Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas Campus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Biociências e
Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

FRANCINE ALESSANDRA MANENTE

Avaliação do imiquimode associado ao itraconazol como alternativa terapêutica na esporotricose experimental em camundongos imunossuprimidos e imunocompetentes

Araraquara
2017

FRANCINE ALESSANDRA MANENTE

Avaliação do imiquimode associado ao itraconazol como alternativa terapêutica na esporotricose experimental em camundongos imunossuprimidos e imunocompetentes

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista "Julio 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.

Orientador: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos
Coorientador: Prof. Dr. Alexander Batista Duharte

Araraquara
2017

Ficha Catalográfica
Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Manente, Francine Alessandra
M274a Avaliação do imiquimode associado ao itraconazol como alternativa terapêutica na Esporotricose experimental em camundongos imunossuprimidos e imunocompetentes / Francine Alessandra Manente. – Araraquara, 2017.
123 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas á Farmácia. Área de pesquisa em Imunologia.

Orientadora: Iracilda Zeppone Carlos.
Coorientador: Alexander Batista Duharte.

1. Imiquimode. 2. Itraconazol. 3. *Sporothrix schenckii.* 4. Imunossupressão. 5. Tratamento. I. Carlos, Iracilda Zeppone, orient. II. Duharte, Alexander Batista, coorient. III. Título.

CAPES: 40500005

FRANCINE ALESSANDRA MANENTE

Avaliação do imiquimode associado ao itraconazol como alternativa terapêutica na esporotricose experimental em camundongos imunossuprimidos e imunocompetentes

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, 08 de fevereiro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

IRACILDA ZEPPONE CARLOS

FILLIPE VIEIRA ROCHA

ORIVALDO PEREIRA RAMOS

PAULO INÁCIO DA COSTA

ANGELA MARIA VICTORIANO DE CAMPOS SOARES

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP) com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo 2015/04023-0) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por meio da concessão de Bolsa de Doutorado.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese às pessoas que sempre me apoiaram e estão ao meu lado em todas as horas e momentos, sendo eles bons e ruins. São as pessoas mais importantes na minha vida e que sempre incentivam minhas decisões. Dedico este trabalho a minha família: **Meu pai**, **Minha mãe** e **Meu irmão.** Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter me dado a minha vida, a oportunidade de estudar, de poder realizar este doutorado e tudo o que Ele me proporciona.

Agradecer aos meus pais Francisco e Nilcéia, ao meu irmão Francis e minha cunhada Karine por todo apoio e compreensão, mesmo quando a distância dói de saudades.

A minha orientadora Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos por me orientar, incentivar, apoiar, acreditar no meu potencial e ainda tenho que agradecer pela amizade que foi construída ao longo desses 4 anos.

Ao meu co-orientador prof Dr. Alexander Batista-Duharte por sempre me incentivar, tirar minhas dúvidas, me orientar e estar sempre presente para tudo que preciso.

A Marisa por me ajudar nos meus experimentos, pelos ensinamentos, por ser meu ombro amigo e por ser a técnica mais legal.

Aos meus colegas e amigos de laboratório: Amanda, Juliana, Maria Luiza, Camila, Carolina, Deivys e Damiana, e os alunos de Iniciação Científica: Renan, Matheus, Gabriela, Beatriz, Isabella, Camilla e Lívia pela ajuda nos experimentos, pelas conversas e pelas risadas.

Não poderia deixar de fazer um agradecimento especial ao Lucas por ser estar sempre pronto pra me ajudar em tudo, nos experimentos, pra corrigir minha qualificação, minha tese, meu artigo, além de ter se tornado um super amigo que eu posso sempre contar pra tudo.

Também não posso deixar de agradecer meu namorado Julio, que mesmo tendo entrado na minha vida há pouco tempo já faz toda diferença sempre me apoiando em tudo e me dando carinho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por meio da concessão de Bolsa de Doutorado e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Aos professores que fizeram parte da banca por terem aceitado o meu convite de participar da minha banca defesa e por contribuir para melhorar o trabalho.

E às pessoas que de uma forma ou outra, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

“Desejo que você
Não tenha medo da vida, tenha medo de não vivê-la.
Não há céu sem tempestades, nem caminhos sem acidentes.
Só é digno do pódio quem usa as derrotas para alcançá-lo.
Só é digno da sabedoria quem usa as lágrimas para irrigá-la.
Os frágeis usam a força; os fortes, a inteligência.
Seja um sonhador, mas una seus sonhos com disciplina,
Pois sonhos sem disciplina produzem pessoas frustradas.
Seja um debatedor de idéias. Lute pelo que você ama”

