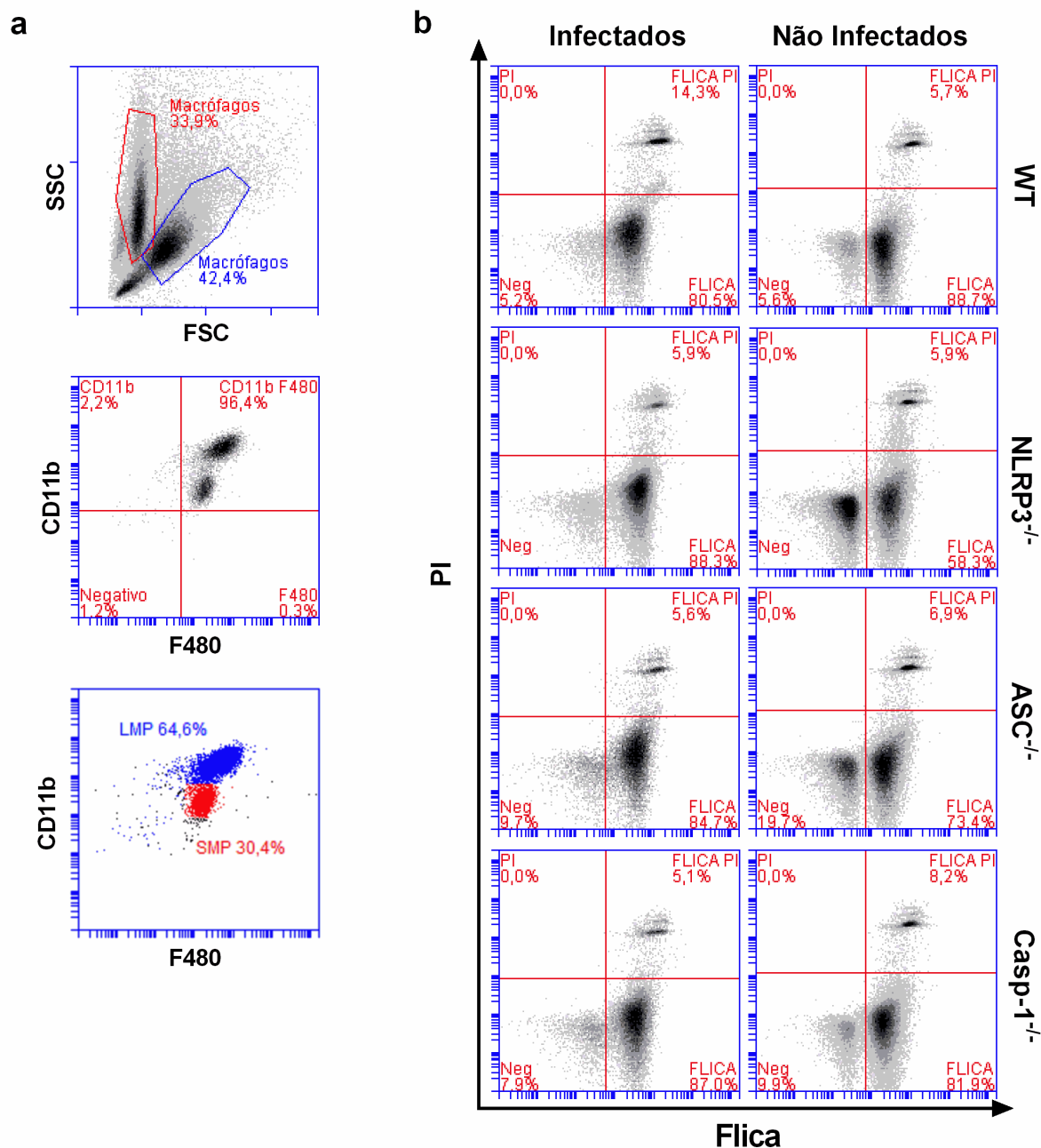


Figura 14. Gráficos *dotplots* representativos da ativação de caspase-1. Macrófagos peritoneais de camundongos WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} com *background* C57BL/6 infectados e não infectados com *S. schenckii* durante os dias 7, 14 e 21 foram marcados com *Fluorescent labeled inhibitor of caspases* (Flica) e iodeto de propídio (PI). **(a)** Estratégias de *gating* e **(b)** *dotplots* representativos para determinação de células positivas para Flica (*Fluorescent labeled inhibitor of caspases*) e PI (iodeto de propídio) no dia 7 pós-infecção.

6.8. O desenvolvimento de células Th17 e Th1/Th17 é prejudicado na ausência de atividade do inflamassoma NLRP3

Em seguida, analisamos se o inflamassoma NLRP3 influenciaria no desenvolvimento da resposta imune adaptativa nesta infecção. Para isso, a frequência das células Th17 e Th17/Th1 foi verificada. Em relação às células Th17, os animais ASC^{-/-} mostraram frequência reduzida dessas células no dia 7 pós-infecção, enquanto que os animais NLRP3^{-/-} e Casp-1^{-/-} mostraram nos dias 7 e 21 pós-infecção, quando comparados aos WT. Embora a análise estatística não tenha mostrado diferença significativa na frequência de células Th17 entre os animais NLRP3^{-/-} e WT no dia 14 pós-infecção, devemos salientar que a frequência destas células nestes animais KO foi maior que nos WT (Figura 15a). Por outro lado, a frequência de células Th1 apareceu de forma semelhante entre os animais KO e WT infectados durante todos os dias avaliados (Figura 15b).

Adicionalmente, as células mistas Th17/Th1 foram as que apresentaram maior participação neste modelo experimental. Enquanto a frequência de células Th17/Th1 foi elevada nos animais WT, o desenvolvimento dessas células foi prejudicado nos três grupos de animais KO durante todos os dias de infecção avaliados (Figura 15c). Entre os animais KO e WT não infectados não houve diferença significativa na frequência de qualquer tipo dessas células durante todo o estudo. Os *dotplots* da estratégia de *gating* para determinar as populações das células Th17, Th1 e mistas Th17/Th1, nos esplenócitos totais dos animais WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-}, estão representados nos quadrantes correspondentes a cada marcador durante dia 7, 14 e 21 da cinética de infecção (Figura 16).

Dada a regulação cruzada existente entre os vários subtipos de células Th e o desenvolvimento prejudicado das células Th17 e Th17/Th1 nos animais KO infectados, a frequência de células T reguladoras foi avaliada. Os animais ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} mostraram frequência de células T reguladoras similar aos animais WT durante todo o período de estudo. No entanto, interessante, os animais NLRP3^{-/-} mostraram maior frequência destas células que os WT no 14 pós-infecção (Figura 17a). Entre os animais KO e WT não infectados não houve

diferença na frequência de células T reguladoras durante todo o estudo. Na mesma figura estão demonstrados os *dotplots* da estratégia de *gating* para determinar as populações das células T reguladoras nos esplenócitos totais dos camundongos WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} e as populações positivas estão representadas nos quadrantes correspondentes a cada marcador durante o dia 14 da infecção (Figura 17b e 17c).

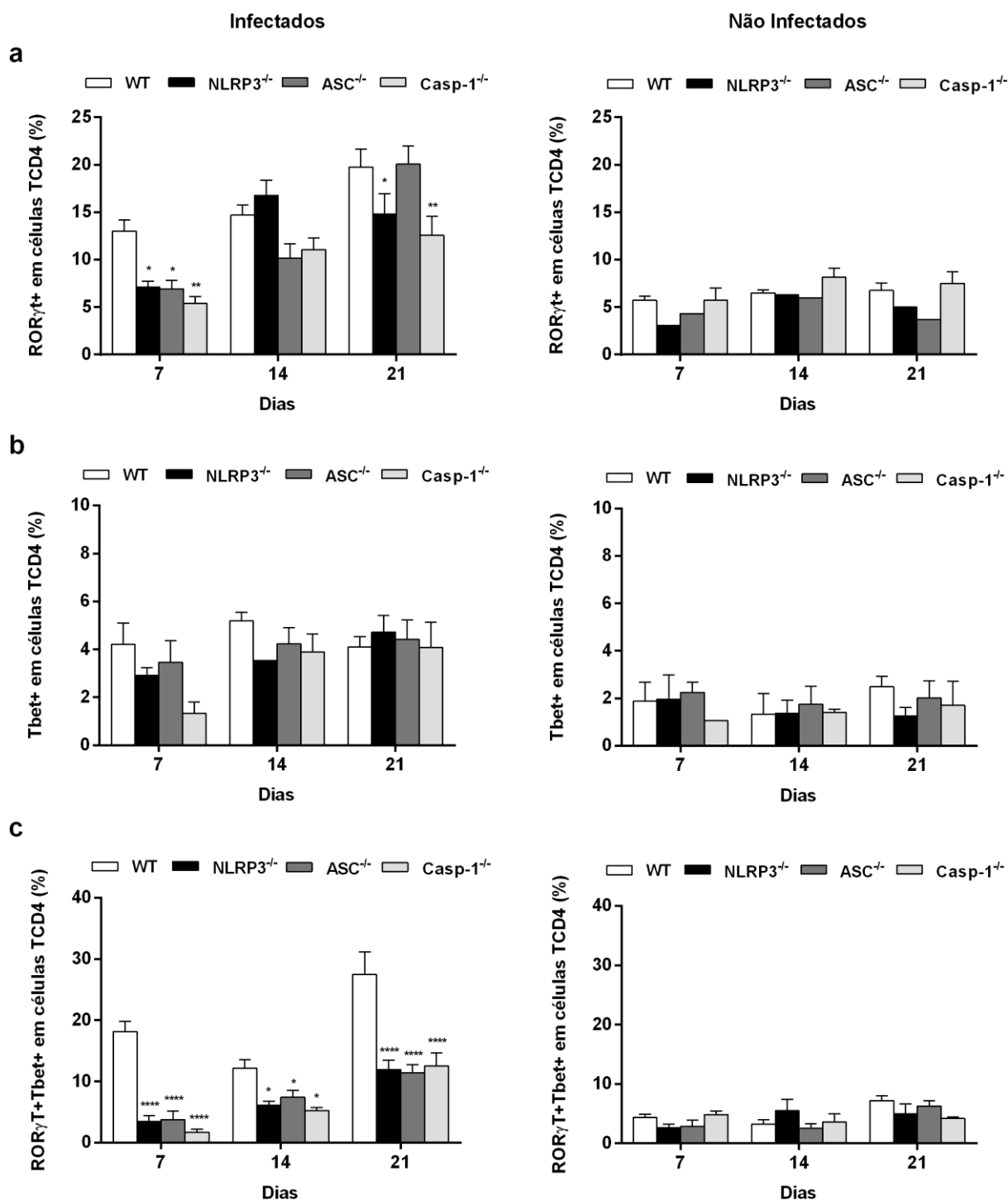


Figura 15. Determinação da presença de células Th17, Th1 e Th17/Th1. Análise de expressão de células T helper ROR γ t+, T-bet+ e ROR γ /T-bet+ no baço de camundongos WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} com *background* C57BL/6 infectados e não infectados com *S. schenckii* durante os dias 7, 14 e 21. Nos dias indicados, os animais foram sacrificados para remoção do baço e os esplenócitos foram marcados como indicado. **(a-c)** Porcentagem das subpopulações Th ROR γ t+, T-bet+ e ROR γ /T-bet+ presentes no baço dos animais em estudo. Os dados estão apresentados como a média $\pm$ desvio padrão de três experimento independentes com 5 animais. A significância estatística foi determinada por ANOVA de 2 vias com pós-teste de Bonferroni e intervalo de confiança em 95%. *p<0,05; **p<0,01 e ****p<0,0001 para a comparação das médias dos animais NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} com WT.

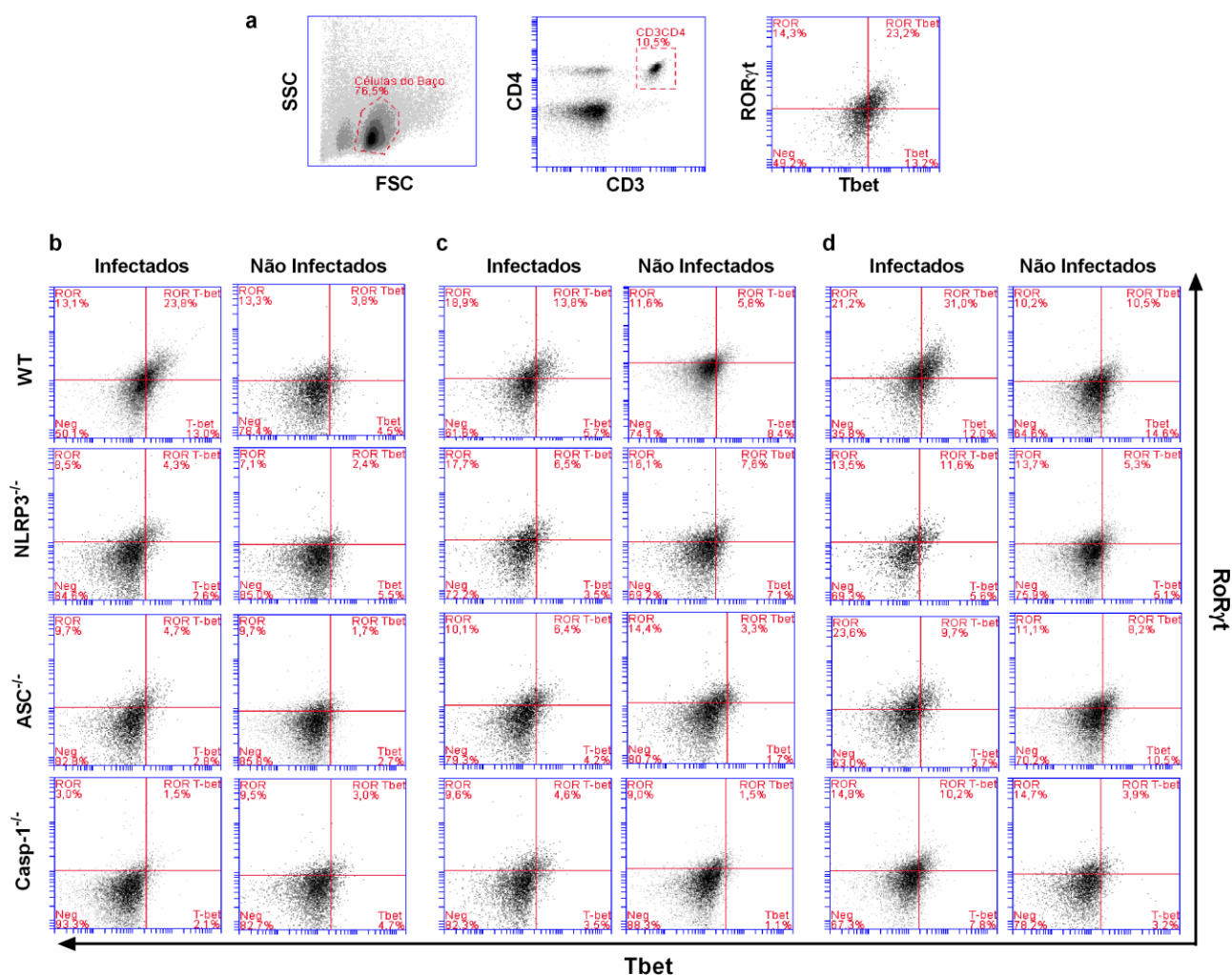


Figura 16. Gráficos *dotplots* representativos da expressão dos fatores de transcrição Tbet, ROR γ t e Tbet/ROR γ t. Expressão de células T helper ROR γ t⁺, T-bet⁺ e ROR γ /T-bet⁺ no baço de camundongos WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} com *background* C57BL/6 infectados e não infectados com *S. schenckii* durante os dias 7, 14 e 21. Nos dias indicados, os animais foram sacrificados para remoção do baço e os esplenócitos foram marcados como indicado. **(a)** Estratégias de *gating* e **(b-d)** *dotplots* representativos para determinação de células Th Tbet, ROR γ t ou Tbet/ROR γ t positivas nos dias 7 **(b)**, 14 **(c)** e 21 **(d)** do estudo.

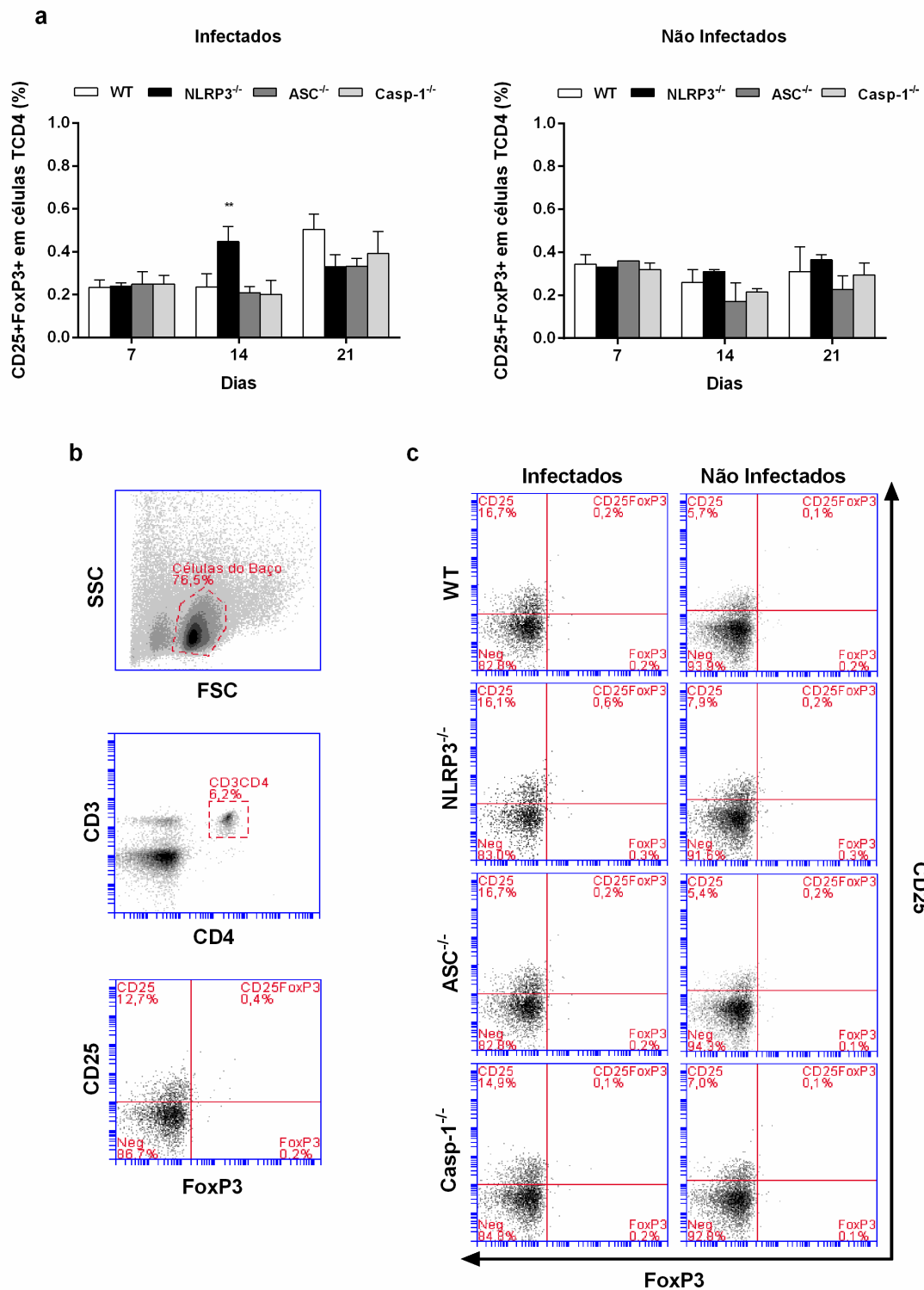


Figura 17. Determinação da presença de células T reguladoras. Análise de expressão de células T helper CD25FoxP3 no baço de camundongos WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} com *background* C57BL/6 infectados e não infectados com *S. schenckii* durante os dias 7, 14 e 21. **(a)** Porcentagem das subpopulações Th CD25FoxP3 presentes no baço dos animais em estudo. **(b)** Estratégias de *gating* e **(c)** *dotplots* representativos para determinar as células Th CD25+FoxP3+ no dia 14 do estudo. Os dados estão apresentados como a média $\pm$ desvio padrão de três experimento independentes com 5 animais. A significância estatística foi determinada por ANOVA de 2 vias com pós-teste de Bonferroni e intervalo de confiança em 95. **p<0,01 para a comparação das médias dos animais NLRP3^{-/-} com WT.

6.9. O inflamassoma não-funcional estimula o desenvolvimento de células T citotóxicas

Além das células T *helper*, a frequência das células T citotóxicas também foi avaliada neste estudo. A frequência de células T CD8 nos animais NLRP3^{-/-} foi semelhante aos WT durante todos os dias da infecção avaliados. No entanto, os animais ASC^{-/-} mostraram maior frequência dessas células nos dias 14 e 21 pós-infecção, enquanto os animais Casp-1^{-/-} apenas no dia 7 pós-infecção, quando comparados aos WT (Figura 18a). Por outro lado, os animais NLRP3^{-/-} mostraram menor expressão de CD8 nos dias 7 e 14 pós-infecção, enquanto os animais ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} nos dias 7 e 21 pós-infecção, quando comparados aos WT (Figura 18b). Os animais KO e WT não infectados mostraram frequência semelhante de células T CD8 durante os dias de estudo. Contudo, os animais dos três grupos KO não infectados mostraram menor expressão de CD8 que os WT não infectados em todo o período de estudo, com exceção dos animais ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} no dia 14 e os animais NLRP3^{-/-} no dia 21.

A frequência de células TCD8 e a expressão de CD8 estão demonstradas pela sobreposição destes valores referentes aos animais WT e KO infectados e não infectados nos dias de estudo (Figura 18c). As populações celulares T CD8 presentes nos esplenócitos totais dos camundongos WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} nos dias 7, 14 e 21 da infecção também estão representadas nos histogramas (Figura 19).

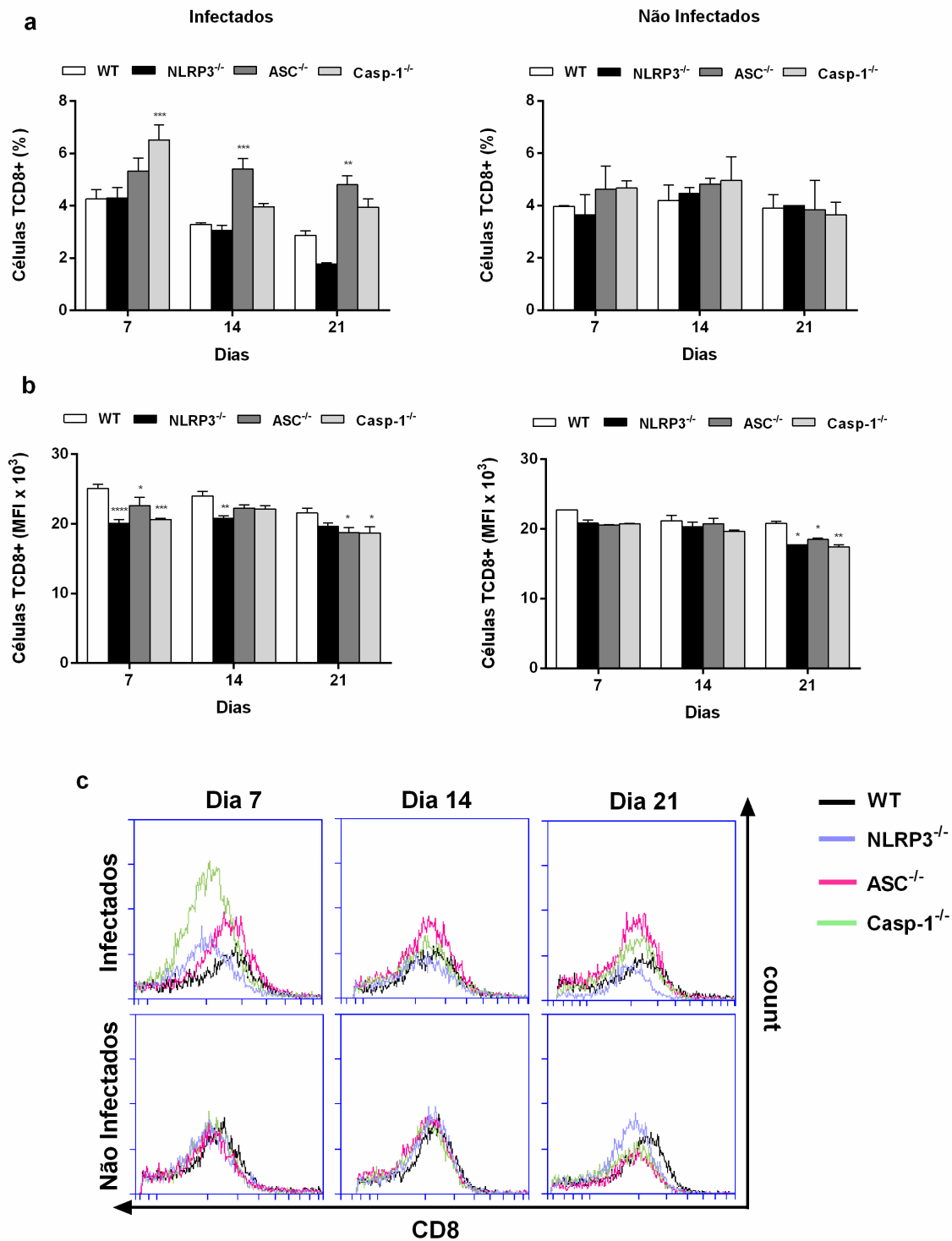


Figura 18. Determinação da presença de células T citotóxicas. Cinética de expressão de células T CD8 positivas no baço de camundongos WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} com *background* C57BL/6 infectados e não infectados com *S. schenckii* durante os dias 7, 14 e 21. **(a)** Porcentagem das células T CD8+ no baço dos animais em estudo. **(b)** Valores médios das medianas da intensidade de fluorescência das células positivas para CD8. **(c)** Sobreposição da frequência de células T CD8+ e expressão da molécula CD8 nas células do baço dos animais em estudo. Os dados estão apresentados como a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes com 5 animais. A significância estatística foi determinada por ANOVA de 2 vias com pós-teste de Bonferroni e intervalo de confiança em 95. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ para a comparação das médias dos animais NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} com WT.

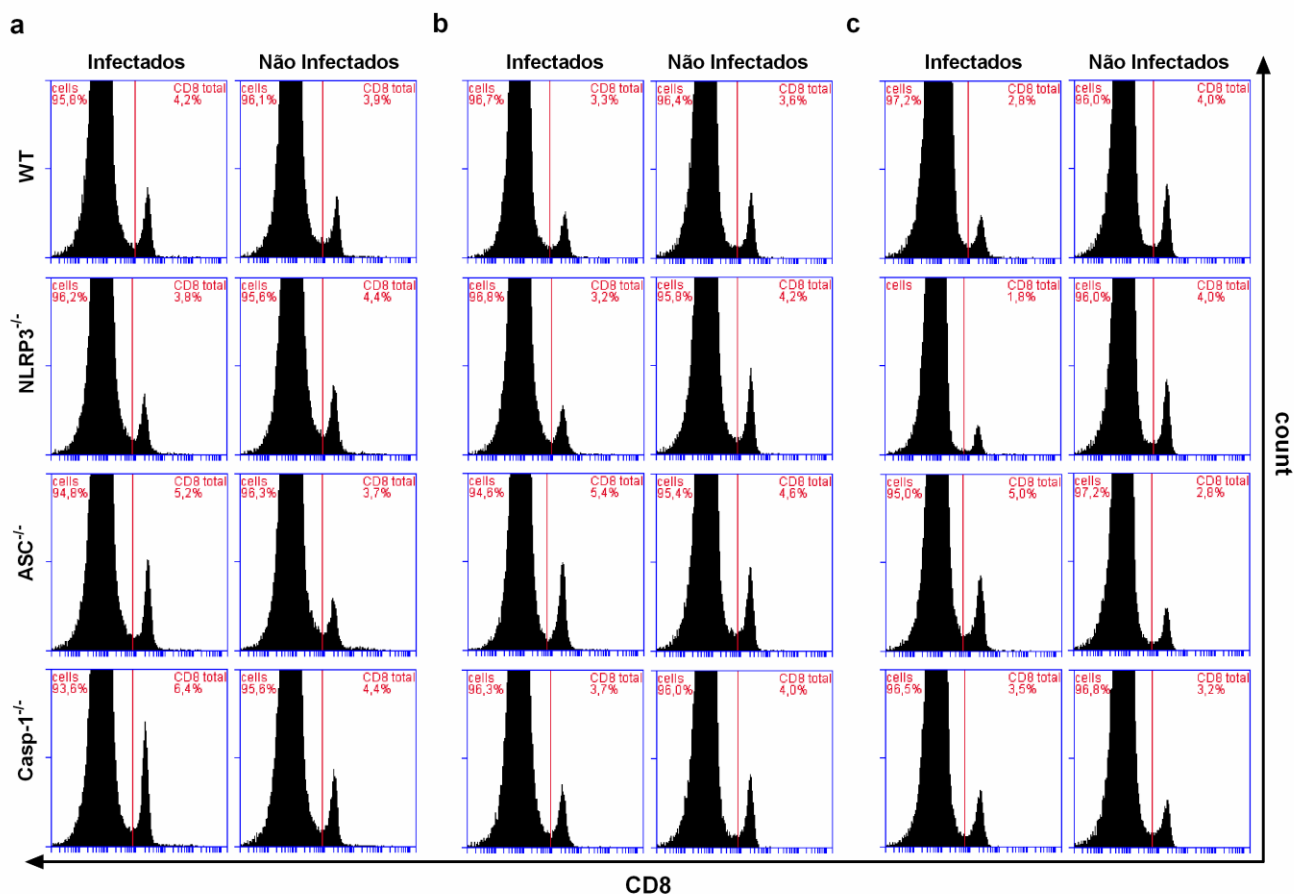


Figura 19. Histogramas representativos da determinação de células T citotóxicas. Frequência de células T CD8 positivas no baço de camundongos WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} com *background* C57BL/6 infectados e não infectados com *S. schenckii* durante os dias 7 (**a**), 14 (**b**) e 21 (**c**) do estudo. Nos dias indicados, os animais foram sacrificados para remoção do baço e os esplenócitos foram marcados como indicado.

7. Discussão

Nos últimos anos, as infecções fúngicas têm aumentado significativamente, tornando-se um grave problema de saúde pública devido aos prejuízos causados nos seres humanos e animais (van de Veerdonk *et al.*, 2015). Os indivíduos imunocomprometidos, principalmente aqueles portadores de HIV ou que fazem uso de terapias imunossupressoras, são mais acometidos pelas infecções fúngicas de maior patogenicidade (Galimberti *et al.*, 2012). A esporotricose é uma doença fúngica caracterizada pela evolução subaguda e crônica de lesões nodulares cutâneas ou subcutâneas que podem se disseminar para outros tecidos, tornando-se sistêmica. Essa micose tem como agente etiológico as espécies do complexo *Sporothrix*, incluindo *Sporothrix schenckii sensu stricto* (Chakrabarti *et al.*, 2015). Por muito tempo, a esporotricose teve baixa incidência no Brasil, no entanto o número de casos relatados e as formas clínicas mais graves da doença têm aumentado de forma crescente (Madrid *et al.*, 2012). Apesar de importantes achados clínicos, a compreensão atual de como o sistema imunológico reconhece e responde ao *S. schenckii* é muito restrita (Carlos *et al.*, 2009).

A participação dos receptores de reconhecimento padrão, inclusive dos receptores NLRs que formam os inflamassomas, têm sido associado à defesa antifúngica do hospedeiro (Becker *et al.*, 2015; Erwig e Gow, 2016). A montagem do inflamassoma requer a ativação de um receptor NLR, a molécula adaptadora ASC na maioria das vezes, e uma caspase. Dependendo da necessidade da presença de ASC, os inflamassomas podem ser classificados como dependentes ou independentes de ASC (Lu *et al.*, 2015). Os independentes de ASC podem ser representados por inflamassomas que não necessitam de moléculas adaptadoras, como o NLRP1b, ou ainda que requerem outras moléculas adaptadoras, como o NLRC4 (Hu, 2013; Van Opdenbosch, 2014). Adicionalmente, a molécula ASC pode interagir com vários receptores NLRs, como NLRP6, NLRP10 e AIM2 (Hornung *et al.*, 2009; Zambetti *et al.*, 2012; Anand *et al.*, 2013). Em continuidade, os inflamassomas podem ser divididos em canônicos e não canônicos com base na ativação de caspase-1 ou caspase-11, respectivamente (Zoete *et al.*, 2014; Saavedra *et al.*, 2015).

Especificamente, o reconhecimento de PAMPs ou DAMPs pelo receptor NLRP3 promove o recrutamento da molécula adaptadora ASC, que por sua vez, é responsável pela clivagem da pró-caspase-1 em sua forma ativa. Quando ativada, a caspase-1 tem a função de promover a maturação da pró-IL-1 β e pró-IL-18 em suas respectivas formas ativas, assim como o processo de morte celular conhecido como piroptose (Jo *et al.*, 2016).

O inflamassoma NLRP3, dentre os diferentes existentes, devido à sua ampla especificidade em mediar a resposta imune frente a vários patógenos, inclusive a fungos, é o mais estudado (Joly *et al.*, 2009; Hise *et al.*, 2009; van de Veerdonk *et al.*, 2011; Said-Sadier *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2014; Tavares *et al.*, 2013; Ketelut-Carneiro *et al.*, 2015). Deste modo, a relevância deste complexo proteico no desencadeamento da resposta imune contra *S. schenckii* foi avaliado. Na tentativa de conhecer os efeitos da infecção causada por este fungo na resposta imunológica, nosso laboratório tem desenvolvido modelos murinos com a forma sistêmica da doença e para atingir o objetivo do presente estudo foram utilizados animais selvagens (WT) e três tipos de animais knockout (NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-}, Casp-1^{-/-}).

Primeiramente, verificamos se o inflamassoma NLRP3 seria capaz de controlar a infecção por *S. schenckii* e, para isso a carga fúngica presente no baço dos diferentes animais foi determinada. Foi observado que o controle da infecção por *S. schenckii* foi prejudicado na ausência dos componentes do inflamassoma, ASC e caspase-1, sendo que na fase final da infecção a ausência de caspase-1 foi mais prejudicial ao hospedeiro. Esses dados sugerem que mecanismos mais dependentes de caspase-1 do que de ASC são necessários para controlar a infecção no estágio tardio, indicando que outras moléculas adaptadoras ou inflamassomas independentes de ASC podem estar envolvidas na sinalização da caspase-1. Por sua vez, os inflamassomas dependentes de ASC parecem ser mais importantes no início da infecção, provavelmente por modular mecanismos iniciais, enquanto que o desenvolvimento da resposta adaptativa ou outros mecanismos tardios possa superar o controle fúngico prejudicado em animais ASC^{-/-}. De modo semelhante, mostramos que o receptor NLRP3 foi essencial para o reconhecimento de *S. schenckii*, pois a ausência deste

receptor diminuiu acentuadamente a capacidade do hospedeiro de controlar a infecção. Esses resultados sugerem que o inflamassoma NLRP3 é capaz de controlar a infecção por *S. schenckii* desde os seus estágios iniciais até os mais tardios.

Apesar da capacidade diminuída de controlar a infecção, os animais KO foram capazes de sobreviver e eliminar a infecção de modo semelhante aos animais WT. Este fato pode estar relacionado com a produção residual de citocinas ou com mediadores imunológicos não avaliados neste estudo. Por sua vez, esses mediadores imunológicos podem fazer parte de mecanismos antifúngicos que, na ausência de ativação do inflamassoma NLRP3, permitiram a sobrevivência e a eliminação da infecção pelos animais KO. Por exemplo, vários PRRs, tais como TLRs, CLRs (dectina-1 e dectina-2) e outros receptores (CD14, CR, CD36 e galectina 3) são críticos para o reconhecimento e desencadeamento da resposta imune contra fungos patogênicos que possuem PAMPs semelhantes a *S. schenckii* (Erwig e Gow, 2016). Dentre esses PRRs, já foi demonstrada a importância dos TLR-2 e TLR-4 na infecção por *S. schenckii* (Sassá *et al.*, 2009, 2012; Negrini *et al.*, 2013, 2014). Além disso, outros subconjuntos de células imunes clássicas, como as linfóides inatas e as células NK, e células imunes não clássicas, como células epiteliais, células endoteliais e plaquetas, também desempenham um papel crucial na orquestração de uma resposta antifúngica eficiente de forma independente do inflamassoma (Becker, 2015).

Durante as infecções, em resposta aos mecanismos de defesa do hospedeiro, o desenvolvimento da inflamação pode ser evidenciado pelo aumento baço, uma vez que este órgão está sujeito ao recrutamento e à infiltração de células na tentativa de eliminar o patógeno (Altamura *et al.*, 2001; Mirkov *et al.*, 2011). Para verificar, de forma indireta, a resposta inflamatória nesta infecção, os índices e parâmetros esplênicos foram analisados. Foi observada que a resposta inflamatória foi claramente alterada na ausência da ativação do inflamassoma NLRP3, uma vez que os índices e parâmetros esplênicos foram inferiores nos três tipos de animais KO quando comparados aos WT ao longo da infecção, sugerindo que o inflamassoma NLRP3 contribui com o desenvolvimento da inflamação nesta infecção fúngica.

Outros mecanismos de defesa antifúngica incluem a fagocitose e a produção de espécies reativas do nitrogênio, como o óxido nítrico (NO) que é um potente mediador da inflamação, pois contribui com a atividade citotóxica dos macrófagos frente aos patógenos (Carlos *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2008). Deste modo, a liberação de NO pelos macrófagos peritoneais quando desafiados com os antígenos LeY e F1 de *S. schenckii* foi avaliada e observamos que a liberação deste mediador foi semelhante frente a ambos os estímulos fúngicos. Enquanto a ausência dos componentes do inflamassoma, ASC e caspase-1, não interferiu na liberação de NO durante os dias da infecção avaliados, a ausência do receptor NLRP3 resultou na liberação diminuída deste mediador no início da infecção. No entanto, nos outros dias da infecção, a liberação de NO foi semelhante entre os animais NLRP3^{-/-} e WT, sugerindo que a sua produção é dependente do inflamassoma NLRP3 na fase inicial da infecção. Confirmando a relação do NLRP3 com o NO, Gonçalves *et al.* (2013) mostraram que animais NLRP3^{-/-} e Casp-1^{-/-} infectados com *T. cruzi* tiveram graves defeitos na produção de NO e um prejuízo na capacidade microbicida dos macrófagos.

Por conseguinte, o aumento da liberação de NO pelas células dos animais NLRP3^{-/-} pode ter ocorrido devido à presença de outros PRRs. Estudos prévios mostraram que os receptores TLR-2 e TLR-4 são essenciais para a produção deste mediador na infecção por *S. schenckii* (Sassá *et al.*, 2009; Negrini *et al.*, 2014). Outro PRR atuante pode ser a dectina-1 que é um receptor fundamental para o reconhecimento de PAMPs fúngicos e está relacionado com a fagocitose, produção de NO e citocinas que participam do desenvolvimento da resposta Th17, como a IL-1β, IL-6 e IL-23 (Hardinson *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2014; Pinke *et al.*, 2016).

Em continuidade, pelo fato das citocinas IL-1β e IL-18 serem moléculas efetoras da via de sinalização do inflamassoma NLRP3 e por apresentarem importante papel protetor nas infecções fúngicas (Stuyt *et al.*, 2002, 2004; Netea *et al.*, 2003; Dinarello 2005, Tavares 2013, Mao 2014), o envolvimento destas citocinas com a ativação do inflamassoma NLRP3 foi avaliado. Embora a atividade do inflamassoma esteja associada à imunidade inata, a produção de IL-1β e IL-18

influencia no desencadeamento da resposta imune adaptativa, pois essas citocinas estimulam o desenvolvimento das respostas Th17 e Th1, respectivamente (van de Veerdonk *et al.*, 2011; Richardson *et al.*, 2015).

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória essencial para induzir o desenvolvimento da resposta Th17 (Chung 2009; Sutton *et al.*, 2009; Lee *et al.* 2010). Por sua vez, as células Th17 secretam, dentre outras citocinas, a IL-17 que por induzir uma resposta inflamatória, também apresenta papel protetor nas infecções fúngicas (Korn *et al.*, 2009, Deep e Gibbons, 2009; Kagami *et al.*, 2010). A IL-17 induz a inflamação por meio da ativação de neutrófilos que ocorre, principalmente, pela regulação positiva de G-CSF e CXCL em células epiteliais da mucosa (Khader *et al.*, 2009). Em alguns estudos, foi demonstrado que o recrutamento de neutrófilos para o local da infecção e a indução de peptídeos antimicrobianos presentes nas superfícies mucosas, dependentes de IL-17, são importantes para as respostas do hospedeiro frente a *C. albicans* (Huang *et al.*, 2004; Gorr, 2009; Pietrella *et al.*, 2011; Hernández-Santos e Gaffen, 2012).

Diante do exposto, após a determinação de IL-1 β e IL-17, foi observado que em presença do LeY a liberação de IL-1 β pelas células dos animais KO foi reduzida quando comparada aos animais WT apenas no dia 14 pós-infecção. Já a liberação de IL-17 foi reduzida pelas células dos animais ASC^{-/-} em todos os dias estudados, enquanto que pelas células dos Casp-1^{-/-} nos dias 7 e 14 pós-infecção, quando comparadas aos animais WT. Por outro lado, a liberação de IL-17 pelas células dos animais NLRP3^{-/-} foi reduzida quando comparada aos WT apenas no dia 14 pós-infecção e, interessante, essas células foram capazes de liberar mais IL-17 que os WT no dia 21 pós-infecção. Adicionalmente, frente ao antígeno F1, a liberação de IL-1 β foi acentuadamente diminuída em todos os animais KO durante todos os dias de infecção avaliados e a produção de IL-17 nestes animais também foi prejudicada, com exceção dos animais NLRP3^{-/-} no dia 21 pós-infecção. Dado o papel indutor da IL-1 β sobre a IL-17, podemos sugerir que a liberação destas citocinas durante a infecção por *S. schenckii* pode ser dependente do inflamassoma NLRP3. A importância da IL-1 β e IL-17 na proteção do hospedeiro nas infecções fúngicas corroboram com os

resultados encontrados neste estudo, pois a baixa capacidade de produção de IL-1 β e IL-17 pelos animais KO foi acompanhada pela eliminação prejudicada do fungo, comprovada pela maior carga fúngica presente nestes animais. Portanto, os resultados até o momento indicam que o papel protetor do inflamassoma NLRP3 na infecção por *S. schenckii* depende da produção de IL-1 β e IL-17.

Como dito anteriormente, a IL-18 também é um produto final da ativação do inflamassoma NLRP3 e, além disso, em conjunto com a IL-12, estimula o desenvolvimento de células Th1 pelo fato de induzir a produção de IFN- γ (Lee *et al.* 2010; Guo *et al.*, 2012). Vários estudos já demonstraram que o IFN- γ tem ação central na imunidade protetora do hospedeiro contra fungos, pois, dentre outros fatores, otimiza a ativação dos fagócitos (Romani, 2011; Espinosa e Rivera, 2012). Deste modo, o envolvimento das citocinas IL-18 e IFN- γ foi avaliado na infecção por *S. schenckii*. Tanto frente ao LeY, quanto a F1, foi observado que a liberação de IL-18 foi acentuadamente diminuída em todos os tipos de animais KO no dia 7 pós-infecção, sugerindo que a produção desta citocina nos estágios iniciais da infecção, mas não nos estágios tardios, depende da ativação do inflamassoma NLRP3. No entanto, mesmo com a liberação reduzida da IL-18, todos os tipos de animais KO foram capazes de produzirem IFN- γ no dia 7 pós-infecção, principalmente os animais NLRP3^{-/-}. Contudo, nos outros dias da infecção a liberação de IL-18 e IFN- γ foi semelhante entre os animais KO e WT.

A liberação de IFN- γ pelos animais KO, mesmo frente a baixos níveis de IL-18, pode ser explicada pelas combinações de outras citocinas indutoras de IFN- γ , tal como a IL-12 quando em conjunto com IL-1 β , IL-15, IL-2 ou TNF- α (Guo *et al.*, 2012), sugerindo que a liberação de IFN- γ não é dependente do inflamassoma NLRP3 nesta infecção. A elevada produção de IFN- γ durante os dias da infecção coincide com o perfil da liberação de NO, sendo que esta citocina pode estar sustentando a produção deste mediador inflamatório, uma vez que tem papel crítico na ativação de macrófagos por meio da indução de NO (Gonzales *et al.*, 2000; Maia *et al.*, 2006).

Alem do mais, a produção de IL-18 semelhante entre os animais KO e WT nos dias 14 e 21 pós-infecção pode ser explicada pelo fato desta citocina ser constitutivamente expressa em

células saudáveis (Dinarello *et al.*, 2013). Deste modo, a clivagem de pró-IL-18 pode ser feita por proteases diferentes da caspase-1, como por exemplo, por quinase presente nos mastócitos e por granzima B encontrada em células T citotóxicas, células NK e neutrófilos (van de Veerdonk *et al.*, 2011; Novick *et al.*, 2013). Portanto, isso explica a disponibilidade da IL-18 ativa de forma independente da ativação do inflamassoma NLRP3 neste modelo experimental de esporotricose.

Todavia, diante dos resultados expostos não podemos descartar os efeitos das condições experimentais utilizadas neste estudo. Em primeiro lugar, as culturas *ex vivo* foram desafiadas com LeY e F1 e, portanto, a utilização de outras preparações antigênicas ou o uso da levedura íntegra de *S. schenckii* poderiam alterar os PAMPs expostos às células e, conseqüentemente, o perfil da produção das citocinas e NO. Em adição, os antígenos LeY e F1 também podem conter outros PAMPs capazes de serem reconhecidos por PRRs diferentes daqueles que formam o inflamassoma e, então, modificar o desencadeamento da resposta imune final.