Augusto Cury

Capítulo 1

RESUMO

A esporotricose é uma importante micose com distribuição mundial que acomete seres humanos e animais. A infecção é causada geralmente por inoculação traumática de fungos do complexo *Sporothrix schenckii* (integrado por: *S. brasiliensis, S. globosa, S. luriei, S. schenckii stricto sensu* e *S. chilensis*), podendo apresentar-se sob as formas cutânea, linfocutânea e sistêmica, esta última sendo mais comumente observada em pacientes imunodeprimidos. As ferramentas terapêuticas atuais contra esporotricose requerem longos períodos de tratamento e estão associados a efeitos adversos frequentes, às vezes graves. O itraconazol é o medicamento de escolha para a esporotricose, porém as doses elevadas e longo período de tratamento podem causar efeitos colaterais. Por isso, há uma grande necessidade de desenvolver métodos mais efetivos e seguros para a terapia antifúngica, principalmente em pacientes imunodeprimidos. O imiquimode é um composto imunoestimulante que tem demonstrado ser efetivo na terapia contra tumores e infecções crônicas na pele. Além disso, tem mostrado atividade microbicida, incluindo antifúngica, porém não existem estudos avaliando seu efeito terapêutico na esporotricose. Nossos resultados apontam que foi possível observar que o imiquimode apresenta ação antifúngica direta e capacidade de inibir e desestruturar o biofilme de *S. schenckii*, porém quando associado com o itraconazol não houve um efeito sinérgico. Além disso, o imiquimode é capaz de induzir a produção de NO em macrófagos peritoneais e potencializar a atividade fungicida dessas células. No modelo utilizado, a carga fúngica se concentrou mais no linfonodo drenante e atingiu nível sistêmico em menor escala. Quando os animais foram imunossuprimidos com ciclofosfamida, houve redução da frequência de células T *helper* e citotóxicas e células B no baço, favorecendo a infecção localizada e sistêmica. Quando testado em um modelo de infecção subcutânea, em camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos, o tratamento com imiquimode associado ao itraconazol foi efetivo para o tratamento da doença apenas nos animais imunossuprimidos. Portanto, nossos resultados demonstram que o imiquimode associado ao intraconazol pode ser uma possível alternativa para o tratamento da esporotricose em pacientes imunossuprimidos.

Palavras-chaves: Imiquimode, Itraconazol, Imunossupressão, Tratamento, *Sporothrix schenckii*

ABSTRACT

Sporotrichosis is an important mycosis with a global distribution that affects humans and animals. The infection is usually caused by traumatic inoculation of fungi from the *Sporothrix schenckii* complex (composed of *S. brasiliensis, S. globosa, S. luriei, S. schenckii* stricto sensu and *S. chilensis*) and can manifest as a cutaneous, lymphatic or systemic disease, the latter being more commonly observed in immunocompromised patients. Current therapeutic tools against sporotrichosis require long periods of treatment and are associated with frequent, sometimes severe side effects. Itraconazol is the drug of choice for sporotrichosis, but the high doses and long treatment period can lead to side effects. Therefore, there is a strong need for the development of more effective and safer methods for antifungal therapy, especially in immunocompromised patients. Imiquimod is an immunostimulating compound that has been shown to be effective in therapy against tumors and chronic skin infections. In addition, it has shown microbicidal activity, including against fungi, but there are no studies evaluating its therapeutic effect on sporotrichosis. Our results indicate that imiquimod exhibits direct antifungal activity and the ability to inhibit and destructure the *S. schenckii* biofilm, but when imiquimod is used in combination with itraconazole there is no synergistic effect. In addition, imiquimod is able to induce NO production in peritoneal macrophages and potentiate the fungicidal activity of macrophages. In the model used, the fungal burden was higher in the draining lymph node, reaching systemic level at a lower degree. When animals were immunosuppressed with cyclophosphamide, there was a reduction in the frequency of helper and cytotoxic T cells and B cells in the spleen, favoring both local and systemic infection. When tested in a subcutaneous infection model in immunocompetent and cyclophosphamide-immunosuppressed mice, treatment with imiquimod associated with itraconazole was effective in treating the disease only in immunosuppressed animals. Therefore, our results demonstrate that imiquimod associated with intraconazole may be a possible alternative for the treatment of sporotrichosis in immunosuppressed patients.

Keywords: Imiquimod, Itraconazole, Immunosuppression, Treatment, *Sporothrix schenckii*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição mundial de casos de esporotricose. Fonte: Carlos e Batista-Duharte, 2015

Figura 2. Estrutura química itraconazol (**A**) e imiquimode (**B**).

Figura 3. Mecanismo de ação imiquimode. Fonte: Flutter *et al*., 2013.

Figura 4. Fluxograma experimental.

Figura 5. Esquema de infecção dos animais.

Figura 6. Esquema de imunossupressão dos animais com ciclofosfamida.

Figura 7. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

Figura 8. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

Figura 9. Formação de biofilme em placa

Figura 10. Avaliação da inibição da formação e desestruturação do biofilme em placa

Figura 11. Reação de formação de iminas.

Figura 12. Espectro de massas da mistura de imiquimode e itraconazol, por varredura de íons (210 – 1200 Da) por infusão direta (fluxo de 10uL/min).

Figura 13. Espectro de íons fragmentos de *m/z* 241 (imiquimode).

Figura 14. Espectro de íons fragmentos de *m/z* 705, referente ao itraconazol.

Figura 15. Determinação da presença de fagocitose nos macrófagos

Figura 16. Determinação da atividade fungicida de macrófagos

Figura 17. Determinação da atividade fungicida de macrófagos em animais imunocompetentes e imunossuprimidos.

Figura 19. Liberação de citocinas de cultura de macrófagos.

Figura 15. Produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais

Figura 20. Cinética da infecção.

Figura 21. Peso relativo do baço.

Figura 22. *Dot plots* representativos do *gate* de linfócitos totais

Figura 23. Avaliação da frequência de células T *helper*, T citotóxicas e B no baço e sangue.

Figura 24. Avaliação da susceptibilidade de animais imunossuprimidos à infecção por *S. schenckii*.

Figura 25. Determinação do peso relativo do baço e índice esplênico.

Figura 26. Peso relativo do timo.

Figura 27. Avaliação histológica do baço

Figura 28. Índice de inflamação da pata e avaliação histológica da presença de *S. schenckii* na pata.

Figura 29. Índice de inflamação das patas.

Figura 30. Avaliação histológica da presença de *S. schenckii* na pata.