Além da secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18, outro mecanismo induzido pela ativação do inflamassoma NLRP3 é a piroptose. A piroptose, morte celular mediada pela caspase-1, é importante para eliminar o agente infeccioso, bem como para potencializar a resposta imune adaptativa contra o patógeno (Bergsbaken *et al.*, 2009; Winkler e Rosen-Wolff, 2015). Como esperado, foi verificada menor expressão de caspase-1 ativa e, conseqüentemente, menor frequência de células em piroptose nos animais KO do que nos WT no dia 7 pós-infecção. Esses resultados sugerem que a piroptose atua na resposta imune contra *S. schenckii*, pois ajuda a controlar a infecção eliminando o fungo. Também, a julgar pelo fato da expressão da caspase-1 ativa ser similar nos três grupos KO, a ativação desta protease via inflamassoma parece depender do reconhecimento deste fungo pelo inflamassoma NLRP3 na fase inicial da infecção.

Como a resposta efetiva contra fungos requer a contribuição coordenada da imunidade inata e adaptativa (Kanneganti *et al.*, 2007) foi importante analisar a participação das células T nesse contexto. As células T *helper* desempenham papéis críticos na defesa do hospedeiro, pois são capazes de se diferenciarem em subtipos celulares específicos, como Th1 e Th17, dentre outros.

Cada um desses subtipos expressa um determinado fator de transcrição e secreta citocinas específicas em resposta aos agentes patogênicos (Nakayamada *et al.*, 2012).

A IL-1 β , em conjunto com TGF- β , IL-6 e IL-23, pode desencadear a diferenciação das células Th17, que expressam o fator de transcrição ROR γ t. No entanto, a associação da IL-1 β com a IL-23, independente do TGF- β , pode induzir o desenvolvimento do fenótipo Th17/Th1 dessas células, que são altamente patogênicas e expressam ROR γ t+T-bet+. A IL-18, por sua vez, em conjunto com a IL-12, é responsável pelo desenvolvimento das células Th1, que expressam T-bet+ (Lee *et al.*, 2015; Luckheeram *et al.*, 2015). Dada a diminuição acentuada da liberação de IL-1 β e IL-18 nos animais KO, a frequência das células Th17, Th1 e Th17/Th1 foi avaliada nesta infecção. Nossos resultados mostraram que o desenvolvimento de células Th17 e Th17/Th1 ficou prejudicado nos grupos dos animais KO infectados, pois uma baixa frequência dessas células foi encontrada nestes animais, sugerindo que a participação da resposta Th17 na infecção por *S. schenckii* depende de mecanismos desencadeados pelo inflamassoma NLRP3. Os mecanismos derivados da ativação do inflamassoma e envolvidos no controle da infecção por *S. schenckii* estão provavelmente relacionados à resposta Th17, tal como demonstrado em estudo prévio de Ferreira *et al.* (2015) que mostrou um papel protetor de células Th17 nessa infecção. Além disso, podemos sugerir que o desenvolvimento da resposta Th17 induzido pelo inflamassoma NLRP3, no nosso modelo experimental, é parcialmente devido ao efeito da liberação de IL-1 β .

Por outro lado, a frequência de células Th1 encontrada nos animais KO e WT foi semelhante durante todos os dias da infecção avaliados. De acordo com resultados anteriores, as células dos animais WT infectados liberaram maiores quantidades de IL-17, enquanto que não houve diferença significativa na liberação do IFN- γ pelas células dos animais WT e KO. Os resultados das citocinas corroboram com a frequência das células Th17 e Th1 encontradas.

As células T reguladoras, outro subtipo celular das T *helper*, desempenham um papel ativo na supressão e na manutenção da auto-tolerância e da homeostase imunológica (Sakaguchi *et al.*, 2009). Contudo, essas células também podem apresentar um papel que não é totalmente

compreendido na imunidade protetora, uma vez que as células T reg promovem a transição de células Th *naive* em células Th17, e, conseqüentemente, a produção das citocinas relacionadas com a resposta Th17 (Veldhoen *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007). Pandiyan *et al.* (2011) reportaram que as células T reg possuem importante papel antimicrobiano na imunidade, pois participaram da proteção do hospedeiro contra *C. albicans*. Neste estudo foi encontrado que os animais NLRP3^{-/-} foram os únicos a mostrarem aumento na frequência de células T reg quando comparados com os WT, mas apenas no dia 14 pós-infecção. Tal aumento pode ter contribuído com a manutenção da frequência de células Th17 um pouco elevada nos animais NLRP3^{-/-} neste mesmo dia da infecção, e isto pode indicar um mecanismo de proteção adicional a estes animais. Embora nenhum dos animais KO tenha mostrado uma redução estatisticamente significativa na frequência de células Th17 no dia 14 pós-infecção, os animais NLRP3^{-/-} foram capazes de manter os níveis destas células semelhantes aos animais WT. No entanto, isso não exclui a possibilidade de que a presença elevada de Th17 no dia 14 pós-infecção nos animais NLRP3^{-/-} possa vir de outras fontes que estimulem o aparecimento das células Th17.

Além das células T *helper*, a frequência das células T citotóxicas também foi avaliada. Os animais ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-}, mas não os NLRP3^{-/-}, mostraram maior frequência de células T CD8 que os WT ao longo da infecção. Em contrapartida, a expressão da molécula CD8 foi reduzida em todos os tipos de animais KO durante os dias da infecção avaliados. Além das células Th1, outras células, como as T citotóxicas e as natural killers (NK) liberam IFN- γ em resposta à estimulação das citocinas IL-18 e IL-12 (Guo *et al.*, 2012; Gozalbo *et al.*, 2014). Deste modo, a liberação semelhante de IFN- γ entre os animais WT e KO infectados pode estar relacionada à maior frequência de células T CD8 nos animais KO, já que esses animais produziram baixos níveis de IL-18. No entanto, a produção de IFN- γ nos animais KO infectados também pode estar sendo sustentada por outras células, como as NK, que participam de forma efetiva em modelo experimental com animais Balb/c infectados com *S. schenckii* (Ferreira *et al.*, 2015). Adicionalmente, podemos sugerir que a maior presença de células T citotóxicas nos animais ASC^{-/-}

e Casp-1^{-/-} pode estar atuando como um mecanismo imune adicional de proteção, uma vez que esses hospedeiros apresentaram frequências reduzidas das diversas subpopulações de células Th.

Os resultados encontrados neste estudo são apoiados por outros trabalhos que mostraram um papel crítico do inflamassoma NLRP3 na defesa antifúngica do hospedeiro, que vai desde o controle da infecção e a infiltração celular em órgãos infectados até o desenvolvimento da resposta imune adaptativa. Na infecção por *C. albicans*, a deficiência de NLRP3, ASC ou caspase-1 proporcionou ao hospedeiro uma menor sobrevida e maior carga fúngica na cavidade oral e em vários órgãos, incluindo os rins (Gross *et al.*, 2009; Hise *et al.*, 2009; Joly *et al.*, 2009). Além disso, a resposta imune adaptativa também tem sido associada à atividade do inflamassoma NLRP3 na candidíase invasiva, uma vez que a diminuição das respostas Th17 e Th1 foi acompanhada da menor sobrevida e aumento da multiplicação fúngica em animais ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} (van de Veerdonk *et al.*, 2011).

Outros estudos mostraram que o inflamassoma NLRP3 é essencial para a resistência do hospedeiro contra *P. brasiliensis* devido ao seu papel na ativação da caspase-1 e à subsequente secreção de IL-1 β e IL-18 pelos macrófagos infectados, demonstrando a importância da sinalização destas citocinas no controle do crescimento deste fungo (Tavares *et al.*, 2013; Ketekut-Carneiro *et al.*, 2015). Do mesmo modo, a infiltração de células imunes no pulmão, a depuração eficaz de *C. neoformans* e a sobrevivência de animais infectados intranasalmente com cepas acapsulares de baixa virulência deste fungo foram dependentes do inflamassoma de NLRP3 (Lei *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2014). Recentemente, Karki *et al.* (2015) mostraram que animais com ausência tanto de NLRP3 quanto AIM2 sucumbiram à infecção por *A. fumigatus* mais rapidamente do que os animais WT ou animais sem somente um desses receptores como resultado das ações combinadas de caspase-1 e caspase-8 no processamento das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18. Por fim, Mao *et al.*, (2014) demonstraram que a produção de IL-1 β foi dependente da ativação do inflamassoma NLRP3 na infecção por *Microsporium canis*.

Por outro lado, recentemente, foi demonstrado por Borghi *et al.*, (2015) que na candidíase vaginal o recrutamento de neutrófilos e a inflamação dependentes do inflamassoma NLRP3 foram associados ao agravamento da doença. Adicionalmente, Moretti *et. al.* (2014) mostraram que evitando-se a ativação do inflamassoma NLRP3 e, portanto a liberação de IL-1 β , animais com aspergilose pulmonar apresentaram melhora no quadro de infecção. Até então, esses são os únicos relatos de um papel negativo do inflamassoma NLRP3 no contexto das infecções fúngicas. Essas considerações mostram que a ativação balanceada do inflamassoma evita o desencadeamento de respostas inflamatórias exacerbadas, que poderiam causar danos ao hospedeiro.

Em conclusão, o nosso estudo mostrou que o inflamassoma NLRP3 desempenha importante papel protetor na infecção por *S. schenckii* devido à presença de mediadores pró-inflamatórios e respostas Th ao longo do eixo IL-1 β -IL-17, correlacionando assim o reconhecimento inato do fungo à resposta imune adaptativa. Embora sejam necessárias pesquisas adicionais para compreender melhor os mecanismos dependentes de inflamassomas no desenvolvimento da resposta imune contra *S. schenckii*, este trabalho representa um importante avanço nesse sentido. Além do mais, este estudo visa contribuir com o desenvolvimento de novas terapias preventivas e de tratamento para a esporotricose.

8. Conclusões

O inflamassoma NLRP3 desempenha importante papel protetor na infecção por *S. schenckii*, uma vez que:

- ✓ Foi crítico para controlar a infecção, assim como para desencadear a resposta inflamatória. Além do mais, promoveu a ativação de caspase-1 e, portanto, o processo de piroptose.
- ✓ Foi essencial para a produção das citocinas IL-1 β , IL-17 e IL-18, mas não de IFN- γ e, em consequência desses perfis, foi responsável pelo desenvolvimento de células Th17 e células mistas Th17/Th1, mas não de células Th1 somente.
- ✓ Por outro lado, o inflamassoma não-funcional estimulou o desenvolvimento de células T reguladoras e células T citotóxicas.

9. Referências Bibliográficas

- ACCARIAS, S.; LUGO-VILLARINO, G.; FOUCRA, G.; NEUROLLES, O.; BOULLIER, S.; TABOURET, G. Pyroptosis of resident macrophages differentially orchestrates inflammatory responses to *Staphylococcus aureus* in resistant and susceptible mice. *Eur. J. Immunol.* v.45, p.794–806, 2015.
- ALBA-FIERRO, C. A.; PÉREZ-TORRES, A.; LÓPEZ-ROMERO, E.; CUÉLLAR-CRUZ, M.; RUIZ-BACA, E. Cell wall proteins of *Sporothrix schenckii* as immunoprotective agents. *Rev Iberoam Micol.* v.31, n.1, p.86–89, 2014.
- ALEGRANCI, P.; RIBEIRO, L. C.; FERREIRA, L. S.; NEGRINI, T. C.; MAIA, D. C.; TANSINI, A.; GONÇALVES, A. C.; PLACERES, M. C.; CARLOS, I. Z. The predominance of alternatively activated macrophages following challenge with cell wall peptide-polysaccharide after prior infection with *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*, v.176, p.57-65, 2013.
- ALMEIDA, S. R. Therapeutic monoclonal antibody for sporotrichosis. *Front Microbiol* v.8, p.403-409, 2012.
- ALMEIDA-PAES, R.; FRASES, S.; FIALHO MONTEIRO, P. C.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; NOSANCHUK, J. D. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. *Microbes Infect*, v.11, n.5, p.554–562, 2009.
- ALTAMURA, M.; CARADONNA, L.; AMATI, L.; PELLEGRINO, N. M.; URGESI, G.; MINIELLO, S. Splenectomy and sepsis: the role of the spleen the immune-mediated bacteria clearance. v.23, n.2, p.153-161, 2001.
- ALVIANO, C. S.; TRAVASSOS, L. R.; SCHAUER, R. Sialic acids in fungi: a minireview. *Glycoconj. J.*, v.16, n.9, p.545-554. 1999.
- ANAND, P. K.; KANNEGANTI, T. D. NLRP6 in infection and inflammation. *Microbes Infect.*, v.15, n.10-11, p.661–668, 2013.
- ANAND, P. K.; MALIREDDI, R. K.; KANNEGANTI, T. D. Role of the Nlrp3 inflammasome in microbial infection. *Front Microbiol*, v.2, p.2-12, 2011.
- AUNG, A. K.; THE, B. M.; McGRATH, C.; THOMPSON, P. J. Pulmonary sporotrichosis: case series and systematic analysis of literature on clinico-radiological patterns and management outcomes. *Med Mycol*, v. 51, p. 534–544, 2013.
- BALLOY, V.; HUERRE, M.; LATGÉ, J. P.; CHIGNARD, M. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infect. Immun.*, v.73, p.494-503, 2005.
- BARROS, M. B.; SCHUBACH, A. O.; VALLE, A. C.; GUTIERREZ GALHARDO, M. C.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, T. M.; REIS, R. S.; WANKE, B.; MARZOCHI, K. B.; CONCEIÇÃO, M. J. Cattransmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. *Clin Infect Dis*, v. 38, p. 529–535, 2004.
- BARROS, M. B.; ALMEIDA-PAES, R.; SCHUBACH, O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clin. Microbiol. Rev.* v.24, n.4, p.633-654, 2011.
- BARROS, M. B.; SCHUBACH, T. P.; COLL, J. O.; GREMIÃO, I. D.; WANKE, B.; SCHUBACH, A. Sporotrichosis: development and challenges of an epidemic. *Rev Panam Salud Publica*, v. 27, p. 455–460, 2010.

- BATISTA-DUHARTE, A.; PEREIRA, S. A.; FREITAS, D. F. S.; PORTUONDO, D.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; CARLOS, I. Z. Therapeutic and Prophylactic Tools for Sporotrichosis: Current Strategies and Future Tendencies. In: Carlos, I.Z., Ed. Sporotrichosis. New developments and future prospects. Switzerland: Springer International Publishing. 146-177, 2015.
- BAUERNFEIND, F.; HORNING, V. Of inflammasomes and pathogens – sensing of microbes by the inflammasome. *EMBO Mol Med*, v. 5, p. 814–826, 2013.
- BECKER, H. M. G.; GUIMARÃES, R. E. S.; NASCIMENTO, E.; BECKER, C. G.; GONÇALVES, D. U.; CROSARA, P. F. T. B. Cytokines profile and HLA typing in tolerant and non-tolerant patients to aspirin with nasossinusul polyposis. *Rev. Bras. Otorrinolaringol*, v.69, n.3, 2003.
- BECKER, K. L.; IFRIM, D. C.; QUINTIN, J.; NETEA, M. G.; van de VEERDONK, F. L. Antifungal innate immunity: recognition and inflammatory networks. *Semin Immunopathol*, v.37, p.107–116, 2015.
- BEDOUI, S.; HEATH, W. R.; MUELLER, S. N. CD4(+) T cell help amplifies innate signals for primary CD8 (+) T-cell immunity. *Immunol Rev.*, v.272, n.1, p.52-64, 2016.
- BERGSBAKEN, T.; FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol*, n.7, v.2, p. 99–109, 2009.
- BONIFAZ, A.; VÁSQUEZ-GONZÁLEZ, D.; PERUSQUIA-ORTIZ, A. M. Subcutaneous mycoses: chromoblastomycosis, sporotrichosis and mycetoma. *J Dtsch Dermatol.*, v. 48, p.619-627, 2010.
- BONIFAZ, A.; ARAIZA, J, PEREZ-MEJIA, A.; OCHOA, L. A.; TORIELLO, C. Intradermal test with sporotrichin in a community in the Sierra Norte de Puebla. *Dermatol Rev Mex*, v. 57, p. 428–432, 2013.
- BORGES, T. S.; ROSSI, C. N.; FEDULLO, J. D.; TABORDA, C. P.; LARSSON, C. E. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the claws of domestic cats (indoor and outdoor) and in captivity in São Paulo (Brazil). *Mycopathologia*, v.176, n.1-2, p.129-137, 2013.
- BORGHI, M.; DE LUCA, A.; PUC CETTI, M. JAEGER, M.; MENCACCI, A.; ROMANI, L. Pathogenic NLRP3 inflammasome activity during *Candida* infection is negatively regulated by IL-22 via activation of NLRC4 and IL-1Ra. *Cell Host Microbe*, v.18 p.198–209, 2015.
- BRYSON, K. J.; WEI, X. Q.; ALEXANDER, J. Interleukin-18 enhances a Th2 biased response and susceptibility to *Leishmania mexicana* in BALB/c mice. *Microbes Infect.* v.10, n.7, p.834–839, 2008.
- BURNS, M. J.; KAPADIA, N. N.; SILMAN, E. F. Sporotrichosis. *West J Emerg Med.*, v. 10. n. 3, p. 204, 2009.
- CARLOS, I. Z.; SGARBI, D. B.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C. S.; SILVA, C. L. Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the systemic form of the disease. *Mycopathologia*, v.117, n.3, p.139-144, 1992.
- CARLOS, I. Z.; ZINI, M. M.; SGARBI, D. B.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C. S.; SILVA, C. L. Disturbances in the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor in disseminated murine sporotrichosis. *Mycopathologia*, v.127, n.3, p.189-94, 1994.
- CARLOS, I. Z., SGARBI, D. B. G., PLACERES, M. C. P. Host organism defense by a peptide-polysaccharide extracted from the fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*, v.144, p.9-14, 1999.
- CARLOS, I. Z.; SGARBI, D. B.; SANTOS, G. C.; PLACERES, M. C. *Sporothrix schenckii* lipid inhibits macrophage phagocytosis: involvement of nitric oxide and tumour necrosis factor-alpha. *Scand. J. Immunol*, v.57, n.3, p.214–220, 2003.

- CARLOS, I. Z.; SASSA, M. F.; SGARBI, D. B.; PLACERES, M. C.; MAIA, D. C. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. *Mycopathologia*. v.168, p.1–10, 2009.
- CARLOS, I. Z.; FERREIRA, L. S.; GONÇALVES, A. C. Models of experimental sporotrichosis and immune response against *Sporothrix schenckii*. In: Carlos, I.Z., Ed. Sporotrichosis. New developments and future prospects. Switzerland: Springer International Publishing. 103-131, 2015.
- CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*, v.1, p.17–24, 2003.
- CHAKRABARTI, A.; BONIFAZ, A.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; MOCHIZUKI, T.; LI, S. Global epidemiology of sporotrichosis. *Medical Mycology*, v. 53, p. 3–14, 2015.
- CHARALAMPOS, A.; ROILIDES, E. Cytokines and fungal infections. *J. Hematol.*, v.129, p.583-596, 2005.
- CHUNG, Y.; CHANG, S. H.; MARTINEZ, G. J.; YANG, X. O.; NURIEVA, R.; KANG, H. S.; MA, L.; WATOWICH, S. S.; JETTEN, A. M.; TIAN, Q.; DONG, C. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity*. v.30, n.4, p.576-587, 2009.
- CIRACI, C.; JANCZY, J. R.; SUTTERWALA, F. S.; CASSEL, S. L. Control of innate and adaptive immunity by the inflammasome. *Microbes and infection/Institut Pasteur*, v.14, n.14, p.1263–1270, 2012.
- DAVIS, B. K.; WEN, H.; TING, J. P. The Inflammasome NLRs in Immunity, Inflammation, and Associated Diseases. *An. rev. immunol.*, v.29, n.1, p.707-735, 2011.
- de ALMEIDA, J. R.; KAIHAMI, G. H.; JANNUZZI, G. P.; de ALMEIDA, S. R. Therapeutic vaccine using a monoclonal antibody against a 70-kDa glycoprotein in mice infected with highly virulent *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. *Med Mycol.*, 2015 v.53, n.1, p.42-50, 2015.
- de VASCONCELOS, N. M.; van OPDENBOSCH, N.; LAMKANFI, M. Inflammasomes as polyvalent cell death platforms. *Cell Mol Life Sci.*, v.73, n.11-12, p.2335-2347, 2016.
- DEEPE Jr, G. S.; GIBBONS, R. S. Interleukins 17 and 23 Influence the Host Response to *Histoplasma capsulatum*. *J Infect Dis.*, v.200, n.1, p.142–151, 2009.
- DINARELLO, C. A. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med*. v.201, n.9, p.1355-1359, 2005.
- DINARELLO, C. A.; NOVICK, D.; KIM, S.; KAPLANSKI, G. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Front Immunol.*, v. 8, p. 284:289, 2013.
- DOSTERT, C.; PÉTRILLI, V.; van BRUGGEN, R.; STEELE, C.; MOSSMAN, B. T.; TSCHOPP, J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science (New York, N.Y.)*, v. 320, p. 674–677, 2008.
- DUPONT, N.; LACAS-GERVAIS, S.; BERTOUT, J.; PAZ, I.; FRECHE, B.; VAN NHIEU, G. T.; VAN DER GOOT, F. G.; SANSONETTI, P. J.; LAFONT, F. Shigella phagocytic vacuolar membrane remnants participate in the cellular response to pathogen invasion and are regulated by autophagy. *Cell Host Microbe*, v. 6, p. 137-149, 2009.
- ELINAV, E.; FLAVELL, R. A. Integrative inflammasome activity in the regulation of intestinal mucosal immune responses. *Mucosal Immunology*, v.6, n.1, p.4-13, 2012.
- ELLIOTT, E. I.; SUTTERWALA, F. S. Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly. *Immunological Reviews*, v. 265, p. 35-52, 2015.

- ERWIG, L. P.; GOW, N. A. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nat Rev Microbiol.*, v.14, n.3, p.163-176, 2016.
- ESPINOSA, V.; RIVERA, A. Cytokines and the regulation of fungus-specific CD4 T cell differentiation. *Cytokine*, v.58, p.100–106, 2012.
- FERNANDES, K. S.; NETO, E. H.; BRITO, M. M.; SILVA, J. S.; CUNHA, F. Q.; BARJA-FIDALGO, C. Detrimental role of endogenous nitric oxide in host defence against *Sporothrix schenckii*. *Immunology*, v.123, p.469–479, 2008.
- FERRARI, D.; CHIOZZI, P.; FALZONI, S.; HANAU, S.; Di VIRGILIO, F. Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J. Exp. Med.*, v. 185, p. 579–582, 1997.
- FERRARI, D.; PIZZIRANI, C.; ADINOLFI, E.; LEMOLI, R. M.; CURTI, A.; IDZKO, M.; PANTHER, E.; Di VIRGILIO, F. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J. Immunol.*, v. 176, p. 3877–3883, 2006.
- FERREIRA, L. S.; GONÇAVES, A. C.; PORTUONDO, D. L.; MAIA, D. C. G.; PLACERES, M. C. P.; BATISTA-DUHARTE, A.; CARLOS, I. Z. Optimal clearance of *Sporothrix schenckii* requires an intact Th17 response in a mouse model of systemic infection. *Immunobiology* v.220, p.985–992, 2015.
- FIGUEIREDO, C.; LIMA, O. C.; CARVALHO, L.; LOPES-BEZERRA, L. M.; MORANDI, V. The in vitro interaction of *Sporothrix schenckii* with human endothelial cells is modulated by cytokines and involves endothelial surface molecules. *Microb Pathog.*, v.36, p.177– 188, 2004.
- 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, p.648-650, 2007.
- FRANCO, D. L.; NASCIMENTO, R. C.; FERREIRA, K. S.; ALMEIDA, S. R. Antibodies against *Sporothrix schenckii* enhance TNF- α production and killing by macrophages. *Scand J Immunol.*, v.75, n.2, p.142-146, 2012.
- FREITAS, D. F.; VALLE, A. C.; ALMEIDA PAES, R.; BASTOS, F. I.; GALHARDO, M. C. Zoonotic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: a protracted epidemic yet to be curbed. *Clin Infect Dis*, v. 50, p.453, 2010.
- FREITAS, D. F.; DO VALLE, A. C.; DE ALMEIDA PAES, R.; BASTOS, F. I.; GALHARDO, M. C. Zoonotic Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: a protracted epidemic yet to be curbed. *Clin Infect Dis.*, v.50, n.3, p.453, 2011.
- FREITAS, D. F.; LIMA, I. A. R.; CURI, C. L.; JORDÃO, L.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; VALLE, A. C. F.; GALHARDO, M. C. G.; CURI, A. L. L. Acute dacryocystitis: another clinical manifestation of sporotrichosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.109, n.2, p.262-264, 2014.
- GALIMBERTI, R.; TORRE, A. C.; BAZTÁN, M. C.; RODRIGUEZ-CHIAPPETTA, F. Emerging systemic fungal infections. *Clinics in Dermatology*, v.30, p.633–650, 2012.
- GAUTHIER, G.; KLEIN, B. S. Insights into fungal morphogenesis and immune evasion: fungal conidia, when situated in mammalian lungs, may switch from mold to pathogenic yeasts or spore-forming spherules. *Microbe Wash DC*, v.3, p.416–423, 2008.

- GHORESCHI, K.; LAURENCE, A.; YANG, X. P. TATO, C. M.; McGEACHY, M. J.; KONKEL, J. E.; RAMOS, H. L.; WEI, L.; DAVIDSON, T. S.; BOULADOUX, N.; GRAINGER, J. R.; CHEN, Q.; KANNO, Y.; WATFORD, W. T.; SUN, H. W.; EBERL, G.; SHEVACH, E. M.; BELKAID, Y.; CUA, D. J.; CHEN, W.; O'SHEA, J. J. Generation of pathogenic TH 17 cells in the absence of TGF- β 2 signalling. *Nature*, v.467, n7318, p.967–971, 2010.
- GOMES, M.T.R.; CAMPOS, P. C.; OLIVEIRA, F. S.; CORSETTI, P. P.; BORTOLUCI, K. R.; CUNHA, L. D.; ZAMBONI, D. S.; OLIVEIRA, S. C. Critical Role of ASC Inflammasomes and bacterial type IV secretion system in caspase-1 activation and host innate resistance to *Brucella abortus* infection. *The Journal of Immunology*, v.190, p.3629–3638, 2013.
- GONÇALVES, A. C.; MAIA, D. C.; FERREIRA, L. S.; MONNAZZI, L. G.; ALEGRANCI, P.; PLACERES, M. C.; BATISTA-DUHARTE, A.; CARLOS, I. Z. Involvement of major components from *Sporothrix schenckii* cell wall in the caspase-1 activation, nitric oxide and cytokines production during experimental sporotrichosis. *Mycopathologia*. v.179, p.21-30, 2015.
- GONÇALVES, V. M.; MATTEUCCI, K. C.; BUZZO, C. L.; MIOLLO, B. H.; FERRANTE, D.; TORRECILHAS, A. C.; RODRIGUES, M. M.; ALVAREZ, J. M.; BORTOLUCI, K. R. NLRP3 controls *Trypanosoma cruzi* infection through a caspase-1-dependent IL-1R-independent NO production. *PLoS Negl Trop Dis.*, v.7, n.10, p.:e2469, 2013.
- 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.
- GORFU, G.; CIRELLI, K. M.; MELO, M. B.; MAYER-BARBER, K.; CROWN, D.; KOLLER, B. H.; MASTERS, S.; SHER, A.; LEPPLA, S. H.; MOAYERI, M.; SAEIJ, J. P. J.; GRIGG, M. E. Dual Role for Inflammasome sensors NLRP1 and NLRP3 in murine resistance to *Toxoplasma gondii*. *MBIO*, v.5, n.1, p.1113-1117, 2014.
- GORR, S. U. Antimicrobial peptides of the oral cavity. *Periodontol 2000*, v.51, p.152–180, 2009.
- GOVENDER, N. P.; MAPHANGA, T. G.; ZULU, T. G.; PATEL, J.; WALAZA, S.; JACOBS, C.; EBONWU, J. I.; NTULI, S.; NAICKER, S. D.; THOMAS, J. An Outbreak of Lymphocutaneous Sporotrichosis among Mine-Workers in South Africa. *PLoS Negl Trop Dis*. v.9, n.9, 2015.
- GOZALBO, D.; MANEU, V.; GIL, M. L. Role of IFN-gamma in immune responses to *Candida albicans* infections. *Front Biosci*, n.1, v.19, p.1279-1290, 2014.
- GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, v.126, p.131-138, 1982.
- GREEN, J.T.; RICHARDSON, C.; MARSHALL, R.W.; RHODES, J.; McKIRDY, H.C.; THOMAS, G.A.; WILLIAMS, G. T. Nitric oxide mediates a therapeutic effect of nicotine in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.*, v.14, p.1429-1434, 2000.
- GROCOTT, R. G. A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. *Am J Clin Pathol [S.I.]*, v. 25, n. 8, p. 975-9, 1955.
- GROSS, O.; POECK, H.; BSCHIEDER, M.; DOSTERT, C.; HANNESSCHLAGER, N.; ENDRES, S.; HARTMANN, G.; TARDIVEL, A.; SCHWEIGHOFFER, E.; TYBULEWICZ, V.; MOCSAI, A.; TSCHOPP, J.; RULAND, J. Syk kinase signalling couples to the NLRP3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature*, v.459, n.7245, p.433-436, 2009.

- GUARRO, J.; GENE, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.12, p.454–500, 1999.
- GUO, C.; CHEN, M.; FA, Z.; LU, A.; FANG, W.; SUN, B.; CHEN, C.; LIAO, W.; MENG, G. Acapsular *Cryptococcus neoformans* activates the NLRP3 inflammasome. *Microbes Infect*, v. 16, n. 10, p. 845-854, 2014.
- GUO, H.; CALLAWAY, J. B.; TING, J. P.Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat med*, n. 7, v.21, 2015.
- GUO, L.; JUNTILA, I. S.; PAUL, W. E. Cytokine-induced cytokine production by conventional and innate lymphoid cells. *Trends Immunol.*, v.33, n.12, p.598-606, 2012.
- GUO, S.; YANG, C.; DIAO, B.; HUANG, X.; JIN, M.; CHEN, L.; YAN, W.; NING, Q.; ZHENG, L.; WU, Y.; CHEN, Y. The NLRP3 Inflammasome and IL-1 β accelerate immunologically mediated pathology in experimental viral fulminant hepatitis. *PLoS Pathog.*, 1005155, 2015.
- GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; DO VALLE, A. C.; FRAGA, B. L.; SCHUBACH, A. O.; HOAGLAND, B. R.; MONTEIRA, P. C.; BARROS, M. B. Disseminated sporotrichosis as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome. *Mycoses*, v.53, p.78–80, 2010.
- HALLE, A.; HORNING, V.; PETZOLD, G. C.; STEWART, C. R.; MONKS, B. G.; REINHECKEL, T.; FITZGERALD, K. A.; LATZ, E.; MOORE, K. J.; GOLENBOCK, D. T. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat. Immunol.*, v. 9, p. 857–865, 2008.
- HARDINSON, S. E.; BROWN, G. D. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nat Immunol*, v. 13, p. 817-822, 2012.
- HEID, M. E.; KEUEL, P. A.; KAMGA, C.; SHIVA, S.; WATKINS, S. C.; SALTER, R. D. Mitochondrial reactive oxygen species induces NLRP3-dependent lysosomal damage and inflammasome activation. *J Immunol* v. 191, p. 5230–5238, 2013.
- HEKTOEN, L.; PERKINS, C. F. Refractory Subcutaneous Abscesses caused by *Sporothrix schenckii*, a new Pathogenic Fungus. *J Exp Med.*, v.5, p.77-89, 1900.
- HERNÁNDEZ-SANTOS, N.; GAFFEN, S. L. Th17 cells in immunity to *Candida albicans*. *Cell Host Microbe.*, v.11, n.5, p.425-435, 2012.
- HISE, A. G.; TOMALKA, J.; GANESAN, S.; PATEL, K.; HALL, B. A.; BROWN, G. D.; FITZGERALD, K. A. An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Host Microbe*, v.5, p.487-497, 2009.
- HOGAN, L. H.; KLEIN, B. S.; LEVITZ, S. M. Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol.*, v.9, n.4, p.469-488, 1996.
- HORNING, V.; BAUERNFEIND, F.; HALLE, A.; SAMSTAD, E. O.; KONO, H.; ROCK, K. L.; FITZGERALD, K. A.; LATZ, E. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol*, v. 9, p. 847–856, 2008.
- HU, Y.; MAO, K.; ZENG, Y.; CHEN, S.; TAO, Z.; YANG, C et al. Tripartite-motif protein 30 negatively regulates NLRP3 inflammasome activation by modulating reactive oxygen species production. *J Immunol*, v.185, p.7699–7705, 2010.

- HU, Z.; YAN, C.; LIU, P.; HUANG, Z.; MA, R.; ZHANG, C.; WANG, R.; ZHANG, Y.; MARTINON, F.; MIAO, D.; DENG, H.; WANG, J.; CHANG, J.; CHAI, J. Crystal structure of NLRC4 reveals its autoinhibition mechanism. *Science*, v.341, n.6142, p.172–175, 2013.
- HUAI, W.; ZHAO, R.; SONG, H.; ZHAO, J.; ZHANG, L.; ZHANG, L.; GAO, C.; HAN, L.; ZHAO, W. Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates NLRP3 inflammasome activity by inhibiting NLRP3 transcription. *Nat Commun*, 5:4738, 2014.
- HUANG, G.; WANG, Y.; CHI, H. Regulation of Th17 cell differentiation by innate immune signals. *Cell Mol Immunol.*, n.9, v.4, p.287-295, 2012.
- HUANG, W.; NA, L.; FIDEL, P. L.; SCHWARZENBERGER, P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J. Infect. Dis.*, v.190, p.624–631, 2004.
- ITO, M.; YANAGI, Y.; ICHINOHE, T. Encephalomyocarditis virus viroporin 2B activates NLRP3 inflammasome. *PLoS Pathog*, v.8, n.8, p.e1002857, 2012.
- ITO, S.; HARA, Y.; KUBOTA, T. CARD8 is a negative regulator for NLRP3 inflammasome, but mutant NLRP3 in cryopyrin-associated periodic syndromes escapes the restriction. *Arthritis Res Ther* v.12, n.1, p.R52, 2014.
- JIN, J.; YU, Q.; HAN, C.; HU, X.; XU, S.; WANG, Q.; WANG, J.; LI, N.; CAO, X. LRRFIP2 negatively regulates NLRP3 inflammasome activation in macrophages by promoting Flightless-I-mediated caspase-1 inhibition. *Nat Commun*, 4: 2075, 2013.
- JO, E. K.; KIM, J. K.; SHIN, D. M.; SASAKAWA, C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol.*, v.13, n.2, p.148–159, 2016.
- JOLY, S.; MA, N.; SADLER, J. J.; SOLL, D. R.; CASSEL, S. L.; SUTTERWALA, F. S. Cutting edge: *Candida albicans* hyphae formation triggers activation of the NLRP3 inflammasome. *J. Immunol.*, v.183, n.6, p.3578–3581, 2009.
- JUANG, S. S.; MOON, J. S.; XU, J. F.; IFEDIGBO, E.; RYTER, S. W.; CHOI, A. M et al. Carbon monoxide negatively regulates NLRP3 inflammasome activation in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v.308, p.1058–1067, 2015.
- KAGAMI, S.; RIZZO, H. L.; KURTZ, S. E.; MILLER, L. S.; BLAUVELT, A. IL-23 and IL-17A, but not IL-12 and IL-22, are required for optimal skin host defense against *Candida albicans*. *J Immunol*, v.185, p.5453–5462, 2010.
- KANETSUNA, F.; CARBONELL, L. M.; MORENO, R. E.; RODRIGUES, J. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Bacteriol.*, v.97, p.1036-1041, 1969.
- KANETSUNA, F., CARBONELL, L. M. Cell wall glucan of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal Bacteriol.*, v.101, n.3, p.675-680, 1970.
- KANETSUNA, F.; CARBONELL, L. M.; AZUMA, I.; YAMAMURA, Y. Biochemical studies on thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal Bacteriol.*, v.110, n.1, p.208-218, 1972.
- KANNEGANTI, T. D.; LAMKANFI, M.; NÚÑEZ, G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity*. v.27, n.4, p.549-559, 2007.
- KANNEGANTI, T. D.; LAMKANFI, M.; KIM, Y. G.; CHEN, G.; PARK, J. H.; FRANCHI, L.; VANDENABEELE, P.; NÚÑEZ, G. Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. *Immunity*, v. 26, p. 433–443, 2007.

- KARKI, R.; MAN, S. M.; MALIREDDI, R. K.; GURUNG, P.; VOGEL, P.; LAMKANFI, M.; KANNEGANTI, T. D. Concerted activation of the AIM2 and NLRP3 inflammasomes orchestrates host protection against *Aspergillus* infection. *Cell Host Microbe*, v.17, n.3, p.357-368, 2015.
- KAYAGAKI, N.; WARMING, S.; LAMKANFI, M.; VANDE WALLE, L.; LOUIE, S.; DONG, J.; NEWTON, K.; QU, Y.; LIU, J.; HELDENS, S.; ZHANG, J.; LEE, W. P.; ROOSE-GIRMA, M.; DIXIT, V. M. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature*, v.16, n.7371, p.117-121, 2011.
- KETELUT-CARNEIRO, N.; SILVA, G. K.; ROCHA, F. A.; MILANEZI, C. M.; CAVALCANTI-NETO, F. F.; ZAMBONI, D. S.; SILVA, J. S. IL-18 triggered by the Nlrp3 inflammasome induces host innate resistance in a pulmonary model of fungal infection. *J Immunol*. v.194, n.9, p. 4507-4517, 2015.
- KHADER, S. A.; GAFFEN, S. L.; KOLLS, J. K. Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal Immunol.*, v.2, n.5, p.403-411, 2009.
- KIM, Y. K.; SHIN, J. S.; NAHM, M. H. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. *Yonsei Med J*, v.57, n.1, p.:5-14, 2016.
- KIM, J. J.; JO, E. K. NLRP3 inflammasome and host protection against bacterial infection. *J Korean Med Sci.*, v. 28, n. 10, p. 1415-1423, 2013.
- KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M. IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol.*, v.27, p.485-517, 2009.
- KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol.*, v.30, n.1, p.16-34, 2011.
- LA HOZ, R. M.; BADDLEY, J. W. Subcutaneous fungal infections. *Curr Infect Dis Rep*, v.14, p.530-539, 2012.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. Guia para Identificação: fungos, actinomicetos, algas de interesse médico. São Paulo: Sarvier, p.344-353, 1998.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; De MELO, N. T. Esporotricose e outras micoses gomadas. *Tratato de Micologia. São Paulo: Sarvier. Cap. 20, p.479-497, 2002.*
- LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*, v.157, n.5, p.1013-1022, 2014.
- LAMKANFI, M.; VANDE WALLE, L.; KANNEGANTI, T. D. Deregulated inflammasome signaling in disease. *Immunol Rev.*, v. 243, n. 1, p. 163-173, 2011.
- LATZ, E.; XIAO, S.; STUTZ, A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol*, v. 13, n. 6, 2013.
- LEE, W. W.; KANG, S. W.; CHOI, J., LEE, S. H.; SHAH, K.; EYNON, E. E.; FLAVELL, R. A.; KANG, I. Regulating human Th17 cells via differential expression of IL-1 receptor. *Blood*, v.115, p.530-540, 2010.
- LEE, Y.; KUCHROO, V. Defining the functional states of Th17 cells. *F1000Res*. v.4, p.132. 2015
- LEI, G.; CHEN, M.; LI, H.; NIU, J. L.; WU, S.; MAO, L.; LU, A.; WANG, H.; CHEN, W.; XU, B.; LENG, Q.; XU, C.; YANG, G.; AN, L.; ZHU, L. P.; MENG, G. Biofilm from a clinical strain of *Cryptococcus neoformans* activates the NLRP3 inflammasome. *Cell Res.*, v.23, n.7, p.965-968, 2013.

- LIMA-JUNIOR, D. S.; COSTA, D. L.; CARREGARO, V.; CUNHA, L. D.; SILVA, A. L.; MINEO T. W.; GUTIERREZ, F. R.; BELLIO, M.; BORTOLUCI, K. R.; FLAVELL, R. A.; BOZZA, M. T.; SILVA, J. S.; ZAMBONI, D. S. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania. *Nature medicine*. v.19, n.7, 2013.
- LOPES-BEZERRA, L. M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R. O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Ann. Brazil. Acad. Sciences*, v. 78, p. 293-308, 2006.
- LÓPEZ-ROMERO, E.; REYES-MONTES, R.; PÉREZ-TORRES, A.; RUIZ-BACA, E.; VILLAGÓMEZ-CASTRO, J. C.; MORA-MONTES, H. M.; FLORES-CARREÓN, A.; TORIELLO, C. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. *Future Microbiol.*, v.6, n.1, p.85-102, 2011.
- LU, A.; WU, H. Structural mechanisms of inflammasome assembly. *FEBS J.* v.282, n.3, p.435–444, 2015.
- LUCKHEERAM, R. V.; ZHOU, R.; VERMA, A. D.; XIA, B. CD4+T Cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol.* 2012; 2012:925135.
- LUTZ, A.; SPLENDORE, A. On a mycosis observed in men and mice: Contribution to the knowledge of the so-called sporotrichosis. *Revista Médica de São Paulo.*, v.21, p.443–450, 1907.
- LYON, G. M.; ZURITA, S.; CASQUERO, J.; HOLGADO, W.; GUEVARA, J.; BRANDT, M. E.; DOUGLAS, S.; SHUTT, K.; WARNOCK, D. W.; HAJIEH, R. A. Population-based surveillance and a case-control study of risk factors for endemic lymphocutaneous sporotrichosis in Peru. *Clin Infect Dis*, v. 36, p. 34–39, 2003.
- MA, J.; BECKER, C.; REYES, C.; UNDERHILL, D. M. Cutting edge: FYCO1 recruitment to dectin-1 phagosomes is accelerated by light chain 3 protein and regulates phagosome maturation and reactive oxygen production. *J Immunol*, v. 192, p. 1356-1360, 2014.
- MADRID, I. M.; MATTEI, A. S.; FERNANDES, C. G.; NOBRE, O.; MEIRELES, M. C. Epidemiological findings and laboratory evaluation of sporotrichosis: a description of 103 cases in cats and dogs in southern Brazil. *Mycopathologia*, v.173, n.4, p.265-273, 2012.
- MADRID, I. M.; XAVIER, M. O.; MATTEI, A. S.; FERNANDES, C. G.; GUIM, T. N.; SANTIN, R.; SCHUCH, L. F.; NOBRE, M. O.; ARAÚJO MEIRELES, M. C. Role of melanin in the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis. *Microbes Infect*, v.12, n.2, p.162–165, 2010.
- MAHAJAN, V. K. Sporotrichosis: An Overview and Therapeutic Options. *Dermatology Research and Practice*, doi: 10.1155/2014/272376, 2014.
- MAIA, D. C., SASSA, M. F.; PLACERES, M. C.; CARLOS, I. Z. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia* v.161, p.11–19, 2006.
- MAIA, D. C.; GONÇALVES, A. C.; FERREIRA, L. S.; MANENTE, F. A.; PORTUONDO, D. L.; VELLOSA, J. C. POLES, M. C.; BATISTA-DUHARTE, A.; CARLOS, I. Z. Response of cytokines and hydrogen peroxide to *Sporothrix schenckii* exoantigen in systemic experimental infection. *Mycopathologia*, v.181, n.3-4, p.207-215, 2016.
- MALIREDDI, R. K.; KANNEGANTI, T. D. Role of type I interferons in inflammasome activation, cell death, and disease during microbial infection. *Front Cel and Infect Microbiol*, v.3, p.77, 2013.
- MAO, K.; CHEN, S.; CHEN, M.; MA, Y.; WANG, Y.; HUANG, B et al. Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock. *Cell Res*, v.23, p.201–212, 2013.

- MAO, L.; ZHANG, L.; LI, H.; CHEN, W.; WANG, H.; WU, S.; GUO, C.; LU, A.; YANG, G.; AN, L.; ABLIZ, P.; MENG, G. Pathogenic Fungus *Microsporium canis* Activates the NLRP3 Inflammasome. *Infect. Immun.* v.82, n.2, p.882-892, 2014.
- MARIATHASAN, S.; WEISS, D. S.; NEWTON, K.; McBRIDE, J, O'ROURKE, K.; ROOSE-GIRMA, M.; LEE, W. P.; WEINRAUCH, Y.; MONACK, D. M.; DIXIT, V. M. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, v. 440, p. 228–232, 2006.
- MARTINON, F., BURNS K, TSCHOPP J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of pro-IL-beta. *Mol Cell.* v.10, p.417–426, 2002.
- MARTINON, F.; PETRILLI, V.; MAYOR, A.; TARDIVEL, A.; TSCHOPP, J. Gout-associated uric acid crystals activate the Nalp3 inflammasome. *Nature*, v.440, p.237-241, 2006.
- MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. *An. rev. immunol.*, v.27, p.229-265, 2009.
- MESA-ARANGO, A. C.; REYES-MONTES, M. R.; PEREZ-MEJIA, A.; NAVARRO-BARRANCO, H.; SOUZA, V.; ZÚNIGA, G.; TORIELLO, C. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. *J Clin Microbiol*, v.40, n.8, p.3004–3011, 2002.
- MIRKOV, I.; STOJANOVIC, I.; GLAMOCLIIJA, J.; STOSIC-GRUJICIC, S.; ZOLOTAREVSKI, L.; KATARANOVSKI, D.; KATARANOVSKI, M. Differential mechanisms of resistance to sublethal systemic *Aspergillus fumigatus* infection in immunocompetent BALB/c and C57BL/6 mice. *Immunobiology.*, v.216, n.1-2, p.234–242, 2011.
- MLAMBO, G.; SIGOLA, L. B. Rifampicin and dexamethasone have similar effects on macrophage phagocytosis of zymosan, but differ in their effects on nitrite and TNF- α production. *Int Immunopharmacol*, v.3, p.513–522, 2003.
- MOREIRA, A. P.; DIAS-MELICIO, L. A.; SOARES, A. M. V. C. Interleukin-10 but not transforming growth factor beta inhibits murine activated macrophages *Paracoccidioides brasiliensis* killing: Effect on H₂O₂ and NO production. *Cellular Immunology*, v.263, p.196–203, 2010.
- MORETTI, S.; BOZZA, S.; OIKONOMOU, V.; RENGHA, G.; CASAGRANDE, A.; IANNITTI, R. G.; PUCETTI, M.; GARLANDA, C.; KIM, S.; LI, S.; VAN DE VEERDONK, F. L.; DINARELLO, C. A.; ROMANI, L. IL-37 inhibits inflammasome activation and disease severity in murine aspergillosis. *PLoS pathogens*, v.10, n.11, p.e1004462, 2014.
- MORRIS-JONES, R. Sporotrichosis. *Clin. Exp. Dermatol.* v.27, p.427–431, 2002.
- MORRIS-JONES, R.; YOUNGCHIM, S.; GOMES, B. L.; AISEN, P.; HAY, R. J.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A.; HAMILTON, A. J. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. *Infect Immun*, v.71, p.4026-4033, 2003.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, v.65, p.55, 1983.
- MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.*, v.8, p.958–969, 2008.
- MÜLLER, B. Cytokine imbalance in non-immunological chronic disease. *Cytokine*, v.18, n.6, p.334-339, 2002.