Figura 31. Carga fúngica do baço e linfonodo.

Figura 32. Peso relativo do baço e índice esplênico de animais imunocompetentes e imunossuprimidos submetidos a diferentes tratamentos.

Figura 33. Liberação de citocinas *ex vivo* a partir de cultura de esplenócitos.

Figura 34. Avaliação da frequência de células Th no linfonodo.

Figura 35. Plots representativos da estratégia de gating da análise de FACS de células totais do linfonodo poplíteo

Figura 36. Avaliação da frequência de células Th expressando T-bet e RORγt no linfonodo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Inibitória Fracionada (CIF), Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) após a adição do Alamar Blue e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Tabela 2. Valores da Concentração inibitória mínima planctônica ($PCIM_{50}$) e Concentração inibitória mínima séssil ($SCIM_{50}$) do itraconazol e imiquimode, isolados ou associados, contra *S. schenckii*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ºC: graus Celsius

APC: *antigen-presenting cell*

BHI: *brain heart infusion*

CFM: concentração fungicida mínima

CIF: concentração inibitória fracionada

CIM: concentração inibitória mínima

CO_2: dióxido de carbono

CY: ciclofosfamida

DCs: células dendríticas

DNA: ácido desoxirribonucléico

EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid*

ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

ESI: *electrospray*

ExoAg: exoantígeno

FasL: Fas ligante

FMO: "fluorescence minus one"

FSC-H: *forward scatter – height*

Foxp3: "forkhead box P3"

g: força gravitacional

gp70: glicoproteína de 70 kDa

H&E: hematoxilina e eosina

HIV: vírus da imunodeficiência humana

ICIF: índice de concentração de inibição fracionada

i.p.: intraperitoneal

IFN: interferon

IL: interleucina

LPS: lipopolissacarídeo

mL: mililitro

mM: milimolar

MTT: brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio

NH_4Cl: cloreto de amônio

NK: “natural killer”

NO: óxido nítrico

PAMPs: *pathogen-associated molecular patterns*

pg: picogramas

PRRs: *pattern recognition receptors*

RORγt: *retinoic acid receptor-related orphan receptor γt*

s.c.: subcutâneo

T-bet: *T-box expressed in T cells*

Th: linfócito T *helper*

TLRs: *Toll-like receptors*

TNF-α: fator de necrose tumoral-α

UFC: unidades formadoras de colônia

µg: micrograma

µL: microlitro

µmols: micromols

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ILUSTRAÇÕES **12**

LISTA DE TABELAS **15**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS **16**

1. INTRODUÇÃO **20**

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **22**

2.1. Esporotricose 22

2.2. Mecanismos envolvidos na resposta imune contra *S. schenckii* 27

2.3. Modelos de infecção e imunossupressão 29

2.4. Tratamento para esporotricose 30

3. OBJETIVOS **33**

3.1. Objetivo geral 33

3.2. Objetivos específicos 33

4. MATERIAIS E MÉTODOS **34**

4.1. Animais 35

4.2. Microrganismo e condições de cultivo 35

4.3. Avaliação da atividade antifúngica 35

4.3.1. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) **36**

4.4. Avaliação da inibição da formação de biofilme 36

4.5. Espectrometria de massas com ionização por *Electrospray* 37

4.6. Obtenção e cultura de macrófagos peritoneais 37

4.6.1. Avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT **38**

4.6.2. Determinação de Óxido Nítrico (NO) **38**

4.7. Determinação da capacidade da atividade fungicida de macrófagos 39

4.8. Desenvolvimento do modelo de esporotricose experimental **40**

4.8.1. Padronização da infecção **40**

4.8.2. Padronização da imunossupressão **41**

4.8.3. Obtenção de sangue **42**

4.8.4. Obtenção de células do baço **42**

4.8.5. Histologia do baço e timo **42**
4.8.6. Determinação da carga fúngica **43**
4.9. Tratamento dos animais em estudo 43
4.9.4. Análise histológica da pata 45
4.10. Análise Estatística 45
5. RESULTADOS 46
5.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) 46
5.2. Avaliação de inibição da formação de biofilme em placa 47
5.3. Espectrometria de massas com ionização por *Electrospray* 49
5.4. Determinação da atividade fungicida de macrófagos 52
5.5. Determinação de NO 544
5.6. Desenvolvimento de modelo de esporotricose em camundongos imunossuprimidos e imunocompetentes 55
5.6.1. Padronização da infecção **55**
5.6.2. Padronização da imunossupressão **57**
5.7. Avaliação da eficácia do tratamento 64
6. DISCUSSÃO 75
7. CONCLUSÕES 81
8. REFERÊNCIAS 82

1. INTRODUÇÃO

O *Sporothrix schenckii*, que pertence ao complexo de espécies *S. schenckii*, conhecido como o agente etiológico da esporotricose, uma micose subcutânea aguda ou crônica em humanos e outros mamíferos (López-Romero *et al.*, 2011).

A infecção por *S. schenckii* é através da inoculação traumática, por materiais contaminados. Por muitos anos, essa infecção estava relacionada com homens adultos, devido a sua exposição em trabalhos com jardinagem, agricultura, mineração e pesca. Entretanto nos últimos anos, principalmente na região do estado do Rio de Janeiro, esta doença ganhou maior notoriedade pelo aumento do número de casos em mulheres de meia idade que haviam se contaminado através do contato com gatos portando esporotricose (Schubach *et al*., 2008; Ramos-e-Silva *et al*., 2007; Chakrabarti *et al*., 2015).