- MURAKAMI, T.; OCKINGER, J.; YU, J.; BYLES, V.; MCCOLL, A.; HOFER, A. M.; HORNG, T. Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci*, v. 109, p. 11282–11287, 2012.
- MURPHY, K. M.; STOCKINGER, B. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nat Immunol.*, v.11, n.8, p.674-680, 2010.
- NAKAYAMADA, S.; TAKAHASHI, H.; KANNO, Y.; O'SHEA, J. J. Helper T cell diversity and plasticity. *Curr Opin Immunol.*, v. 24, n. 3, p. 297-302, 2012.
- 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.
- NASCIMENTO, R. C.; ESPÍNDOLA, N. M.; CASTRO, R. A.; TEIXEIRA, P. A.; LOUREIRO y PENHA, C. V.; LOPES-BEZERRA, L. M.; ALMEIDA, S. R. Passive immunization with monoclonal antibody against a 70-kDa putative adhesin of *Sporothrix schenckii* induces protection in murine sporotrichosis. *Eur J Immunol*, v.38, n.11, p.3080-3089, 2008.
- NEGRINI, T. C.; FERREIRA, L. S.; ALEGRANCI, P.; ARTHUR, R. A.; SUNDFELD, P. P.; MAIA, D. C. G.; SPOLIDORIO, L. C.; CARLOS, I. Z. Role of TLR-2 and fungal surface antigens on innate immune response against *Sporothrix schenckii*. *Immunol Invest*, v.42, p.36-48, 2013.
- NEGRINI, T. C.; FERREIRA, L. S.; ARTHUR, R. A.; ALEGRANCI, P.; PLACERES, M. C.; SPOLIDORIO, L. C.; CARLOS, I. Z. Influence of TLR-2 in the immune response in the infection induced by fungus *Sporothrix schenckii*. *Immunol Investigat*, v.43, p.370-390, 2014.
- NEMECEK, J. C.; WUTHRICH, M.; KLEIN, B. S. Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science*, v.312, p.583–588, 2006.
- NETEA, M. G.; VONK, A. G.; van den HOVEN, M.; VERSCHUEREN, I.; JOOSTEN, L. A.; van KRIEKEN, J. H.; van den BERG, W. B.; van der MEER, J. W.; KULLBERG, B. J. Differential role of IL-18 and IL-12 in the host defense against disseminated *Candida albicans* infection. *Eur J Immunol*. v.33, n.12, p.3409-3417, 2003.
- NEYRA, E.; FONTEYNE, P.; SWINNW, D.; FAUCHE, F.; BUATAMANTE, B.; NOLARD, N. Epidemiology of human sporotrichosis investigated by amplified fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.*, v.43, p. 1348-1352, 2005.
- NGUYEN, M. L. T.; JONES, S. A.; PRIER, J. E.; RUSS, B. E. Transcriptional enhancers in the regulation of T cell differentiation. *Frontiers in Immunology*, doi: 10.3389/fimmu.2015.00462, 2015.
- NOVICK, D.; KIM, S.; KAPLANSKI, G.; DINARELLO, C A. Interleukin-18, more than a Th1 cytokine. *Semin Immunol.*, v.25, n.6, p.439–448, 2013.
- 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.
- OLIVEIRA, M. M.; ALMEIDA-PAES, R.; MUNIZ, M. M.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C., ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. *Mycopathologia*, v.172, p.257 267, 2011.
- OLIVEIRA, M. M.; ALMEIDA-PAES, R.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Molecular identification of the *Sporothrix schenckii* complex. *Rev Iberoam Micol*. v.31, n.1, p.2–6, 2014.

- OROFINO-COSTA, R.; BÓIA, M. N.; MGALHAES, G. A.; DAMASCO, P. S.; BERNARDES-ENGEMANN, A. R.; BENVENUTO, F.; SILVA, I. C.; LOPES-BEZERRA, L. M. Arthritis as a hypersensitivity reaction in a case of sporotrichosis transmitted by a sick cat: clinical and serological follow up of 13 months. *Mycoses*, v.53, p.81-83, 2010.
- PAIVA-OLIVEIRA, E. L.; SILVA, A. C.; da SILVA, R. M.; SEVENINI, L. A.; de MELO, H. A.; LAGROTA-CANDIDO, J.; QUIRICO-SANTOS, T. Inflammasome and its clinical impact: literature review. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v.11, n.1, p.96-102, 2012.
- PANDIYAN, P.; CONTI, H. R.; ZHENG, L.; PETERSON, A. C.; MATHERN, D. R.; HERNÁNDEZ-SANTOS, N.; EDGERTON, M.; GAFFEN, S. L.; LENARDO, M. J. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells promote Th17 cells in vitro and enhance host resistance in mouse *Candida albicans* Th17 cell infection model. *Immunity*, v.34, n.3, p.422-434, 2011.
- 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.
- PEREIRA, M. S. F.; MORGANTETTI, G. F.; MASSIS, L. M.; HORTA, C. V.; HORI, J. I.; ZAMBONI, D. S. Activation of NLRC4 by flagellated bacteria triggers caspase-1-dependent and -independent responses to restrict *Legionella pneumophila* replication in macrophages and *in vivo*. *Journal of Immunology*, v.187, n.12, p.6447-6455, 2011.
- PÉREZ-SÁNCHEZ, L.; GONZÁLEZ, E.; COLON-LORENZO, E. E.; GONZÁLEZ-VELÁSQUEZ, W.; GONZÁLES-MÉNDEZ, R.; RODRÍGUEZ-DEL VALLE, N. Interaction of the heterotrimeric G protein alpha subunit SSG-1 of *Sporothrix schenckii* with proteins related to stress response and fungal pathogenicity using a yeast two-hybrid assay. *BMC Microbiol*, v.10, p.317, 2010.
- PHILPOTT, D. J.; YAMAOKA, S.; ISRAEL, A.; SANSONETTI, P. J. Invasive *Shigella flexneri* activates NF-Kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *J Immunol*, v.165, p.903-914, 2000.
- PIETRELLA, D.; RACHINI, A.; PINES, M.; PANDEY, N.; MOSCI, P.; BISTONI, F.; d'ENFERT, C.; VECCHIARELLI, A. Th17 cells and IL-17 in protective immunity to vaginal candidiasis. *PLoS One*, v.6, n.7, p.e22770, 2011.
- PINKE, K. H.; LIMA, H. G.; CUNHA, F. Q.; LARA, V. S. Mast cells phagocyte *Candida albicans* and produce nitric oxide by mechanisms involving TLR-2 and Dectin-1. *Immunobiology*, v.221, n.2, p.220-227, 2016.
- PLATO, A.; HARDISON, S. E.; BROWN, G. D. Pattern recognition receptors in antifungal immunity. *Semin Immunopathol*, v.37, p.97-106, 2015.
- PLUDDMANN, A.; MUKHOPADHYAY, S.; GORDON, S. Innate immunity to intracellular pathogens: macrophage receptors and responses to microbial entry. *Immunol Rev*, v. 240, p. 11-24, 2011.
- PORTUONDO, D. L.; BATISTA-DUHARTE, A.; FERREIRA, L. S.; MARTÍNEZ, D. T.; POLES, M. C.; DUARTE, R. A.; de PAULA e SILVA, A. C.; MARCOS, C. M.; ALMEIDA, A. M.; CARLOS, I. Z. A cell wall protein-based vaccine candidate induce protective immune response against *Sporothrix schenckii* infection. *Immunobiology*, v.221, n.2, p.300-309, 2016.
- PRENAFETA-BOLDU, F. X.; SUMMERBELL, R.; de HOOG, G. S. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard? *FEMS Microbiol Rev*, v.30, p.109-130, 2006.

- PREVIATO, J. O.; PHILIP, A. J.; GORIN, R. H.; TRAVASSOS, L. R. Soluble and insoluble glucans from different cell types of the human pathogen *Sporothrix schenckii*. *Exper Mycol.*, 1979; v.3, p.92-110. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147597579800213>.
- RAJAN, J. V.; RODRIQUEZ, D.; MIAO, E. A.; ADEREM, A. The NLRP3 inflammasome detects encephalomyocarditis virus and vesicular stomatitis virus infection. *J Virol*, v.85, n.9, p.4167-4172, 2011.
- RATHINAM, V. K.; JIANG, Z.; WAGGONER, S. N.; SHARMA, S.; COLE, L. E.; WAGGONER, L.; VANAJA, S. K.; MONKS, B. G.; GANESAN, S.; LATZ, E.; HORNUNG, V.; VOGEL, S. N.; SZOMOLANYI-TSUDA, E.; FITZGERALD, K. The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nature immunology*, v.11, n.5, p.395-402, 2010.
- REIS, R. S.; ALMEIDA-PAES, R.; MUNIZ, M. M.; TAVARES, P. M.; MONTEIRO, P. C.; SCHUBACH, T. M.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. Molecular characterization of *Sporothrix schenckii* isolates from humans and cats involved in the sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, v.104, p.769-774, 2009.
- RICHARDSON, J. P.; MOYES, D. L. Adaptive immune responses to *Candida albicans* infection. *Virulence*. v.6, n.4, p.327-337, 2015.
- RODRIGUES, A. M.; HOOG, S.; CAMARGO, Z. P. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Medical Mycology*, v.51, 405-412, 2013.
- RODRIGUES, A. M.; de HOOG, G. S.; ZHANG, Y et al. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. *Emerg Microbes Infect* 3, e32, 2014.
- RODRIGUES, A. M.; CHOAPPA, C. R.; FERNANDES, G. F.; de HOOG, G. S.; de CAMARGO, Z. P. *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. *Fungal Biol.*, v.120, n.2, p.246-264, 2016.
- ROLDÁN-MARÍN, R.; CONTRERAS-RUIZ, J.; ARENAS, R.; VAZQUEZ-del-MERCADO, E.; TOUSSAINT-CAIRE, S.; VEGA-MEMIJÉ, M. E. Fixed sporotrichosis as a cause of a chronic ulcer on the knee. *Int Wound J*, v.6, p.63-66, 2009.
- ROMAGNANI, S.; MAGGI, E.; LIOTTA, F.; COSMI, L.; ANNUNZIATO, F. Properties and origin of human Th17 cells. *Molecular Immunology.*, v.47, p.3-7, 2009.
- ROMANI, L. Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* v.11, p.275- 288, 2011.
- ROMERO-MARTINEZ, R.; WHEELER, M.; GUERRERO-PLATA, A.; RICO, G.; TORRES-GUERRERO, H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect. Immun.*, v.68, p.3696-3703, 2000.
- RUIZ-BACA, E.; TORIELLO, C.; PEREZ-TORRES, A.; SABANERO-LOPEZ, M.; VILLAGOMEZ-CASTRO, J. C.; LOPEZ-ROMERO, E. Isolation and some properties of a glycoprotein of 70 kDa (Gp70) from the cell wall of *Sporothrix schenckii* involved in fungal adherence to dermal extracellular matrix. *Med.Mycol.*, v.47, p.185-196, 2009.
- SAAVEDRA, P. H. V.; DEMON, D.; GORP, H. V, LAMKANFI, M. Protective and detrimental roles of inflammasomes in disease. *Semin Immunopathol.*, v.37, n.4, p.313-322, 2015.
- SAGE, P. T.; SHARPE, A. H. T follicular regulatory cells in the regulation of B cell responses. *Trends Immunol.*, v. 36, n. 7, p. 408-410, 2015.

- SAID-SADIER, N.; PADILLA, E.; LANGSLEY, G.; OJCIUS, D. M. *Aspergillus fumigatus* stimulates the NLRP3 inflammasome through a pathway requiring ROS production and the Syk tyrosine kinase. *PLoS One.*, v.5, n.4, p.e10008, 2010.
- SAKAGUCHI, S.; WING, K.; ONISHI, Y.; PRIETO-MARTIN, P.; YAMAGUCHI, T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int immunol.*, v.21, n.10, p.1105–1111, 2009.
- SANDOVAL-BERNAL, G.; BARBOSA-SABANERO, G.; SHIBAYAMA, M.; PEREZ-TORRES, A.; TSUTSUMI, V.; SABANERO, M. Cell wall glycoproteins participate in the adhesion of *Sporothrix schenckii* to epithelial cells. *Mycopathologia*, v.171, n.4, p.251–259, 2010.
- SASSÁ, M. F.; SATURI, A. E.; SOUZA, L. F.; RIBEIRO, L. C. ; SGARBI, D. B.; CARLOS, I. Z. Response of macrophage Toll-like receptor 4 to a *Sporothrix schenckii* lipid extract during experimental sporotrichosis. *Immunology*, v.128, p.301-309, 2009.
- SASSÁ, M. F.; FERREIRA, L. S.; RIBEIRO, L. C. A.; CARLOS, I. Z. Immune response against *Sporothrix schenckii* in TLR-4-Deficient mice. *Mycopathologia*. v.174, p.21-30, 2012.
- SCHENK, B. On Refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus, possibly related to Sporotrichia. *Bull Johns Hosp.*, v.9, p.286-290, 1898.
- SCHUBACH, A.; BARROS, M. B.; WANKE, B. Epidemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis.*, v.21, n.2, p.129–133, 2008.
- SGARBI, D. B., da SILVA, A. J.; CARLOS, I. Z.; SILVA, C. L.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C. S. Isolation of ergosterol peroxide and its reversion to ergosterol in the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*, v.139, p.9–14, 1997.
- SHIMONAKA, H.; NOGUCHI, T.; KAWAI, K.; KASEGAWA, I.; NOZAWA, Y.; ITO, Y. Immunochemical studies on the human pathogen *Sporothrix schenckii*: effects of chemical and enzymatic modification of the antigenic compounds upon immediate and delayed reactions. *Infect. Immun.*, v.11, n.6, p.1187-1194, 1975.
- SILVA, M. B. T.; COSTA, M. M. M.; TORRES, C. C. S.; GUTUIERREZ, M. C.; VALLE, A. C. F.; MAGALHÃES, M. A. F. M.; SABROZA, P. C.; OLIVEIRA, R. M. Urban sporotrichosis: a neglected epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saude Publica* v. 28, p. 1867–1880, 2012.
- STEENBERGEN, J. N.; NOSANCHUK, J. D.; MALLIARIS, S. D., CASADEVALL, A. Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. *Infect Immun*, v.72, n.6, p.3478–3488, 2004.
- STROWIG, T.; HENAO-MEJIA, J.; ELINAV, E.; FLAVELL, R. Inflammasomes in health and disease. *Nature*, v.481, n.7381, p.278-286, 2012.
- STUYT, R. J.; NETEA, M. G.; VERSCHUEREN, I.; FANTUZZI, G.; DINARELLO, C. A.; VAN DER MEER, J. W.; KULLBERG, B. J. Role of interleukin-18 in host defense against disseminated *Candida albicans* infection. *Infect Immun*. v.70, n.6, p.3284-3286, 2002.
- STUYT, R. J.; NETEA, M. G.; van KRIEKEN, J. H.; van der MEER, J. W.; KULLBERG, B. J. Recombinant interleukin-18 protects against disseminated *Candida albicans* infection in mice. *J Infect Dis*. v.189, n.8, p.1524-1527, 2004.
- SUTTON, C. E.; LALOR, S. J.; SWEENEY, C. M.; BRERETON, C. F.; LAVELLE, E. C.; MILLS, K. H. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity*, v.31, n. 7081, p. 331–341, 2009.

- TACHIBANA, T.; MATSUYAMA, T.; MITSUYAMA, M. Involvement of CD4⁺ T cells and macrophages in acquired protection against infection with *Sporothrix schenckii* in mice. *Med Myc.*, v. 37, n. 6, p. 397-404, 1999.
- TAVARES, A. H.; MAGALHÃES, K. G.; ALMEIDA, R. D.; CORREA, R.; BURGEL, P. H.; BOCCA, A. L. NLRP3 Inflammasome activation by *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLOS Negl Trop Dis*, v. 7, n. 12, p. 2595, 2013.
- TEIXEIRA, P. A.; CASTRO, R. A.; NASCIMENTO, R. C.; TRONCHIN, G.; PEREZ-TORRES, A.; LAZÉRA, M.; ALMEIDA, S. R.; BOUCHARA, J. P.; LOUREIRO-PENHA, C. V.; LOPES-BEZERRA, L. M. Cell surface expression of adhesins for fibronectin correlates with virulence in *Sporothrix schenckii*. *Microbiolog*, v. 155, p. 3730–3738, 2009.
- TEIXEIRA, P. A.; De CASTRO, R. A.; FERREIRA, F. R.; CUNHA, M. M.; TORRES, A. P.; PENHA, C. V.; ROZENTAL, S.; LOPES-BEZERRA, L. M. L-DOPA accessibility in culture medium increases melanin expression and virulence of *Sporothrix schenckii* yeast cells. *Med Mycol*, v. 48, n. 5, p. 687-95, 2010.
- TÉLLEZ, M. D.; BATISTA-DUHARTE, A.; PORTUONDO, D.; QUINELLO, C.; BONNE-HERNÁNDEZ, R.; CARLOS, I. Z. *Sporothrix schenckii* complex biology: environment and fungal pathogenicity. *Microbiology*, v.160, p.2352–2365, 2014.
- TOMA, C.; HIGA, N.; KOIZUMI, Y.; NAKASONE, N.; OGURA, Y.; McCOY, A. J.; FRANCHI, L.; UEMATSU, S.; SAGARA, J.; TANIGUCHI, S.; TSUTSUI, H.; AKIRA, S.; TSCHOPP, J.; NÚÑEZ, G.; SUZUKI, T. Pathogenic *Vibrio* activate NLRP3 inflammasome via cytotoxins and TLR/nucleotide-binding oligomerization domain-mediated NF-kappa B signaling. *J Immunol*, v. 184, n. 9, p. 5287-5297, 2010.
- TOMALKA, J.; GANESAN, S.; AZODI, E.; PATEL, K.; MAJMUDAR, P.; HALL, B. a; FITZGERALD, K. a; HISE, A. G. A novel role for the NLRC4 inflammasome in mucosal defenses against the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS pathogens*, v. 7, n. 12, p. e1002379, 2011.
- TORRES-GUERRER, H.; ARENAS-LOPEZ, G. UV irradiation induced high frequency of colonial variants with altered morphology in *Sporothrix schenckii*. *Med Mycol*, v. 36, n. 2, p. 81–87, 1998.
- TRZECIZK-RYCZEK, A.; TOKARZ-DEPTULA, B.; DEPTULA, W. Antifungal immunity in selected fungal infections. *Postepy Hig Med Dosw.*, v. 69, p. 469-474, 2015.
- ULLAND, T. K.; FERGUSON, P. J.; SUTTERWALA, F. S. Evasion of inflammasome activation by microbial pathogens. *J Clin Invest.*, v. 125, n. 2, p. 469-477, 2015.
- VALENTÍN-BERRÍOS, S.; GONZÁLEZ-VELÁZQUEZ, W.; PÉREZ-SÁNCHEZ, L.; GONZÁLES-MÉNDEZ, R.; RODRÍGUEZ - DEL VALLE, N. Cytosolic phospholipase A2: a member of the signalling pathway of a new G protein alpha subunit in *Sporothrix schenckii*. *BMC Microbiol.*, v. 9, p. 100, 2009.
- van BRUGGEN, R.; KOKER, M. Y.; JANSEN, M.; van HOUTT, M.; ROOS, D.; KUIJPERS, T. W.; van den BERG, T. K. Human NLRP3 inflammasome activation is Nox1-4 independent. *Blood*, v. 115, p. 5398–5400, 2010.
- van de VEERDONK, F. L.; JOOSTEN, L. A. B.; SHAW, P. J.; SMEEKENS, S. P.; MALIREDDI, R. K.; van der MEER, J. W. M.; KULLBERG, B. J.; NETEA, M. G.; KANNEGANTI, T. D. The inflammasome drives protective Th1 and Th17 cellular responses in disseminated candidiasis. *Eur. J. Immunol.*, v. 41, n. 8, p. 2260–2268, 2011.

- van de VEERDONK, F. L.; NETEA, M. G.; DINARELLO, C. A.; JOONSTEN, L. A. Inflamassome activation and IL-1b and IL-18 processing during infection. *Trends in Immunology.*, v. 32, n. 3 p. 110-116, 2011.
- van de VEERDONK, F. L.; JOOSTEN, L. A.; NETEA, M. G. The interplay between inflammasome activation and antifungal host defense. *Immunological Reviews*, v. 265, n. 1, p. 172–180, 2015.
- VAN OPDENBOSCH, N.; GURUNG, P.; VANDE WALLE, L.; FOSSOUL, A.; KANNEGANTI, T. D.; LAMKANFI, M. Activation of the NLRP1b inflammasome independently of ASC-mediated caspase-1 autoproteolysis and speck formation. *Nat Commun.*, v. 5, p. 3209, 2014.
- VANDE WALLE, L.; VAN OPDENBOSCH, N.; JACQUES, P.; FOSSOUL, A.; VERHEUGEN, E.; VOGEL, P.; BEYAERT, R.; ELEWAUT, D.; KANNEGANTI, T. D.; van LOO, G.; LAMKANFI, M. Negative regulation of the NLRP3 inflammasome by A20 protects against arthritis. *Nature*, v. 512, n. 7512, p. 69–73, 2014.
- VÁSQUEZ-del-MERCADO, E.; ARENAS, R.; PaADILLA-DESGARENES, C. Sporotrichosis. *Clinics in Dermatology*. v. 30, n. 4, p. 443-447, 2012.
- VELDHOEN, M.; HOCKING, R. J.; ATKINS, C. J.; LOCKSLEY, R. M.; STOCKINGER, B. TGF-beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.*, v. 24, n. 2, p. 179–189, 2006.
- VERA-CABRERA, L.; SALINAS-CARMONA, M. C.; WAKSMAN, N.; MESSEGUER-PÉREZ, J.; OCAMPO-CANDIANI, J.; WELSH, O. Host defenses in subcutaneous mycoses. *Clinics in Dermatology* v. 30, p. 382–388, 2012.
- VERDAN, F. F.; FALEROS, J. C.; FERREIRA, L. S.; MONNAZZI, L. G.; MAIA, D. C.; TANSINE, A.; PLACERES, M. C.; CARLOS, I. Z.; SANTOS-JUNIOR, R. R. Dendritic cell are able to differentially recognize *Sporothrix schenckii* antigens and promote Th1/Th17 response in vitro. *Immunobiology*, v. 271, n. 8, p. 788-794, 2012.
- WELLINGTON, M.; KOSELYN, K.; SUTTERWALA, F. S.; KRYSA, D. J. *Candida albicans* triggers NLRP3-mediated pyroptosis in macrophages. *Eukaryotic Cell*, v. 13, n. 2, p. 329–340, 2014.
- WUTHRICH, M.; DEEPE, G.; KLEIN, B. Adaptive immunity to fungi. *Annu Rev Immunol.*, v. 30, p. 115–148, 2012.
- WINKLER, S.; ROSEN-WOLFF, A. Caspase-1: an integral regulator of innate immunity. *Semin Immunopathol.*, v. 37, n. 4, p. 419–427, 2015.
- XU, L.; KITANI, A.; FUSS, I.; STROBER, W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3-T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol.*, v.178, n. 11, p.6725–6729, 2007.
- YANG, C. S.; SHIN, D. M.; JO, E. K. The Role of NLR-related Protein 3 Inflammasome in Host Defense and Inflammatory Diseases. *Int Neurol J.* v.16, p.2-12, 2012.
- ZAMBETTI, L. P.; LAUDISI, F.; LICANDRO, G.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; MORTELLARO, A. The rhapsody of NLRPs: master players of inflammation...and a lot more. *Immunol Res.*, v.53, n.1-3, p.78–90. 2012.
- ZAMBONI, D. S.; LIMA-JUNIOR, D. S. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. *Immunological Reviews* v.265, p.156–171, 2015.