A esporotricose ocorre principalmente em regiões com climas tropicais e subtropicais, e tem sido relatada em vários países do mundo todo. Entretanto, a correta estimativa do número de casos de esporotricose é difícil, por não ser uma doença de notificação compulsória, cujos casos de que se tem conhecimento são aqueles notificados espontaneamente na literatura (Carlos e Batista-Duharte, 2015). Mais frequentemente a esporotricose se apresenta na forma linfocutânea, começando como uma lesão nodular ou ulcerada no local de inoculação do fungo e então evoluindo para uma série de lesões nodulares seguindo a trajetória dos vasos linfáticos regionais. A doença pode se apresentar ainda nas formas cutânea fixa, limitada ao local de inoculação do fungo, e disseminada, desenvolvida principalmente por pacientes imunocomprometidos. Formas extracutâneas também podem se desenvolver, mais comumente com comprometimento pulmonar e osteoarticular, embora haja relatos de disseminação hematogênica severa com o comprometimento de múltiplos órgãos (Lopes-Bezerra *et al*., 2006; Gutierrez-Galhardo *et al*., 2015).

A esporotricose uma doença que acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos, que pode desenvolver-se como uma doença muito grave disseminada com envolvimento visceral e osteoarticular, especialmente em pessoas com AIDS. O número crescente de relatos de infecção por *Sporothrix* em pacientes imunocomprometidos, principalmente a população infectada pelo HIV, sugere a esporotricose como um problema emergente de saúde global concomitante com a

pandemia da AIDS, além da dificuldade para o tratamento (López-Romero *et al*., 2011). Também tem sido descritos casos de pacientes com esporotricose após tratamento com imunossupressores devido a transplantes e doenças autoimunes (Boumpas *et al*., 1992; Kanakry *et al*., 2014; Wiseman, 2016). Com isso, há uma constante busca por métodos mais efetivos e seguros para a terapia antifúngica.

A escolha da terapia para o tratamento da esporotricose depende de vários fatores como baixo custo, facilidade de administração, perfil de segurança e tipo da infecção, localizada ou disseminada. A infecção grave e sistêmica requer geralmente um tratamento mais agressivo, apesar da toxicidade associada a medicamentos. O itraconazol é atualmente o medicamento de escolha para o tratamento das formas cutâneas (fixas e linfocutâneas) e osteoarticulares da esporotricose (Guterres *et al*., 2014; Mahajan, 2014). Para as formas mais graves da doença geralmente o tratamento é realizado de forma associada com outro antifúngico (como a anfotericina B), e mais recentemente, de modo a tentar diminuir a toxicidade do tratamento, decidiu-se associar o itraconazol com imunomodulador como a β-glucana, obtendo sucesso na resolução da esporotricose (Rop *et al.*, 2009; Guterres *et al*., 2014).

O imiquimode é um adjuvante imunológico, que inicialmente foi desenvolvido para ser um agente antiviral, e, por possuir potente efeito sobre o sistema imune, está mostrando ter atividade antitumoral e também no auxílio contra doenças infecciosas (Gaspari, 2007). O imiquimode age por ativação de macrófagos e outras células apresentadoras de antígenos, através da ligação a receptores de superfície celular, tal como o receptor TLR-7 e TLR-8, induzindo assim a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN-α, TNF-α e IL-12. Este perfil de citocinas gerado localmente tende para uma resposta imune mediada por células Th1 com a geração de fatores citotóxicos. Também estimula as células NK, a proliferação de células B e a maturação e migração de células de Langerhans (Stanley, 2002; Garland, 2003). Embora haja poucos relatos, o uso de imiquimode como antifúngico já foi relatado para tratamento de cromoblastomicose e dermatofitoses, obtendo resolução da doença (Erbagci *et al*. 2005; Sousa *et al*., 2011; Sousa *et al*. 2014).

Analisando os antecedentes da utilização da associação de imunoestimulantes e antifúngicos, é de grande importância avaliar esta combinação utilizando o imiquimode, que já se mostrou efetivo no tratamento de outras infecções fúngicas, parasitárias e tumorais. Diante das ferramentas de tratamento disponíveis atualmente para a

esporotricose, há necessidade de se buscar novos métodos terapêuticos mais eficazes e que sejam menos tóxicos, com o intuito de reduzir o tempo de tratamento. No presente estudo, foi induzido o estado de imunossupressão nos animais pelo uso de ciclofosfamida e avaliada a eficácia do tratamento utilizando imiquimode associado ou não a itraconazol. Vale ressaltar que a via de infecção subcutânea foi utilizada para a infecção dos animais, similar à via natural de infecção. Os resultados desse estudo visam contribuir para uma terapia mais eficaz da esporotricose, doença emergente pelo status epidemiológico que hoje ocupa principalmente em regiões menos favorecidas economicamente, tais como periferias de grandes centros urbanos como Rio de Janeiro e São Paulo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Esporotricose

A esporotricose é uma infecção micótica causada pelo gênero *Sporothrix*. A infecção é geralmente adquirida pela inoculação traumática do fungo e menos comumente, pela inalação de esporos (Chakrabarti *et al*., 2015). O *Sporothrix schenckii* (*S. schenckii*) foi isolado pela primeira vez em 1896 por Benjamin Schenck, um estudante de medicina no Hospital Johns Hopkins em Baltimore, onde relatou um paciente de 36 anos, masculino, apresentando lesões na mão e braço direito. Este isolado, a partir do abcesso do paciente, em seguida, foi estudado pelo micologista Erwin Smith, que concluiu que o fungo pertencia ao gênero Sporotrichum (Barros *et al*., 2011; Carlos e Batista-Duharte, 2015). Um estudo filogenético propôs que *S. schenckii* é na verdade um complexo de várias espécies, das quais são de interesse clínico: *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix luriei*, *Sporothrix schenckii sensu stricto*, *Sporothrix mexicana* e *Sporothrix pallida* (Marimon *et al*., 2006; Marimon *et al*., 2007; Castro *et al*., 2013). Mais recentemente, foi proposta uma nova espécie, o *Sporothrix chilensis* sp. (Rodrigues *et al*., 2015).

O *S. schenckii* pode ser encontrado em quase todo o mundo, e infecta os seres humanos através da penetração do fungo por de traumas na pele, inalação de conídios, ou zoonoses por gatos e cachorros. Mais especificamente, entre as diferentes espécies de *Sporothrix*, o *S. globosa* tem sido relatado em vários países com uma frequência muito

baixa, sendo prevalente na Ásia, embora sua baixa diversidade genética possa sugerir uma associação com outra fonte de infecção ambiental. O *S. brasiliensis* é descrito como uma espécie altamente virulenta em surtos epidêmicos tanto para humanos quanto para gatos, sendo predominante no sul e sudeste do Brasil. Outra espécie patogênica, *S. luriei*, foi isolada em apenas quatro casos na África do Sul, Itália, Espanha e Índia e de um caso de esporotricose canina. Uma espécie que foi recentemente posicionada no ranking de espécies com base em suas características fenotípicas e análise de sequência multilocus forai a *S. mexicana* que tem foi isolada em um caso clínico em Portugal, três casos no Brasil, e de material vegetal e de solo no México. Finalmente, devemos mencionar *S. pallida*, relatada como causadora de ceratite fúngica em uma úlcera corneana de um caso humano de onicomicose. A *S. pallida* foi isolada no ambiente e atualmente é sinônimo de *S. albicans* (Carlos e Batista-Duharte, 2015; Alba-Fierro *et al*., 2016).

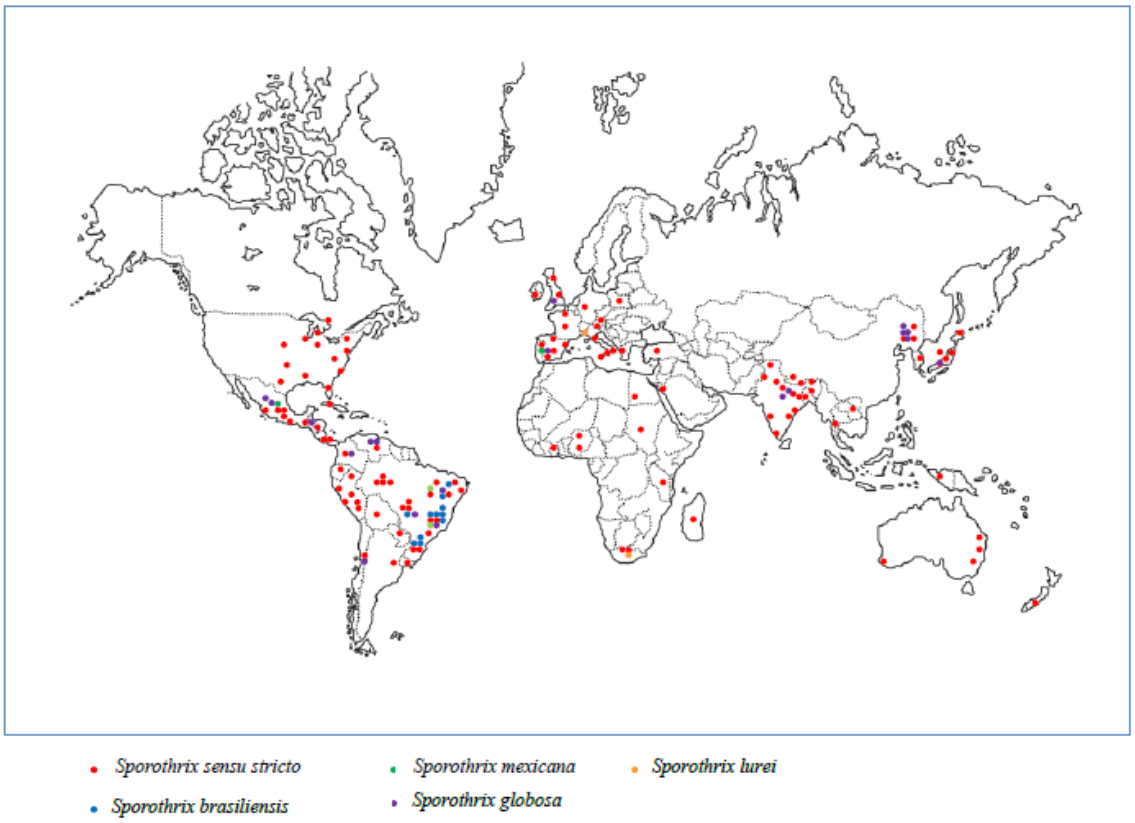


Figura 1. Distribuição mundial de casos de esporotricose. Fonte: Carlos e Batista-Duharte, 2015.