ZHOU, R.; YAZDI, A. S.; MENU, P.; TSCHOPP, J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, v. 469, p. 221–225, 2011.

ZHU, J.; PAUL, W.E. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res.* n.20, v.1, p.4-12, 2010.

ZOETE, M. R.; PALM, N. W.; ZHU, S.; FLAVELL, R. A. Inflammasomes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, v.6, a016287, 2014.

CAPÍTULO II

23-Nov-2016

Dear Dr. Carlos:

Your manuscript entitled "The NLRP3 inflammasome contributes to host protection during *Sporothrix schenckii* infection" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Immunology.

Your manuscript ID is IMM-2016-4333.R1.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/imm> and edit your user information as appropriate.

Please check that all author names are correctly entered as this will be the name displayed in any PubMed search.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/imm>.

Thank you for submitting your manuscript to Immunology.

Best Wishes,

Immunology Editorial Office

Title: The NLRP3 inflammasome contributes to host protection during *Sporothrix schenckii* infection

Short Title: NLRP3 inflammasome in *S. schenckii* infection

Amanda Costa Gonçalves¹, Lucas Souza Ferreira¹, Francine Alessandra Manente¹, Carolina Maria Quinello Gomes de Faria¹, Marisa Campos Polesi¹, Cleverton Roberto de Andrade², Dario Simões Zamboni³, Iracilda Zeppone Carlos¹

(1) Department of Clinical Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara, São Paulo State University (FCF/UNESP), Araraquara, SP, Brazil.

(2) Department of Physiology and Pathology, Faculty of Dentistry of Araraquara, São Paulo State University (FOAR/UNESP), Araraquara, SP, Brazil.

(3) Department of Cell Biology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (FMRP/USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Keywords: NLRP3 inflammasome, pyroptosis, *S. schenckii*, sporotrichosis

Address: Correspondence and reprint requests to Dr^a Iracilda Zeppone Carlos, Department of Clinical Analysis, Laboratory of Immunology, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara, São Paulo State University (FCF/UNESP), Rodovia Araraquara-Jáú, Km 01, s/n, Campus Ville - Araraquara, SP, Brazil, CEP 14.800-903. Tel: +55-16-3301-5712 and Fax: +55-16-3322-0073. E-mail address: carlosiz@fcar.unesp.br

Abbreviations: ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain), DAMP (damage-associated molecular pattern), dpi (days post-

inoculation), F1 (alkali-insoluble fraction 1), IL (interleukin), KO (knockout), NOD (nucleotide-binding oligomerization domain), NLR (NOD-like receptor), NLRP3 (NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3), FLICA (fluorescent-labelled inhibitor of caspases), PAMP (pathogen-associated molecular pattern), PRR (pattern recognition receptor), Th (helper T), TLR (Toll-like receptor), WT (wild-type).

Summary

Sporotrichosis is a mycosis caused by fungi from the *Sporothrix schenckii* species complex, whose prototypical member is *Sporothrix schenckii sensu stricto*. Pattern recognition receptors (PRRs) recognize and respond to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and shape the following adaptive immune response. A family of PRRs most frequently associated with fungal recognition is the nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor (NLR). After PAMP recognition, NLR family pyrin domain-containing 3 (NLRP3) binds to apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) and caspase-1 to form the NLRP3 inflammasome. When activated, this complex promotes the maturation of the pro-inflammatory cytokines interleukin (IL)-1 β and IL-18 and cell death through pyroptosis. In this study, we aimed to evaluate the importance of the NLRP3 inflammasome in the outcome of *S. schenckii* infection using the following three different knockout (KO) mice: NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-}, and caspase-1^{-/-}. All KO mice were more susceptible to infection than the wild-type, suggesting that NLRP3-triggered responses contribute to host protection during *S. schenckii* infection. Furthermore, the NLRP3 inflammasome appeared to be critical for the *ex vivo* release of IL-1 β , IL-18 and IL-17 but not IFN- γ . Additionally, a role for the inflammasome in shaping the adaptive immune response

was suggested by the lower frequencies of type 17 helper T (Th17) and Th1/Th17 but not Th1 cells in *S. schenckii*-infected KO mice. Overall, our results indicate that the NLRP3 inflammasome links the innate recognition of *S. schenckii* to the adaptive immune response, thus contributing to protection against this infection.

Introduction

Fungi from the *Sporothrix schenckii* species complex, including *Sporothrix albicans*, *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix luriei*, *Sporothrix mexicana*, and *Sporothrix schenckii sensu stricto*, are the causative agents of sporotrichosis, a mycosis characterized by an acute and chronic evolution of cutaneous or subcutaneous nodular lesions affecting humans and other animals. The disease follows the traumatic inoculation of the fungus through soil-inoculating injuries, inhalation of conidia, or zoonotic transmission especially from cats and dogs (1-3).

Sporotrichosis has been reported in various countries and has achieved endemic status in many of them, most commonly in those from tropical and subtropical climate regions. However, since sporotrichosis is not a mandatory reportable disease, its exact prevalence is unknown. In Brazil, sporotrichosis cases have been increasing in a consistent fashion as follows: 13 human cases of sporotrichosis were diagnosed between 1987 and 1997, whereas an epidemic was observed between 1998 and 2004 with more than 750 human, 1503 feline, and 64 canine cases (4, 5). The city of Rio de Janeiro in Brazil, where sporotrichosis is hyperendemic as noted by reports of approximately 2200 human and 3244 feline cases of sporotrichosis between 1998 and 2009 (6), is especially concerning.

The immune mechanisms involved in resistance and susceptibility of the host to infection by *S. schenckii* are not fully understood (7). Previous studies showed that cell-based and innate immune responses are developed during the *S. schenckii* infection in mice (8-13) and that type 1 helper T (Th1) and Th2 responses are elicited in an antigen-specific manner against cell-wall antigens of this fungus (14). More recently, we showed that the *S. schenckii* systemic mice infection induces the development of a protective Th17 response, featuring both Th17 and Th17/Th1 cells and the augmented *ex vivo* release of interleukin (IL)-17 and IL-22 (15). We also showed that the passive transference of sera from mice immunized with Al(OH)₃-adjuvanted *S. schenckii* cell-wall proteins can induce protection in a subsequent challenge with the fungus (16).

The innate recognition of pathogens by pattern recognition receptors (PRRs) shapes the following adaptive immune response, thus playing a critical role in determining the outcome of the infection (17). To prevent pathogen invasion, PRRs survey the intra and extracellular space and play a critical role in the innate immune response by recognizing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and damage-associated molecular patterns (DAMPs) (18). Therefore, the recognition of *S. schenckii* by toll-like receptors (TLRs) 2 and 4 has been associated with the induction of pro-inflammatory cytokines and other mediators (19-22). Thus, there is a reason to believe that other PRRs participate in the host immune response against *S. schenckii*.

Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs), given their cytoplasmic localization, act as a second line of defence to the host (23). Members of this receptor family act as the PAMP- or DAMP-recognizing part of a multi-protein complex called inflammasome (24, 25). The NOD-like receptor family pyrin domain

90 containing 3 (NLRP3) inflammasome emerged as the most versatile due to its broad
91 specificity, allowing it to trigger an immune response against many different pathogens,
92 including important protective roles against *Candida albicans* (26-28), *Aspergillus*
93 *fumigatus* (29), *Cryptococcus neoformans* (30), and *Paracoccidioides brasiliensis* (31,
94 32).

95 After PAMP recognition, NLRP3 receptors bind to the adaptor molecule Apoptosis-
96 associated Speck-like protein containing a Caspase recruitment domain (ASC) and
97 caspase-1, forming the NLRP3 inflammasome. When activated, this molecular complex
98 promotes the maturation of pro-IL-1 β and pro-IL-18 into their respective active forms
99 through caspase-1-mediated cleavage (33, 34). IL-1 β and IL-18, in turn, contribute to
100 host defence against fungal infections by increasing the antimicrobial capacity of
101 phagocytes and initiating adaptive immune responses (28). Recently, we reported that
102 peritoneal macrophages from *S. schenckii* infected mice display reduced caspase-1
103 activity and diminished secretion of IL-1 β and IL-18, thus suggesting the involvement
104 of inflammasome-triggered responses in sporotrichosis (35). In addition to inducing the
105 production of pro-inflammatory cytokines, the inflammasome protects the host from
106 invading pathogens through pyroptosis, a caspase-1-regulated highly inflammatory cell
107 death (36, 37).

108 Due to its protective role in various infections, the NLRP3 inflammasome has been a
109 promising target for the development of new therapeutic strategies against such
110 infections. However, there is not a single study exploring the inflammasome-fungus
111 relationship with respect to sporotrichosis. Therefore, in this study, we aimed to address

the role played by the NLRP3 inflammasome in the *S. Schenckii* systemic infection in mice.

Materials and Methods

Animals

Male 6- to 7-week-old NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-}, and caspase-1^{-/-} mice, plus strain-matched WT (C57BL/6) mice, were obtained from the Isogenic Breeding Unit of the Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil. The animals were housed in individually ventilated cages in an ambient and controlled temperature and 12-hour light/dark cycles. Clean water and food were offered ad libitum. All animal procedures were performed according to the guidelines of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and were approved by the research ethics committee of Araraquara's School of Pharmaceutical Sciences from UNESP University (protocol no 17/2013).

Microorganism and culture conditions

S. schenckii sensu stricto ATCC 16345, originally obtained from a human case of diffuse lung infection (Baltimore, MD) and kindly provided by the Oswaldo Cruz Foundation (Rio de Janeiro, Brazil), was used for all experiments. For mice infection and preparation of the alkali-insoluble fraction 1 (F1), a piece of the fungal mycelium grown on Mycosel (BD Biosciences) agar tubes was transferred to an Erlenmeyer flask containing 100 mL of brain-heart infusion broth (Difco) and then cultured for 7 days at 37 °C with constant shaking at 150 rpm. Then, an aliquot containing 10⁷ yeast cells was transferred to a fresh medium and cultured for 5 more days under the same conditions to

achieve a virtually 100% mycelium-to-yeast conversion in a logarithmically growing culture.

Experimental design

Animals were intraperitoneally inoculated with 10^6 *S. schenckii* yeast cells in sterile PBS, pH 7.4 (hereafter, PBS) or an equal volume of PBS alone and then euthanized at 7, 14, and 21 days post-inoculation (dpi).

F1 preparation

F1 was isolated by repeated alkaline extraction. Briefly, *S. schenckii* yeasts were suspended in 1 N NaOH, gently stirred for 1 h at room temperature and then centrifuged at 5,000 xg for 10 min. The above procedure was repeated four times, and the resulting supernatants were combined. The alkali-insoluble sediment was washed with water until it reached a pH of 7.0 and was then washed with pure ethanol, acetone, and diethyl ether, in that order. F1 was re-suspended in RPMI-1640 complete medium (RPMI-1640C, defined as the base RPMI-1640 medium containing 20 μ M of 2 β -mercaptoethanol, 100 U/mL of penicillin and streptomycin, 2 mM of L-glutamine and 5% fetal calf serum) and sonicated until a homogeneous solution was obtained.

Assay for CFUs

Assessment of the fungal burden was performed through CFU recovery from the spleen by plating an aliquot of the macerate of the organ into Mycosel agar. Spleens were aseptically collected and passed through a 100 μ m cell strainer into a Petri dish

containing 2 mL of PBS with the aid of a syringe plunger. The plates were counted after 4 days of incubation at ambient temperature.

Histopathological analysis

Spleens were removed, fixed in 10% formalin for 48 h and then embedded in paraffin. Tissue sections (5 mm) were subjected to the Gomori-Grocott staining using standard protocols (Easy Path) to allow visualization of the silver-impregnated yeasts. Each spleen was scored according to the degree of fungus presence as follows: no fungus presence = 0; low fungus presence = 1; moderate fungus presence = 2; high fungus presence = 3; extreme fungus presence = 4. Photos were taken with an optical microscope (Leica DM2500) at 400x magnification using the Leica Application Suite 3.8 software.

Splenic parameters

Spleens were aseptically collected, weighed on a precision scale (Boeco, Germany) and measured with the aid of a digital caliper (Mitutoyo Sul Americana LTDA, Brazil) for calculation of the splenic index (length x width x diameter).

Peritoneal macrophages

Peritoneal exudate cells were elicited by intraperitoneally inoculating mice with 3% thioglycolate 3 days prior to cell harvest in cold PBS. After washing once with PBS, macrophages were differentially counted in a Neubauer chamber and adjusted to 5×10^6 cells/mL in RPMI-1640C. Non-adherent cells were removed by incubating the cell suspension in tissue culture plates for 1 h at 37 °C and 5% CO₂ and then discarding the

supernatant; the remaining adherent cells were incubated at 37 °C, 5% CO₂ for 24 h and used for the subsequent experiments.

Total splenocytes

Spleens were aseptically removed and passed through a 100 µm cell strainer into a Petri dish containing 2 mL of PBS with the aid of a syringe plunger. For red cell lysis, 6 mL of a 0.17 M ammonium chloride solution was added to the resulting suspension and then incubated on ice for 5 min. Splenocytes were then separated from the supernatant by centrifugation at 300 × g for 5 min at 4 °C, washed once with 3 mL of RPMI-1640C and then resuspended in 1 mL of the same medium. Cell concentration was determined by microscopy using the Trypan blue exclusion test and then the splenocytes were adjusted to 10⁷ cells/mL in RPMI-1640C.

Cytokines

Peritoneal macrophages were cocultured with splenocytes at a ratio of 1:2 for 24 h at 37 °C and 5% CO₂ on flat-bottom 48-well tissue culture plates in the presence of F1 (31.25 µg/mL in RPMI-1640C). Final concentrations were 2.5 × 10⁶ peritoneal macrophages/mL and 5 × 10⁶ splenocytes/mL. Lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* 0111 B (5 µg/mL in RPMI-1640C) and Concanavalin A (ConA) (0.25 µg/mL in RPMI-1640C) were used as positive controls. RPMI-1640C alone was used as negative control. IL-1β, IL-17, IL-18, and IFN-γ were measured in the supernatant using standard sandwich ELISA (eBioscience) according to the manufacturer's recommendations.

Detection of activated caspase-1

Peritoneal macrophages (10^6 cells/well) were obtained as described above and stained with a caspase-1 fluorescent-labelled inhibitor of caspases (FLICA) kit (Immunochemistry Technologies) according to the manufacturer's instructions. Pyroptotic cells were defined as those showing concomitant caspase-1 activation and cell death (FLICA+PI+ cells). Flow cytometric analysis was performed in a BD Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences) and the flow cytometer's proprietary software. At least 60,000 events were effectively included in each analysis.

Phenotyping

The splenocytes were stained with the following Abs specific for flow-cytometric analysis: anti-CD3 FITC (clone 17A2), anti-CD4 APC (clone RM4-5), anti-CD25 PE (clone PC61-5), anti-T-bet PerCP-cy5.5 (clone eBio4B10), anti-ROR γ t PE (clone B2D), anti-Foxp3 PE-Cy7 (clone FJK-16s); all from eBiosciences. For all staining procedures, only freshly isolated, unstimulated splenocytes were used. Splenocytes were assessed for the frequency of Th17 (CD3+CD4+ROR γ t+), Th1/Th17 (CD3+CD4+T-bet+ROR γ t+), Th1 (CD3+CD4+T-bet+), Th1 (CD3+CD4+T-bet+), and T regulatory (Treg) (CD3+CD4+CD25+Foxp3+) cells. Briefly, the cells were stained for the extracellular markers, then fixed and permeabilized using eBiosciences' intracellular fixation & permeabilization buffer set, and then stained for the transcription factors T-bet, ROR γ t, and Foxp3. The events were acquired using a BD Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences) and analysed with the flow cytometer's proprietary software. At least 100,000 events were effectively included in each analysis.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed in GraphPad Prism ver. 6.01 by applying Student's *t*-test or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post test as indicated. Differences were considered statistically significant when $p \leq 0.05$. The data are expressed as the means $\pm$ SD.

Results

The NLRP3 inflammasome has a protective role in the *S. schenckii* infection

To address the role of the inflammasome in the *S. schenckii* infection, we first determined the fungal load in the spleens of *S. schenckii*-infected ASC^{-/-}, caspase-1^{-/-}, NLRP3^{-/-} and WT mice. ASC^{-/-} mice exhibited higher load than the WT only at 7 dpi, while caspase-1^{-/-} mice had higher load at 7 and 21 dpi (Figure 1A). Additionally, histological analysis corroborated the above results, showing a greater number of yeasts in the spleens of ASC^{-/-} mice at 7 dpi and of caspase-1^{-/-} mice at 7 and 21 dpi (Figures 1B and C). Interestingly, at 14 dpi, both ASC^{-/-} and caspase-1^{-/-} mice showed a similar fungal load to the WT. However, the fungal load in the spleens of NLRP3^{-/-} mice was higher than in WT at all time-points but especially at 7 dpi (Figure 1A). As before, these results were corroborated by histological analysis, except at 14 dpi (Figures 1B and 1C). Furthermore, despite the impaired capacity to eliminate the fungus, all the knockout (KO) animals, similarly to the WT animals, were able to survive and eliminate the infection at 35 dpi.

Inflammasome favours the inflammatory response in spleen during the *S. schenckii* infection

We determined the weight of the spleen and the splenic index as an indirect measure of the level of inflammatory response. A difference in spleen weight was noted only at 21 dpi among infected mice, with NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-}, and caspase-1^{-/-} mice showing a similarly lower weight increase as compared with the WT (Figure 2A). The splenic index, however, was lower for mice from all three KO groups at 14 and 21 dpi (Figure 2B and 2C). Among the uninfected control animals, there was no difference either in the weight of the spleen or the splenic index between the WT and KO mice throughout the study.

The protective effect of the inflammasome may be linked to IL-1 β and IL-17 production. The inflammasome activity results in IL-1 β and IL-18 production from their inactive precursors, the pro-IL-1 β and pro-IL-18; therefore, we measured the *ex vivo* release of these cytokines by F1-stimulated macrophage-splenocyte cocultures. Upon infection, IL-1 β release by the cells from all three KO groups was markedly diminished when compared to the WT throughout the studied period (Figure 3A). In accordance with the above, *S. schenckii*-infected ASC^{-/-} and caspase-1^{-/-} mice showed a reduced IL-17 release as compared with the WT throughout the studied period (Figure 3B). However, the infected NLRP3^{-/-} mice showed a diminishment in IL-17 as compared with the WT at only 14 dpi. On the other hand, IL-18 release by cells from all KO groups was markedly diminished as compared with the WT at only 7 dpi, except for ASC^{-/-} mice, which showed impaired IL-18 release also at 21 dpi (Figure 3C). Regardless, IFN- γ release from all KO groups was unaffected throughout the study period (Figure 3D). The release of all cytokines by cells from the uninfected control mice was extremely low to non-detectable.

Active caspase-1 expression and cell death by pyroptosis are increased during the *S. schenckii* infection

The activation of the NLRP3 inflammasome requires caspase-1, a proteolytic enzyme linked to a cell death process called pyroptosis; thus, we decided to assess this enzyme in peritoneal macrophages during the *S. schenckii* infection. Although the frequency of active caspase-1-expressing macrophages was similar among all the KO and WT mice at 7 dpi (Figure 4A), the expression of this enzyme (as measured by its median fluorescence intensity - MFI) was significantly lower in the cells of the KO animals (Figure 4B). Accordingly, *S. schenckii*-infected NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-}, and caspase-1^{-/-} mice showed a similarly lower frequency of pyroptotic cells (active caspase-1-expressing dead cells) as compared to the WT at 7 dpi (Figure 4C). A low frequency of active caspase-1-expressing live and dead cells was found among the control uninfected KO or WT mice throughout the study.

Th17 and Th1/Th17 cell development are impaired in the absence of inflammasome activity

Next, we decided to address whether the inflammasome had a role in the development of Th17 (T-bet-RORγT⁺), Th17/Th1 (RORγT⁺T-bet⁺), and Th1 (T-bet⁺RORγT⁻) cells during the *S. schenckii* infection. We found a higher frequency of all the three cell types in the spleen during *S. schenckii* infection in WT mice. However, the infected ASC^{-/-} mice had a lower frequency of Th17 cells as compared with the WT at only 7 dpi, whereas NLRP3^{-/-} and caspase-1^{-/-} mice did it at both 7 and 21 dpi (Figure 5A). Statistical analysis showed no significant difference in the frequency of Th17 cells among the infected mice at 14 dpi, although it is noteworthy that the frequency of these

cells in NLRP3^{-/-} mice was very similar to that of the WT. In general, the frequency of Th17/Th1 cells was higher than that of Th17 cells in *S. schenckii*-infected WT mice, although the development of Th17/Th1 cells was the most impaired in all the KO groups (Figure 5B). Th1 cells, however, were found at similar frequencies between WT and KO mice throughout the study (Figure 5C). Among uninfected control animals, there was no difference in the frequency of either cell type between the WT and KO mice throughout the study.

Treg cell development is favoured in the absence of NLRP3 during the *S. schenckii* infection

Given that the various Th cell subtypes show cross-regulation and the impaired development of both Th17 and Th17/Th1 cells in the *S. schenckii*-infected KO mice, we decided to determine the frequency of Treg cells in these animals. ASC^{-/-} and caspase-1^{-/-} mice showed a similar frequency of Treg cells as compared to the WT throughout the studied period (Figure 6A). Interestingly, the NLRP3^{-/-} mice had an increased frequency of these cells as compared with the WT at 14 dpi (Figure 6A). There was no difference in the frequency of Treg cells between the WT and KO mice among uninfected control animals throughout the study.