Apesar de estar distribuída mundialmente (**Figura 1**), especialmente nas áreas tropicais e subtropicais (Kong *et al*., 2006; Marimon *et al*., 2007; Oliveira *et al*., 2014; Carlos e Batista-Duharte, 2015), a esporotricose é mais comum na América do Sul (Carlos *et al*., 2009; Schechtman *et al*., 2010; Carlos e Batista-Duharte, 2015). Casos de esporotricose vêem sendo reportados em gatos, comumente com lesões graves e disseminadas, ricas no microrganismo (Barros *et al*., 2010; Ramos-e-Silva *et al*., 2012). No Brasil, a transmissão zoonótica da esporotricose por gatos atingiu proporções epidêmicas como em nenhum outro lugar, tendo sido reportada de forma crescente ao longo das últimas décadas. Esse perfil epidemiológico distinto tem reflexos diretos no grupo de risco associado à esporotricose no Brasil, composto de mulheres de meia idade com baixo nível socioeconômico e primariamente envolvidas em atividades domésticas enquanto cuidam de animais infectados em casa (Barros *et al*., 2008; Chakrabarti *et al*., 2015) Duas espécies patogênicas têm sido associadas às áreas endêmicas: *S. schenckii* e *S. brasiliensis* (Castro *et al*., 2013).

Na cidade do Rio de Janeiro, a doença assumiu proporções epidêmicas e está em curso há mais de 17 anos, acometendo principalmente regiões com dificuldades socioeconômicas (Barros *et al*., 2010; Ramos-e-Silva *et al*., 2012). Entre os anos de 1998 e 2009, 3244 gatos, 120 cães e 2200 humanos foram diagnosticados com esporotricose pelo isolamento do fungo *S. schenckii* em cultura (Barros *et al*., 2010). Schubach e colaboradores (2008) demonstraram o potencial zoonótico dos gatos pelo isolamento de *S. schenckii* em 100% das amostras de lesões cutâneas e do material coletado de suas cavidades nasal e oral. Entretanto, a correta estimativa do número de casos de esporotricose é difícil, por não ser uma doença de notificação compulsória, cujos casos de que se tem conhecimento são aqueles notificados espontaneamente na literatura. No entanto, em julho de 2013 a Secretaria Estadual de Saúde do Rio de Janeiro incluiu a esporotricose na lista de doenças de notificação compulsória dentro do estado (publicado no Diário oficial da União em 16 de julho de 2013), visto que é uma região hiperendêmica e a situação preocupante.

Segundo a Secretaria de Saúde do estado do Rio de Janeiro, somente entre os anos de 2013 e 2014 foram confirmados 830 casos de esporotricose, demonstrando o aumento da incidência da doença (Ministério da saúde, 2014). Já mais recentemente, entre os anos de 2013 a 2016 foram notificados 3.377 casos suspeitos de esporotricose nesse estado. Durante este período o percentual de confirmação dos casos, tanto

laboratorial quanto clínico epidemiológico, se manteve acima de 60% (Ministério da Saúde, 2016).

A infecção por *S. schenckii* pode acometer humanos e animais e apresenta diversas manifestações clínicas, as quais são determinadas pela espécie infectante, quantidade inicial do inóculo, profundidade do trauma e pelo estado imunológico do hospedeiro (Fernandes *et al*., 1999; Barros *et al*., 2010). *S. schenckii* é um fungo saprófita, podendo ser encontrado no solo, plantas e materiais orgânicos em decomposição. No meio ambiente este microrganismo pode potencializar a sua virulência conforme sua exposição a fatores adversos, ou seja, contaminantes físicos, químicos ou biológicos (Téllez *et al*., 2014). Geralmente a esporotricose é adquirida através da inoculação traumática do fungo a partir de objetos contendo solo ou através de mordidas ou arranhões de animais, como gatos, picadas de insetos e outros ferimentos. Estas condições podem resultar na inoculação direta ou facilitar a entrada do fungo (Barros *et al*., 2011). Assim, ocupações profissionais como jardinagem, agricultura, pecuária e veterinária estão mais associadas à infecção (Marimon *et al*., 2007; Ramos-e-Silva *et al*., 2007; Cruz, 2013; Chakrabarti *et al*., 2015).

Por ser um fungo termo-dimórfico, a temperatura é um fator determinante da sua morfologia e o tempo do seu cultivo pode influenciar e induzir mudanças na composição da parede celular, causando uma diminuição da virulência (Fernandes *et al*., 2013). Em temperaturas que variam de 25 a 30°C o fungo cresce na forma miceliar, desenvolvendo rapidamente colônias de coloração cinza com hifas aéreas curtas. A análise microscópica mostra micélio fino, ramificado, hialino e septado com formação de esporos assexuados (conídios) que estão localizados em ambos os lados das hifas formando rosetas no final. Quando cultivado a 37°C, *S. schenckii* assume a forma leveduriforme, com elementos unicelulares em forma de "charuto" (Almeida-Paes *et al*., 2009; Ramos-e-Silva *et al*., 2012). Assim, na natureza o fungo normalmente apresenta-se na forma miceliar e, quando instalado no hospedeiro, através de lesões cutâneas causadas por plantas ou animais contaminados, o mesmo converte-se para sua forma de levedura (López-Romero *et al*., 2011).

As principais manifestações clínicas da esporotricose ocorrem na pele, no entanto, o número de casos sistêmicos e viscerais tem aumentado, especialmente em pacientes imunocomprometidos (Ramos-e-Silva *et al*., 2012; Gutierrez-Galhardo *et al*., 2015). A manifestação clínica mais comum da esporotricose limita-se à pele e tecido

subcutâneo, manifestando-se como nódulos e lesões papulares, que podem evoluir para lesões ulcerativas. A forma clínica mais grave é a disseminada, ocorrendo por via hematogênica a partir do sítio de inoculação primário ou do linfonodo drenante (De Araujo *et al*., 2001; Lyon *et al*., 2003; Lopes-Bezerra *et al*., 2006; Mahajan, 2014), e está associada principalmente a indivíduos imunodeprimidos, como aqueles infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou em processo de tratamento com quimioterápicos ou corticóides (Yamaguchi, 1987; Rocha *et al*., 2001; Lopes-Bezerra *et al*., 2006; Freitas *et al*., 2011; Ramos-e-Silva *et al*., 2012; Chang *et al*., 2013). Outra forma grave é a esporotricose pulmonar primária, que resulta da inalação de conídios e, pode ou não, resultar em infecção disseminada (Oliveira *et al*., 2014).

A capacidade de adesão do *S. schenckii* às células do hospedeiro é primordial para a colonização e estabelecimento da infecção. A parede celular do fungo consiste de glucanas alcalinas solúveis e insolúveis, dentre essas a ramnomanana, encontradas em ambas as fases morfológicas. Também são encontradas duas glicoproteínas, de 60kDa (Gp60) e 70kDa (Gp70), que têm sido demonstradas como sendo os componentes mais imunogênicos da parede celular do fungo. A camada mais externa de sua parede celular possui um material amorfo microfibrilar que está envolvido na adesão do fungo aos tecidos do hospedeiro (de Lima Barros *et al*., 2001; López-Romero *et al*., 2011; Alba-Fierro *et al*., 2014).

A adesão está estreitamente relacionada à capacidade de formação de biofilmes, que é também uma característica relevante para a patogenicidade dos microrganismos estando relacionada com a resistência à antifúngicos e à falha da resposta imune (Delattin *et al*., 2014). Biofilmes são definidos como uma população de microrganismos ligados a uma superfície biótica ou abiótica. É um processo com múltiplas etapas, em que inicialmente o microrganismo se liga de forma reversível com subsequente produção de matriz extracelular resultando em uma forte ligação. Em infecções fúngicas, a formação do biofilme está relacionada com a forma invasiva e com o aumento de virulência (Van Acker *et al*., 2014; Delattin *et al*., 2014). Em vários gêneros de fungos como *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Coccidioides* e *Pneumocystis* a formação de biofilme tem importância médica (Fanning e Mitchell, 2012), porém ainda não existem relatos na literatura sobre a capacidade de formação de biofilme por *S. schenckii* e se este processo seria importante para sua virulência.

2.2. Mecanismos envolvidos na resposta imune contra *S. schenckii*

Os mecanismos envolvidos na indução da resposta imune contra *S. schenckii* ainda são pouco esclarecidos. Estudos *in vitro* mostraram que a galactomanana e a ramnomanana purificadas da superfície celular do fungo, bem como o extrato lipídico, são capazes de inibir a fagocitose das células leveduriformes por macrófagos peritoneais (Oda *et al*., 1983; Carlos *et al*., 2003). Além disso, o conteúdo liberado da parede celular do fungo, denominado exoantígeno (ExoAg), tem sido identificado como um importante fator de virulência de *S. schenckii* (Carlos *et al.*, 1999; Nascimento *et al*., 2008; Teixeira *et al*., 2009).

A resposta imune é desencadeada pelo reconhecimento de patógenos através de receptores expressos pelas células apresentadoras de antígenos (APCs – células dendríticas, monócitos/macrófagos e linfócitos B imaturos), os quais podem estar localizados na superfície celular ou em compartimentos intracelulares. Esses receptores são denominados receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) encontrados em uma ampla variedade de microrganismos. Possuem, portanto, a capacidade de discriminar entre os microrganismos e o próprio (Banchereau e Steinman, 1998; Aderem e Underhill, 1999; Janeway e Medzhitov, 2002; Akira *et al*., 2006).

Toll-like receptors (TLRs) são os receptores mais importantes da família dos PRRs e desempenham um papel crucial no reconhecimento de patógenos, incluindo bactérias, vírus, protozoários e fungos e no início da resposta imune. Sua estimulação por produtos microbianos leva à ativação de vias de sinalização intracelular que resultam na ativação de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias (Pillai *et al*., 2015). A iniciação e manutenção de respostas específicas de células T dependem estritamente da interação do fungo com as APCs (Romagnoli *et al*., 2004). Após a ligação do TLR ao seu PAMP específico, a ativação e maturação das APCs pode ser observada pelo aumento da expressão das moléculas co-estimuladoras que serão importantes para o início da resposta adaptativa (Kadowaki *et al*., 2001; Janeway e Medzhitov, 2002; Pillai *et al*., 2015).

Em estudos anteriores realizados em nosso laboratório foi demonstrada a importância dos macrófagos e o envolvimento do TLR4 no reconhecimento do fungo *S. schenckii* (Sassá *et al*., 2009; Sassá *et al*., 2012) e, mais recentemente, o reconhecimento

por parte do receptor TLR-2 (Negrini *et al*., 2013; Negrini *et al*., 2014) e o envolvimento de Caspase 1 e inflamasoma (Gonçalves *et al*., 2014).