Discussion

Inflammasome assembly requires the activation of an upstream sensor, a downstream effector and, in most cases, an adaptor molecule, such as ASC. Depending on whether ASC is required, inflammasomes can be categorized into ASC-dependent and ASC-independent (38), the latter being represented by complexes lacking an adaptor with

NLRP1b as the sensor (39) or assembled with NLRC4 instead of ASC (40). Additionally, inflammasomes can be divided into canonical and non-canonical based on the activation of caspase-1 or -11 (caspase-1, or -4 and -5 in humans), respectively. In non-canonical inflammasomes, caspase-1 activation occurs indirectly through caspase-11 (23, 33). The engagement of NLRP3 by a PAMP leads to the recruitment of ASC, resulting in the cleavage of pro-caspase-1 into its active form (41). However, ASC also interacts with other sensors, such as NLRP6 (42), NLRP10 (43), and AIM2 (absent in melanoma 2) (44).

The NLRP3 inflammasome is the most widely characterized, and various studies show its importance in the antifungal immune response (26-32); thus, we decided to assess its relevance in the development of the immune response against *S. schenckii*. We found that the absence of the inflammasome components ASC and caspase-1 results in an impaired control of the *S. schenckii* infection by the host, which was more pronounced in caspase-1^{-/-} mice in the late stage of the infection. These data suggest that caspase-1 modulates additional mechanisms that maybe related to ASC-independent inflammasomes, which would be involved in the development of a protective immune response late in the infection. In turn, ASC-dependent inflammasomes seem to be more important at the beginning of the infection, supposedly owing to their role in modulating important early mechanisms, whereas the development of an adaptive immune response or other late mechanisms could overcome the impaired fungal control in ASC^{-/-} mice. Similarly, NLRP3^{-/-} mice showed an equally impaired capacity to control the infection compared to the caspase-1^{-/-} ones. These data support a protective role for NLRP3 in the *S. schenckii* infection from its early to late stages.

During infection, the development of inflammatory response is evident from the increase in weight and size of the spleen, because this organ plays a fundamental role in pathogen elimination and hence is subjected to augmented cell infiltration and exudate production (45, 46). In the absence of NLRP3, ASC or caspase-1, the impaired inflammatory response is clearly noted by a lower splenic index in all KO groups as compared with WT throughout the study, suggesting that inflammasome-driven responses contribute to the development of inflammatory responses during *S. schenckii* infection.

The end point of inflammasome activation is the production of the fully mature inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18. These cytokines are produced as inactive precursors that undergo caspase-mediated cleavage to yield biologically active molecules. Although inflammasome activity is associated with innate immunity, the production of functionally mature IL-1 β and IL-18 influence the outcome of the adaptive immunity, thus, affecting Th17 and Th1 responses, respectively (28, 47). As expected, the IL-1 β release in all the KO groups (NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-}, and caspase-1^{-/-}) was markedly diminished, suggesting the inflammasome-driven release of this cytokine during the *S. schenckii* infection is exclusively dependent on the NLRP3 inflammasome. These results together with the given role of IL-1 β in inducing IL-17 production together with IL-23 (48, 49) provide an explanation for the impaired IL-17 release in all the KO groups. The release of IL-18, in turn, was diminished in all the KO groups only at 7 dpi, thus suggesting that IL-18 production during early but not later stages of infection was dependent on the activation of the NLRP3 inflammasome. Nevertheless, KO mice could maintain a sustained IFN- γ release at 7 dpi despite the lack of IL-18, a cytokine known for its IFN- γ -inducing properties together with IL-12 or IL-15. This

result can be attributed to the residual IL-18 levels and other IFN- γ -inducing cytokine combinations such as IL-12 plus IL-1 β , IL-15, IL-2 or TNF- α (50). Lastly, the inflammasome-independent IL-18 production found in our model could be explained by the pro-IL-18-cleaving activity of proteases other than caspase-1, either intra (e.g., by chymase in mast cells and granzyme B in cytotoxic T cells, NK cells, and neutrophils) (51) or extracellularly (likely by neutrophil proteases acting on the pro-IL-18 released from dying cells) (52).

A diminished release of IL-1 β and IL-17 accompanied the impaired control of the infection, suggesting that these cytokines may contribute to the protective effect of the inflammasome, including the NLRP3 inflammasome, in the *S. schenckii* infection. IL-17 is produced by Th17 cells, among others, and it plays a protective role in various fungal infections by inducing inflammation (53, 54) as a result of the indirect activation of neutrophils, which occurs primarily through the upregulation of G-CSF and CXC chemokines in mucosal epithelial cells and the local stroma (55). The IL-17-dependent recruitment of neutrophils to the site of infection is likely an important element in host responses to *C. albicans* (56, 57), as is the induction of antimicrobial peptides (AMPs) at mucosal surfaces possessing direct antifungal activity towards *Candida* (58, 59).

However, we cannot discard the effects of the experimental conditions used in our findings. First, the *ex vivo* cultures were challenged with F1; thus, it is possible that the use of other antigen preparations or the whole yeast would change the PAMP profile which the cells were exposed to and, hence, the results. Although F1 is mostly composed of alkali-insoluble glucans (60), it can also contain PAMPs capable of engaging PRRs other than those forming the inflammasome and, therefore, affecting the

final cytokine response. Furthermore, β -glucans themselves are recognized by other PRRs, such as dectin-1, which has been reported to have a role in phagocytosis and the production of nitric oxide and Th17-inducing cytokines such as IL-1 β , IL-6, and IL-23 during fungal infections (61, 62). Second, the assessment of *in vivo* production instead of the *ex vivo* release of cytokines shall give a more direct perspective on the actual mechanisms at play in our model.

In addition to its role in the maturation of IL-1 β and IL-18, caspase-1 can trigger inflammation through the initiation of pyroptosis, an inflammatory cell death that results in the elimination of the infecting agent and the reinforcement of the immune response (63, 64). As expected, our results showed lower active caspase-1 expression and, consequently, a lower frequency of cells undergoing pyroptosis in the KO mice, thus suggesting that pyroptosis plays a role in the immune response against *S. schenckii*. Additionally, judging by the fact that the active caspase-1 expression was similar among all three KO groups, the activation of this protease through the inflammasome pathway during the *S. schenckii* infection appears to solely depend on the recognition of this fungus by NLRP3.

Th cells play critical roles in host defence and immune-mediated diseases through their ability to differentiate into specialized subsets. These subsets attain restricted patterns of cytokine secretion and specific expression of master transcription factors in response to microbial pathogens (65). IL-1 β can trigger Th17 cell differentiation while IL-23 is required for stabilizing and evoking a pathogenic T-bet⁺ROR γ t⁺ (Th1/Th17) phenotype in these cells independent of TGF- β (66, 67). We assessed the frequency of Th17 and Th1/Th17 cells in KO groups given the markedly diminished IL-1 β release in these

animals. A low frequency of both cell types and a diminished release of IL-17 was found in all three KO groups albeit with important timing differences, suggesting that the *S. schenckii* infection stage determines the requirement of the Th17 response for NLRP3-triggered mechanisms. Our findings lead us to believe that the inflammasome-derived mechanisms involved in controlling the *S. schenckii* infection are probably linked to the Th17 response, which is in accordance with the recently reported protective role of such response in this infection (15). Furthermore, it seems that the inflammasome-induced development of Th17 response in our model is partially due to its effect on IL-1 β .

Like WT, the KO mice despite their impaired ability to control the infection, could survive and eliminate the fungus. This may be partly related to the residual production of IL-17 and IFN- γ or due to other immune mediators not assessed in this study. Such mediators could take part in antifungal mechanisms whose role in the absence of the inflammasome may have been sufficient to allow the KO mice to eliminate the infection ultimately. For instance, a multitude of inflammasome-unrelated PRRs such as TLRs, CLRs (e.g., dectin-1 and -2) and others (e.g., CD14, CR, CD36, and galectin 3) are critical for the initial recognition and subsequent immune response against fungi displaying a PAMP profile similar to that of *S. schenckii* (68). Among these, TLR-2 and -4 have already been shown to have a role in the *S. schenckii* infection in mice (19-22). Other subsets of classical (e.g., innate lymphoid cells and NK cells) and non-classical immune cells (e.g., epithelial cells, endothelial cells, and platelets) may also play a crucial role in the orchestration of an efficient antifungal host response independently of the inflammasome (69).

Our findings are supported by a series of other studies showing a critical role for the inflammasome in host defence against many pathogenic fungi, ranging from survival enhancement to adaptive immunity development and cell infiltration into infected organs. In disseminated *Candida* infections, NLRP3, ASC, or caspase-1 deficiency has been shown to lead to increased susceptibility, mortality and fungal burden in several organs (26, 27, 70). Moreover, adaptive immune responses have also been linked to inflammasome activity in invasive candidiasis, manifesting as diminished Th1/Th17 responses followed by increased fungal outgrowth and lower survival in ASC^{-/-} and Casp-1^{-/-} mice (28). Other study showed that the NLRP3 inflammasome is essential for resistance against *P. brasiliensis* owing to its role in caspase-1 activation and further secretion of IL-1 β and IL-18 by *P. brasiliensis*-infected macrophages (32). Immune cell infiltration into the lung and effective clearance of *C. neoformans* were both dependent on the NLRP3 inflammasome (30), which was also implicated in aiding survival and promoting lung leukocyte infiltration and fungal clearance of mice intranasally infected with a low virulence acapsular strain of *C. neoformans* (71). Recently, Karki *et al.* (2015) showed that mice lacking both AIM2 and NLRP3 succumbed to *A. fumigatus* infection more rapidly than WT mice or mice lacking a single receptor because of the combined actions of caspase-1 and caspase-8 in processing the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 (72).

Treg cells are another Th cell population that plays an active suppressive role in the maintenance of immunological self-tolerance and immune homeostasis, but their role in protective immunity is not fully understood (73). Treg cells can powerfully promote the transition of naïve Th cells into Th17 cells producing the full suite of characteristic cytokines (74, 75) and, thus, may have an important antimicrobial role in immunity,

having been reported to participate in host protection against *C. albicans* (76). NLRP3^{-/-} mice were the only ones to show an altered (increased) frequency of Treg cells as compared with the WT but only at 14 dpi; this increase may have contributed to maintain the frequency of Th17 cells in NLRP3^{-/-} mice at this time-point. Although neither KO strain showed a statistically significant reduction in the frequency of Th17 cells at 14dpi, NLRP3^{-/-} mice were distinctly able to keep WT levels of this cell population.

In conclusion, our study shows that inflammasomes, especially those assembled with NLRP3, play a protective role in the *S. schenckii* infection. This protective role may be attributed to the triggering of pro-inflammatory mediators and Th responses along the IL-1 β -IL-17 axis, thus linking the innate recognition of the fungus to the following adaptive immune response. Our study paves the way for understanding the inflammasome-dependent mechanisms leading to the development of the immune response after the recognition of *S. schenckii*. Further research in this direction may be necessary to elaborate on our findings.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (grant numbers 2013/03190-5 and 2015/04023-0). Author contributions are as follow: A.C.G. designed and performed experiments, analyzed data, and wrote the manuscript. L.S.F. helped with data analysis and interpretation, writing, and translation of the manuscript. F.A.M., C M.Q.G.F., and M.C.P. performed experiments. C.R.A. helped with histopathological analysis. D.S.Z. provided us with the mice used in this study. I.Z.C. supervised the project.

Conflict of Interest

The authors declare no commercial or financial conflict of interest

References

1. Barros MBL, Almeida-Paes R, Schubach O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Clin Microbiol Rev.* 2011; **24**(4):633-54.
2. Oliveira MM, Almeida-Paes R, Gutierrez-Galhardo MC, Zancoppe-Oliveira RM. Molecular identification of the *Sporothrix schenckii* complex. *Rev Iberoam Micol.* 2014; **31**(1):2–6.
3. Rodrigues AM, Cruz Choappa R, Fernandes GF, de Hoog GS, de Camargo ZP. *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. *Fungal Biol.* 2016; **120**(2): 246-64.
4. Schubach A, Barros MB, Wanke B. Epidemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis.* 2008; **21**(2):129–33.
5. Chakrabarti A, Bonifaz A, Gutierrez-Galhardo MC, Mochizuki T, Li S. Global epidemiology of sporotrichosis. *Med Mycol.* 2015; **53**(1):3–14.
6. Barros MB, Schubach TP, Coll JO, Gremião, I. D.; Wanke B, Schubach A. Sporotrichosis: development and challenges of an epidemic. *Rev Panam Salud Publica.* 2010; **27**(6):455–60.
7. Carlos IZ, Sassa MF, Sgarbi DB, Placeres MC, Maia DC. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. *Mycopathologia.* 2009; **168**(1):1–10.

- 493 8. Carlos IZ, Sgarbi DB, Angluster J, Alviano CS, Silva CL. Detection of cellular
494 immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the
495 systemic form of the disease. *Mycopathologia*. 1992; **117**(3):139-44.
- 496 9. Carlos IZ, Zini MM, Sgarbi DB, Angluster J, Alviano CS, Silva CL. Disturbances
497 in the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor in disseminated murine
498 sporotrichosis. *Mycopathologia*. 1994; **127**(3):189-94.
- 499 10. Carlos IZ, Sgarbi DBG, Placeres MCP. Host organism defense by a peptide-
500 polysaccharide extracted from the fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*.
501 1999; **144**(1):9-14.
- 502 11. Carlos IZ, Sgarbi DB, Santos GC, Placeres MC. *Sporothrix schenckii* lipid inhibits
503 macrophage phagocytosis: involvement of nitric oxide and tumour necrosis factor-
504 alpha. *Scand. J. Immunol*. 2003; **57**(3), 214–20.
- 505 12. Carlos IZ, Ferreira LS, Gonçalves AC. Models of experimental sporotrichosis and
506 immune response against *Sporothrix schenckii*. In: Carlos, I.Z., Ed. Sporotrichosis.
507 New developments and future prospects. Switzerland: Springer International
508 Publishing. 2015; 103-31.
- 509 13. Maia DC, Gonçalves AC, Ferreira LS, Manente FA, Portuondo DL, Velloso
510 JC, Polesi MC, Batista-Duharte A, Carlos IZ. Response of Cytokines and Hydrogen
511 Peroxide to *Sporothrix schenckii* Exoantigen in Systemic Experimental Infection.
512 *Mycopathologia*. 2016; **181**(3-4):207-15.
- 513 14. Maia DC, Sassa MF, Placeres MC, Carlos IZ. Influence of Th1/Th2 cytokines and
514 nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*.
515 *Mycopathologia*. 2006; **161**(1):11–9.

15. Ferreira LS, Gonçalves AC, Portuondo DL, Maia DCG, Placeres MCP, Batista-Duharte A, Carlos IZ. Optimal clearance of *Sporothrix schenckii* requires an intact Th17 response in a mouse model of systemic infection. *Immunobiology*. 2015; **220**(8):985–92.
16. Portuondo DL, Batista-Duharte A, Ferreira LS, Martínez DT, Polesi MC, Duarte RA, de Paula e Silva ACA, Marcosa CM, de Almeida AMF, Carlos IZ. A cell wall protein-based vaccine candidate induce protective immune response against *Sporothrix schenckii* infection. *Immunobiology*. 2016; **221**(2):300–9.
17. Silva GK, Gutierrez FR, Guedes PM, Horta CV, Cunha LD, Mineo TW, Santiago-Silva J, Kobayashi KS, Flavell RA, Silva JS, Zamboni DS. Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol*. 2010; **184**(3):1148–152.
18. Guo H, Callaway JB, Ting JPT. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat med*. 2015; **21**(7):677-87.
19. Sassá MF, Satri AE, Souza LF, Ribeiro LC, Sgarbi DB, Carlos IZ. Response of macrophage Toll-like receptor 4 to a *Sporothrix schenckii* lipid extract during experimental sporotrichosis. *Immunology*. 2009; **128**(2):301-9.
20. Sassá MF, Ferreira LS, Ribeiro LCA, Carlos IZ. Immune response against *Sporothrix schenckii* in TLR-4-deficient mice. *Mycopathologia*. 2012; **174**(1):21-30.
21. Negrini TC, Ferreira LS, Alegranci P, Arthur RA, Sundfeld PP, Maia DCG, Spolidorio LC, Carlos IZ. Role of TLR-2 and fungal surface antigens on innate immune response against *Sporothrix schenckii*. *Immunol Invest*. 2013; **42**(1):36-48.

22. Negrini TC, Ferreira LS, Arthur RA, Alegranci P, Placeres MCP, Spolidorio LC, Carlos IZ. Influence of TLR-2 in the immune response in the infection induced by fungus *Sporothrix schenckii*. *Immunol Invest*. 2014; **43**(4):370-90.
23. Zoete MR, Palm NW, Zhu S, Flavell RA. Inflammasomes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014; **6**(12):a016287.
24. Zamboni DS, Lima-Junior DS. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. *Immunol Rev*. 2015; **265**(1):156-71.
25. Elliott EI, Sutterwala FS. Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly. *Immunol Rev*. 2015, **265**(1):35-52.
26. Joly S, Ma N, Sadler JJ, Soll DR, Cassel SL, Sutterwala FS. Cutting edge: *Candida albicans* hyphae formation triggers activation of the NLRP3 inflammasome. *J. Immunol*. 2009; **183**(6):3578–81.
27. Hise AG, Tomalka J, Ganesan S, Patel K, Hall BA, Brown GD, Fitzgerald KA. An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Host Microbe*. 2009; **5**(5):487–97.
28. van de Veerdonk FL, Netea MG, Dinarello CA, Joonsten LA. Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection. *Trends Immunol*. 2011; **32**(3):110-6.
29. Said-sadier N, Padilla E, Langsley G, Ojcius DM. *Aspergillus fumigatus* stimulates the NLRP3 inflammasome through a pathway requiring ROS production and the Syk tyrosine kinase. *PloS One*. 2010; **5**(4):e10008.
30. Guo C, Chen M, Fa Z, Lu A, Fang W, Sun B, Chen C, Liao W, Meng G. Acapsular *Cryptococcus neoformans* activates the NLRP3 inflammasome. *Microbes Infect*. 2014; **16**(10):845-54.

31. Tavares, A. H., Magalhães K. G., Almeida R. D., Correa R., Burgel P. H., and Bocca A. L.. NLRP3 inflammasome activation by *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; **7**(12):e2595.
32. Ketelut-carneiro N, Silva GK, Rocha FA, Milanezi CM, Cavalcanti-Neto FF, Zamboni DS, Silva JS. IL-18 triggered by the Nlrp3 inflammasome induces host innate resistance in a pulmonary model of fungal infection. *J Immunol*. 2015; **194**(9):4507-17.
33. Ulland TK, Ferguson PJ, Sutterwala FS. Evasion of inflammasome activation by microbial pathogens. *J Clin Invest*. 2015; **125**(2):469-77.
34. Saavedra PHV, Demon D, Gorp HV, Lamkanfi M. Protective and detrimental roles of inflammasomes in disease. *Semin Immunopathol*. 2015; **37**(4):313–22.
35. Gonçalves AC, Maia DC, Ferreira LS, Monnazzi LG, Placeres MC, Batista-Duharte A, Carlos IZ. Involvement of major components from *Sporothrix schenckii* cell wall in the caspase-1 activation, nitric oxide and cytokines production during experimental sporotrichosis. *Mycopathologia*. 2015; **179**(1-2):21-30.
36. Jorgensen I, Miao EA. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. *Immunol Rev*. 2015; **265**(1):130-42.
37. de Vasconcelos NM, van Opdenbosch N, Lamkanfi M. Inflammasomes as polyvalent cell death platforms. *Cell Mol Life Sci*. 2016; **73**(11-12):2335-47
38. Lu A, Wu H. Structural mechanisms of inflammasome assembly. *FEBS J*. 2015; **282**(3) :435–44.
39. Van Opdenbosch N, Gurung P, Vande Walle L, Fossoul A, Kanneganti TD, Lamkanfi M. Activation of the NLRP1b inflammasome independently of ASC-

mediated caspase-1 autoproteolysis and speck formation. *Nat Commun.* 2014;
5:3209.

40. Hu Z, Yan C, Liu P, Huang Z, Ma R, Zhang C, Wang R, Zhang Y, Martinon F,
Miao D, Deng H, Wang J, Chang J, Chai J. Crystal structure of NLRC4 reveals its
autoinhibition mechanism. *Science.* 2013; **341**(6142):172–5.

41. Jo EK, Kim JK, Shin DM, Sasakawa C. Molecular mechanisms regulating NLRP3
inflammasome activation. *Cell Mol Immunol.* 2016; **13**(2):148–59.

42. Anand PK, Kanneganti TD. NLRP6 in infection and inflammation. *Microbes
Infect.* 2013; **15**(10-11):661–8.

43. Zambetti LP, Laudisi F, Licandro G, Ricciardi-Castagnoli P, Mortellaro A. The
rhapsody of NLRPs: master players of inflammation...and a lot more. *Immunol
Res.* 2012; **53**(1-3):78–90.

44. Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey
DR, Latz E, Fitzgerald KA. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a
caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature.* 2009; **458**(7237):514–8.

45. Altamura M, Caradonna L, Amati L, Pellegrino NM, Urgesi G, Miniello S.
Splenectomy and sepsis: the role of the spleen the immune-mediated bacteria
clearance. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2001; **23**(2):153-61.

46. Mirkov I, Stojanovic I, Glamoclija, J., Stosic-Grujicic, S., Zolotarevski, L.,
Kataranovski D, Kataranovski M. Differential mechanisms of resistance to
sublethal systemic *Aspergillus fumigates* infection in immunocompetent BALB/c
and C57BL/6 mice. *Immunobiology.* 2011; **216**(1-2):234–42.

47. Richardson JP, Moyes D L. Adaptive immune responses to *Candida albicans*
infection. *Virulence.* 2015; **6**(4):327-37.

48. Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, Yang XO, Nurieva R, Kang HS, Ma L, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q, Dong C. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity*. 2009; **30**(4):576-87.
49. Espinosa V, Riveira A. Cytokines and the regulation of fungus-specific CD4 T cell differentiation. *Cytokine*. 2012; **58**(1):100–6.
50. Guo L, Junttila IS, Paul WE. Cytokine-induced cytokine production by conventional and innate lymphoid cells. *Trends Immunol*. 2012; **33**(12):598-606.
51. van de Veerdonk FL, Netea MG, Dinarello CA, Joonsten LA. Inflamassome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection. *Trends in Immunology*. 2011; **32**(3):110-6.
52. Novick D, Kim S, Kaplanski G, Dinarello C A. Interleukin-18, more than a Th1 cytokine. *Semin Immunol*. 2013; **25**(6):439–48.
53. Deepe GS Jr, Gibbons RS. Interleukins 17 and 23 Influence the Host Response to *Histoplasma capsulatum*. *J Infect Dis*. 2009; **200**(1):142–51.
54. Kagami S, Rizzo HL, Kurtz SE, Miller LS, Blauvelt A. IL-23 and IL-17A, but not IL-12 and IL-22, are required for optimal skin host defense against *Candida albicans*. *J Immunol*. 2010; **185**(9):5453–62.
55. Khader SA, Gaffen SL, Kolls JK. Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal Immunol*. 2009; **2**(5):403–11.
56. Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J. Infect. Dis*. 2004; **190**(3), 624–31.

57. Pietrella D, Rachini A, Pines M, Pandey N, Mosci P, Bistoni F, d'Enfert C, Vecchiarelli A. Th17 cells and IL-17 in protective immunity to vaginal candidiasis. *PLoS One*. 2011; **6**(7), e22770.
58. Gorr SU. Antimicrobial peptides of the oral cavity. *Periodontol 2000*. 2009; **51**:152–80.
59. Hernández-Santos N and Gaffen SL. Th17 cells in immunity to *Candida albicans*. *Cell Host Microbe*. 2012; **11**(5):425-35.
60. Previato JO, Philip AJ, Gorin RH, Travassos LR. Soluble and insoluble glucans from different cell types of the human pathogen *Sporothrix schenckii*. *Exper Mycol*. 1979; **3**(1): 92-105.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147597579800213>.
61. Dambuza IM, Brown GD. C-type lectins in immunity: recent developments. *Curr Opin Immunol*. 2015; **32**:21–7.
62. Pinke KH, de Lima HG, Cunha F, Lara VS. Mast cells phagocyte *Candida albicans* and produce nitric oxide by mechanisms involving TLR2 and Dectin-1. *Immunobiology*. 2016; **221**(2):220-7.
63. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbial*. 2009; **7**(2):99-109.
64. Winkler S, Rösen-Wolff A. Caspase-1: an integral regulator of innate immunity. *Semin Immunopathol*. 2015; **37**(4):419–27.
65. Nakayamada S, Takahashi H, Kanno Y, O'Shea JJ. Helper T cell diversity and plasticity. *Curr Opin Immunol*. 2012; **24**(3): 297–302.
66. Lee Y, Kuchroo V. Defining the functional states of Th17 cells. *F1000Res*. 2015. **4**:132.

67. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4+T Cells: Differentiation and Functions. *Clin Dev Immunol.* 2012; 2012:925135.
68. Erwig LP and Gow NA. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nat Rev Microbiol.* 2016; **14**(3):163-76.
69. Becker KL, Ifrim DC, Quintin J, Netea MG, van de Veerdonk FL. Antifungal innate immunity: recognition and inflammatory networks. *Semin Immunopathol.* 2015; **37**(2):107–16.
70. Gross O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Hanneschläger N, Endres S, Hartmann G, Tardivel A, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Mocsai A, Tschopp J, Ruland J. Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature.* 2009; **459**(7245):433-6.
71. Lei G, Chen M, Li H, Niu JL, Wu S, Mao L, Lu A, Wang H, Chen W, Xu B, Leng Q, Xu C, Yang G, An L, Zhu LP, Meng G. Biofilm from a clinical strain of *Cryptococcus neoformans* activates the NLRP3 inflammasome. *Cell Res.* 2013; **23**(7): 965–8.
72. Karki R, Man SM, Malireddi RK, Gurung P, Vogel P, Lamkanfi M, Kanneganti TD. Concerted activation of the AIM2 and NLRP3 inflammasomes orchestrates host protection against *Aspergillus* infection. *Cell Host Microbe.* 2015; **17**(3):357-68.
73. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int immunol.* 2009; **21**(10):1105–11.

74. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF-beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006; **24**(2):179–89.
75. Xu L, Kitani A, Fuss I, Strober W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3-T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol*. 2007; **178**(11):6725–9.
76. Pandiyan P, Conti HR, Zheng L, Peterson AC, Mathern DR, Hernández-Santos N, Edgerton M, Gaffen SL, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells promote Th17 cells in vitro and enhance host resistance in mouse *Candida albicans* Th17 cell infection model. *Immunity*. 2011; **34**(3):422–34.

Figure legends

Figure 1. Fungal burden. Mice were intraperitoneally inoculated with 10^6 *S. schenckii* yeast cells in PBS (infected) or PBS only (uninfected) and then euthanized on the indicated time-points for determination of the fungal burden. A: number of CFU recovered from the spleens. B: histological classification based on the number of silver-impregnated yeasts in Gomori-Grocott-stained spleen sections. C: representative photos of the Gomori-Grocott-stained spleen sections on day 7 post-inoculation. Original magnification x400. Statistical significance was determined by Student's *t*-test (A) or by two-way ANOVA using Bonferroni's post-test (B) and a 95% confidence interval. * ($p < 0.05$) and ** ($p < 0.01$) for comparisons with the WT group in each time-point. The results are presented as the individual values of 6 to 9 mice from three separate experiments (A) or as the mean $\pm$ SD of 4 mice from two separate experiments (B).

Figure 2. Splenic parameters. Mice were intraperitoneally inoculated with 10^6 *S. schenckii* yeast cells in PBS (infected) or PBS only (uninfected) and then euthanized on the indicated time-points for assessment of splenic parameters. A: weight of the spleen. B and C: splenic index. Statistical significance was determined by two-way ANOVA using Bonferroni's post-test and a 95% confidence interval. * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$), and **** ($p < 0.0001$) for comparisons with the WT group in each time-point. The results are presented as the mean $\pm$ SD of 5 mice from three separate experiments.

Figure 3. Cytokine release. Mice were intraperitoneally inoculated with 10^6 *S. schenckii* yeast cells in PBS (infected) or PBS only (uninfected) and then euthanized on the indicated time-points for assessment of the *ex vivo* cytokine release in the coculture of total splenocytes and peritoneal macrophages stimulated by F1. Supernatant-accumulated cytokines were measured by ELISA according to the manufacturer's instructions. A: *ex-vivo* release of IL-1 β . B: *ex-vivo* release of IL-17. C: *ex-vivo* release of IL-18. D: *ex-vivo* release of IFN- γ . Statistical significance was determined by two-way ANOVA using Bonferroni's post-test and a 95% confidence interval. ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$), and **** ($p < 0.0001$) for comparisons with the WT group in each time-point. The results are presented as the mean $\pm$ SD of 5 mice from three separate experiments.

Figure 4. Active caspase-1 expression and cell death by pyroptosis. Mice were intraperitoneally inoculated with 10^6 *S. schenckii* yeast cells in PBS (infected) or PBS only (uninfected) and then euthanized on the indicated time-points for assessment of active caspase-1 expression and pyroptotic cell death by peritoneal macrophages. A:

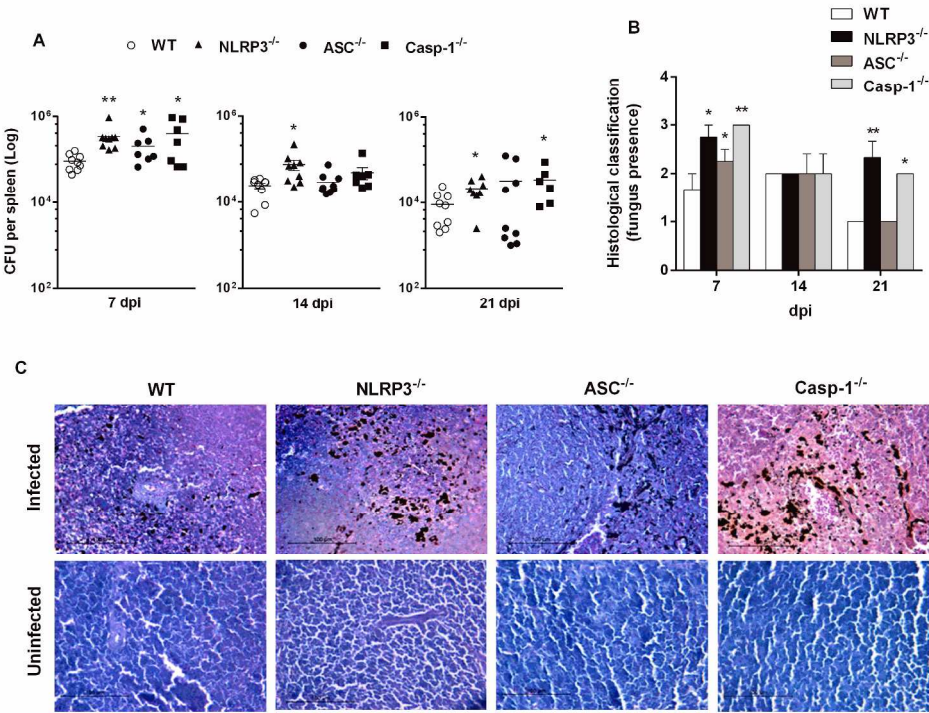
frequency of active caspase-1-expressing peritoneal macrophages. B: median fluorescence intensity of Flic^a peritoneal macrophages. C: frequency of peritoneal macrophages undergoing pyroptosis. D: representative plots from day 7 post-inoculation. Statistical significance was determined by two-way ANOVA using Bonferroni's post-test and a 95% confidence interval. * ($p < 0.05$) and ** ($p < 0.01$) for comparisons with the WT group in each time-point. The results are presented as the mean $\pm$ SD of 3 mice from two separate experiments.

Figure 5. Frequency of Th17, Th1/Th17 and Th1 cells in the spleen. Mice were intraperitoneally inoculated with 10^6 *S. schenckii* yeast cells in PBS (infected) or PBS only (uninfected) and then euthanized on the indicated time-points for assessment of the frequency of ROR γ T⁺, T-bet⁺ROR γ T⁺ and T-bet⁺ Th cells in the spleen. A, B and C: frequency of the indicated subsets. D: gating strategy. E: representative plots from day 21 post-inoculation. Statistical significance was determined by two-way ANOVA using Bonferroni's post-test and a 95% confidence interval. * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), and **** ($p < 0.0001$) for comparisons with the WT group in each time-point. The results are presented as the mean $\pm$ SD of 5 mice from three separate experiments.

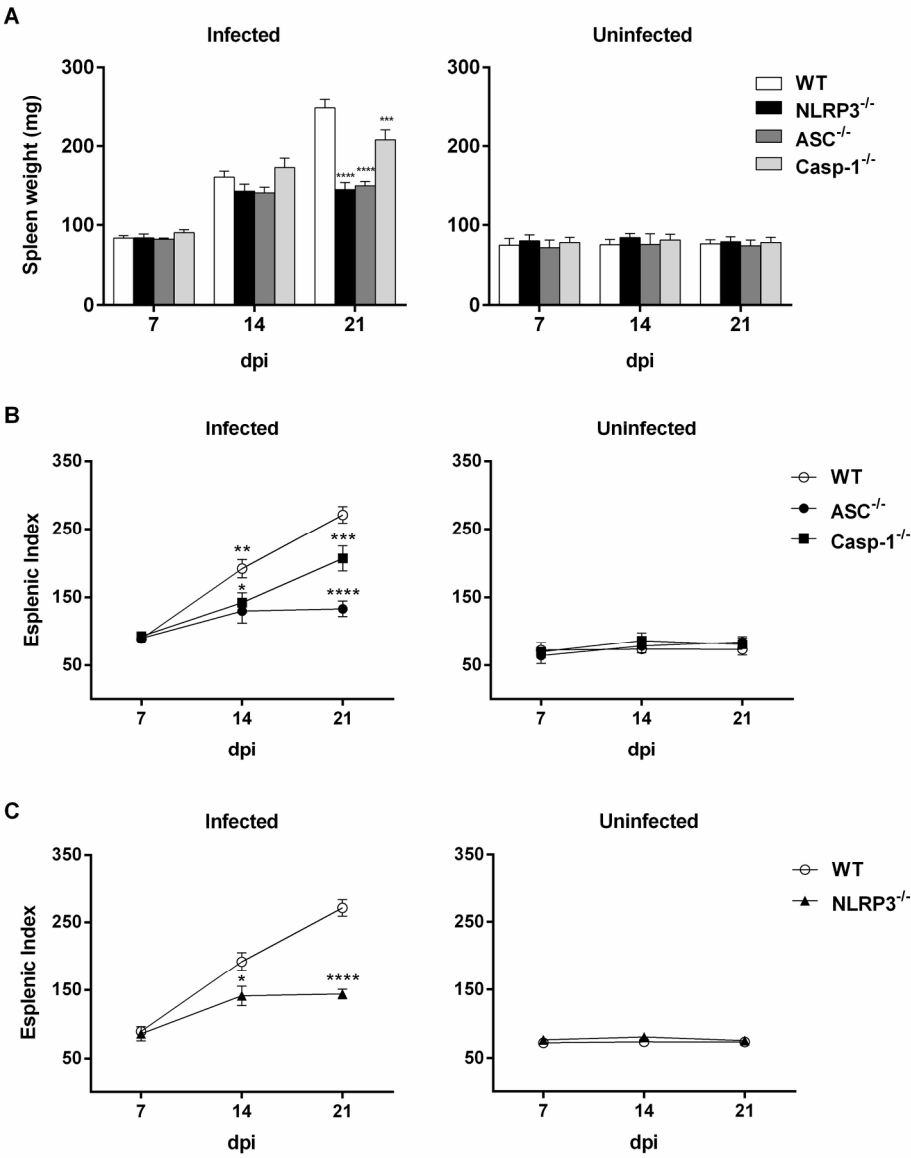
Figure 6. Frequency of Treg cells in the spleen. Mice were intraperitoneally inoculated with 10^6 *S. schenckii* yeast cells in PBS (infected) or PBS only (uninfected) and then euthanized on the indicated time-points for assessment of the frequency of CD25⁺Foxp3⁺ Th (Treg) cells in the spleen. A: frequency of Treg cells. B: gating strategy. C: representative plots from day 14 post-inoculation. Statistical significance was determined by two-way ANOVA using Bonferroni's post-test and a 95%

747 confidence interval. ** ($p < 0.01$) for comparison with the WT group in each time-point.

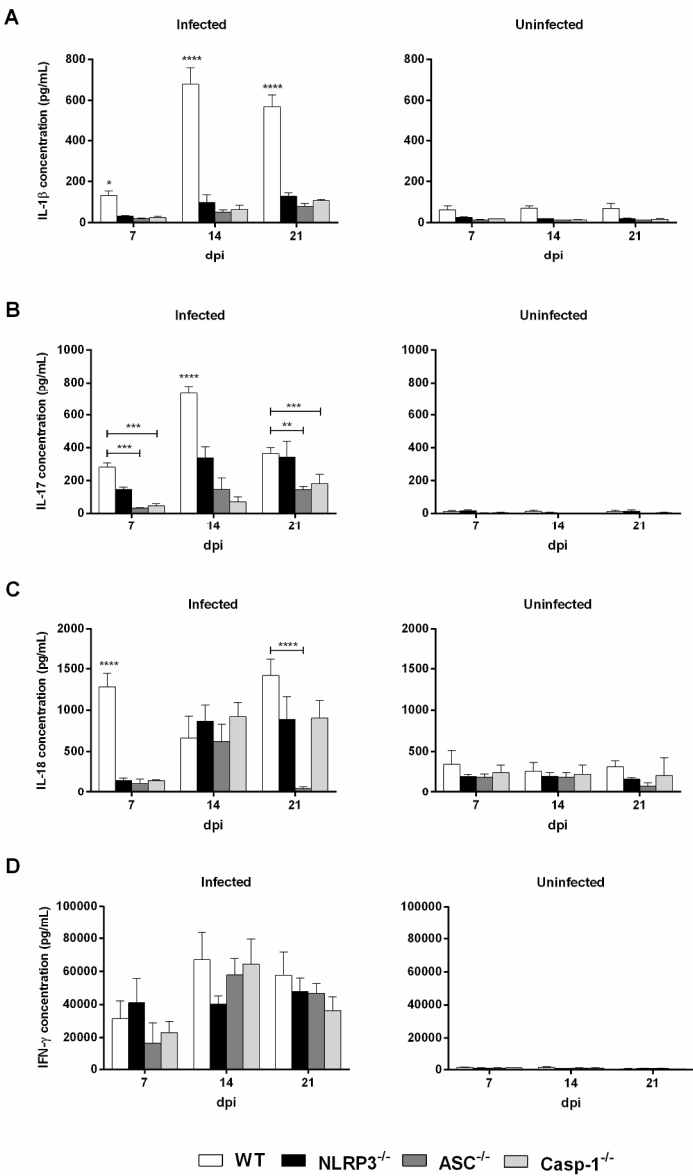
748 The results are presented as the mean $\pm$ SD of 5 mice from three separate experiments.



279x208mm (300 x 300 DPI)

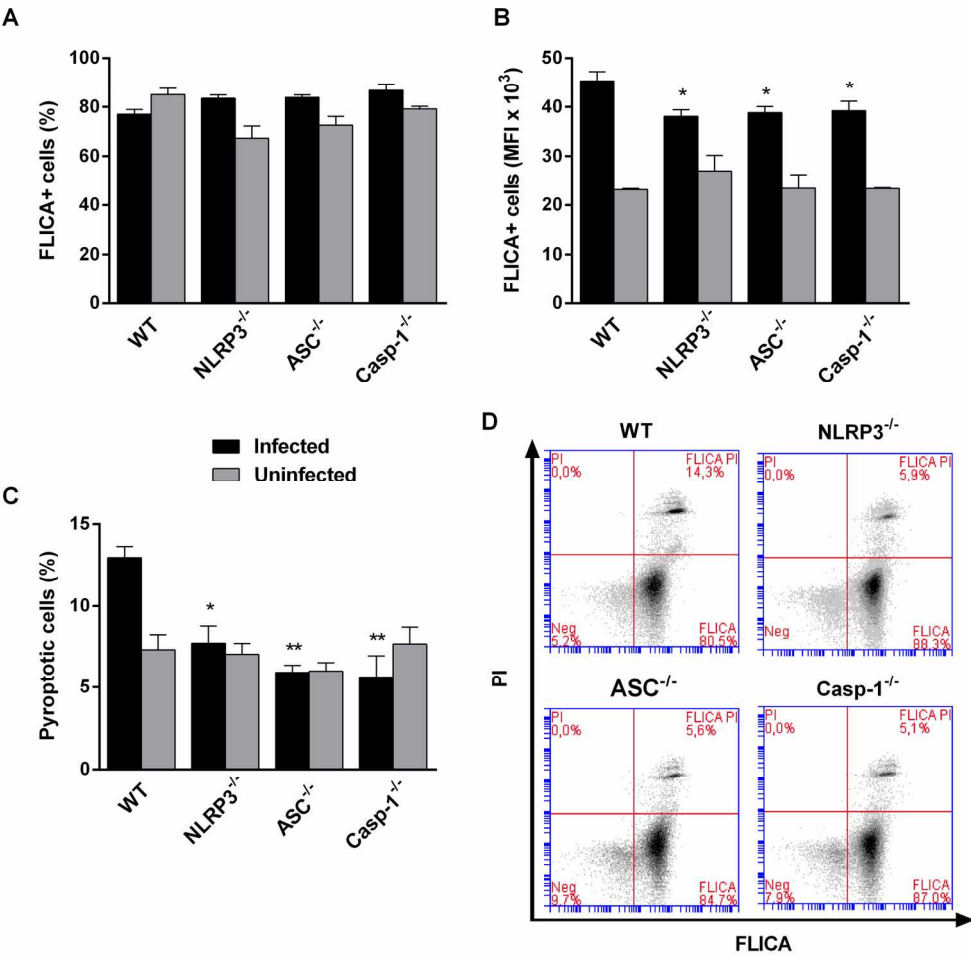


187x235mm (300 x 300 DPI)



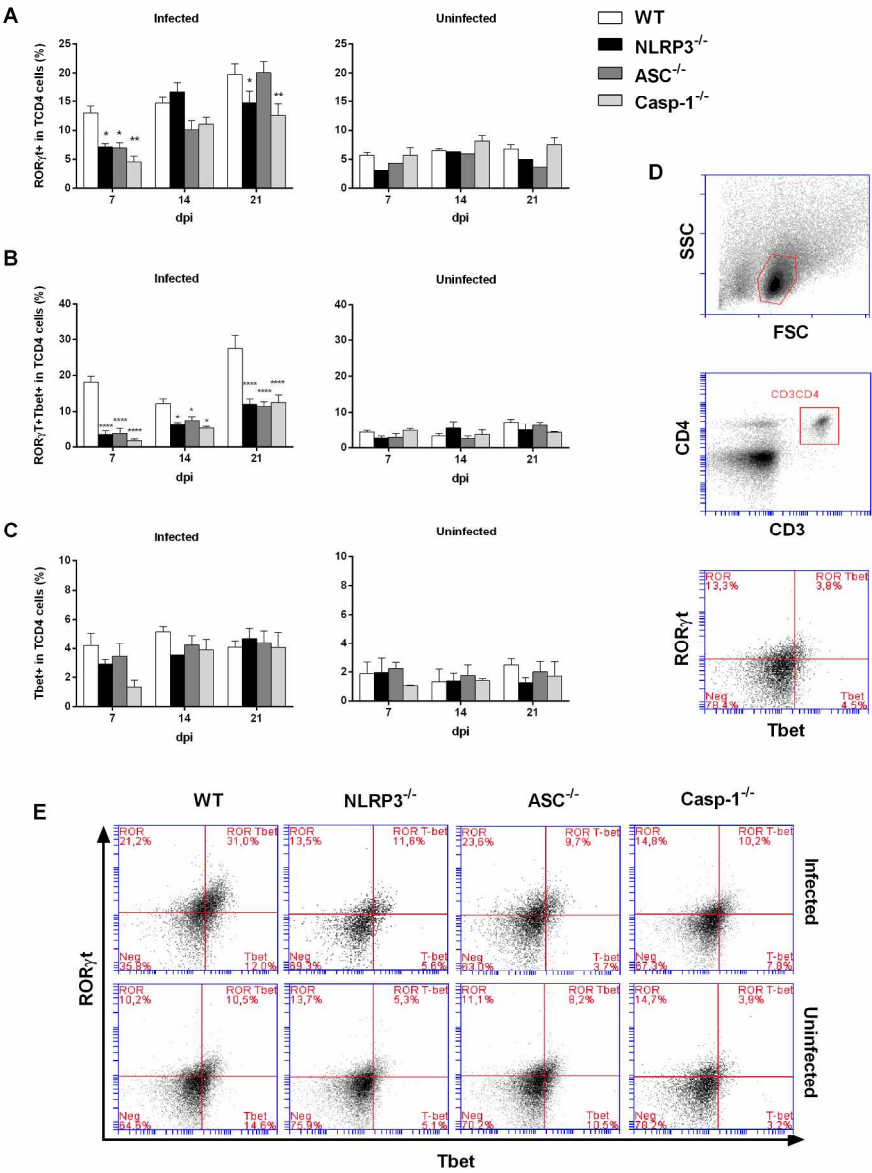
180x285mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



157x155mm (300 x 300 DPI)





209x279mm (300 x 300 DPI)

Protocolo CEUA/FCF/CAR nº 17/2013

Interessado: AMANDA COSTA GONÇALVES

Orientador: Profª Drª Iracilda Zeppone Carlos

Projeto: Papel do inflamassoma em infecção fúngica induzida por *Sporothrix schenckii*

Parecer nº 26/2013 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 19 de Junho de 2013, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: “Papel do inflamassoma em infecção fúngica induzida por *Sporothrix schenckii*”, apresentado pela Pós-graduanda Amanda Costa Gonçalves, sob orientação da Profª Drª Iracilda Zeppone Carlos, do Departamento de Análises Clínicas desta Faculdade, está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em JULHO de 2016, em formulário para este fim.

Araraquara, 27 de junho de 2013.



Profª Drª ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS
Vice-coordenadora da CEUA