Os macrófagos, quando ativados, são responsáveis pela fagocitose de partículas estranhas, apresentação de antígenos, produção de citocinas e de agentes microbicidas, como os intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio (Mlambo e Sigola, 2003; Carlos *et al*., 2009), estando estas espécies envolvidas com a resposta antifúngica (Kajiwara *et al*., 2004). Em trabalhos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa, Maia e colaboradores (2006) avaliaram o perfil de diferenciação de linfócitos T durante a esporotricose. As células Th1 produziram IFN-γ que ativaram macrófagos promovendo a imunidade mediada por células. Além disso, houve um aumento da produção de IL-4 após a 5ª e 6ª semana de infecção sugerindo a participação da resposta padrão Th2 neste período. Em vista desses resultados, o estudo demonstrou que na esporotricose experimental, a resposta imune celular participou ao longo das 10 semanas de infecção e apresentou-se como um mecanismo dependente do óxido nítrico, enquanto a presença da resposta Th2 a partir da 5ª semana sugerindo-se a participação de uma resposta imune humoral nos estágios avançados do processo infeccioso. O NO apresenta alta citotoxicidade contra *S. schenckii*, sendo um potente mediador da resposta imune protetora contra o fungo (Fernandes *et al*., 1999, 2013; Maia *et al*., 2016). Porem, quando este mediador é produzido em altas concentrações pode inibir a resposta imunológica de linfócitos T contra este fungo (Fernandes *et al*., 2008).

Tradicionalmente, respostas de células Th1 produtoras de IFN-γ são consideradas importantes para conferir imunidade protetora contra fungos, enquanto que as respostas Th2 mediadas pela normalmente levam ao aumento de suscetibilidade. Por volta de 2006 foi descrito um novo fenótipo de linfócitos T designado por Th17. (Weaver *et al*., 2006). Estas células produzem principalmente IL-17 e estão associadas ao desenvolvimento de respostas inflamatórias e possível proteção do hospedeiro contra bactérias intracelulares e fungos (Weaver *et al*., 2007). A ação da IL-17 sobre os macrófagos induz a expressão de TNF-α e IL-6. Além disso, sugere-se que o IFN-γ regula negativamente a diferenciação de células Th17, enquanto que o TGF-β estimula a expressão das mesmas (Korn *et al*., 2007, 2009; Lee *et al*., 2006). As células TCD4+ regulatórias (Treg) (Foxp3+ CD4+ CD25+) suprimem a resposta imune pela secreção de citocinas supressoras como TGF-β inibindo a produção de citocinas pró-

inflamatórias. Estas citocinas auxiliam no equilíbrio entre proteção e progressão de doenças (Torre *et al*., 2002).

2.3. Modelos de infecção e imunossupressão

Para o estabelecimento de infecções micóticas experimentais em animais, diferentes vias são utilizadas, como a intraperitoneal, intracerebral, subcutânea, entre outras. A via de escolha é estritamente dependente do objetivo do estudo, que também deve refletir o animal, o fungo e o modelo da doença (Jensen, 2003). Muitos estudos têm sido realizados utilizando a via intraperitoneal, a qual pode promover o início de uma infecção sistêmica dependente da quantidade do inóculo. Entretanto, a infecção natural não ocorre por esta via. Um modelo mais próximo da infecção humana pode ser produzido em camundongos, hamsters e macacos após inoculação subcutânea na pata desses animais, levando a uma infecção com comprometimento das vias linfáticas (Satterwhite *et al*., 1978; Charoenvit e Taylor, 1979; Jensen, 2003).

As formas disseminadas, osteartícular e visceral da esporotricose são mais raras, e geralmente acometem pacientes imunossuprimidos, sendo mais difícil o tratamento (Mahajan, 2014). A fim de mimetizar a condição humana, vários modelos animais de imunodepressão foram desenvolvidos, tais como os de imunodepressão espontânea como camundongos congenitamente atímicos (*nude*), camundongos que apresentam defeito nos linfócitos T (*New Zealand Black* - NZB) e camundongos leucêmicos (AKR/J) que são utilizados não só para mimetizar as infecções em seres humanos imunodeprimidos, mas também para estudar os mecanismos de defesa envolvidos durante as diferentes infecções micóticas (Jensen, 2003). Modelos animais de imunodepressão induzida podem ser sido obtidos pelo tratamento com irradiação com raios x, corticosteróides, ciclofosfamida, mecloretamina ou esplenectomia (Van Cutsem, 1990; Jensen, 2003). A ciclofosfamida tem sido muito utilizada em modelos de imunossupressão, podendo suprimir as respostas imune celular e humoral. Essa droga apresenta um mecanismo similar aos dos vírus imunossupressores, capaz de danificar a estrutura do DNA, destruir células do sistema imune, interferir na proliferação e diferenciação de macrófagos e células T e B e inibir a resposta imune celular e humoral (Cruz-Chamorro *et al*., 2007; Wang *et al.*, 2011; Ren *et al*., 2014).

2.4. Tratamento para esporotricose

O tratamento para a esporotricose pode ser difícil, principalmente devido às complicações em razão do longo período de tratamento e da alta toxicidade do fármaco de escolha (Rochette *et al*., 2003). O itraconazol, um antifúngico da família dos azóis (**Figura 2A**), é um fármaco de amplo espectro de ação nas micoses superficiais e sistêmicas, considerado o fármaco de escolha para o tratamento da esporotricose nas formas cutânea e linfocutânea em humanos e pequenos animais (Rochette *et al*., 2003; Guterres *et al*., 2014). Este antifúngico inibe a enzima citocromo P450 lanosterol 14α-demetilase que converte lanosterol para o ergosterol, o principal esterol na parede celular fúngica (Mahajan *et al*., 2014). Em doses elevadas e longo período de tratamento pode causar efeitos colaterais como náuseas, vômitos, dores abdominais, diarréia, dores de cabeça e alopecia leve. Pode provocar, também, hepatotoxicidade com consequente aumento da bilirrubina e transaminases (Cunha-azevedo *et al*., 2011).

Considerando as dificuldades terapêuticas da esporotricose, incluindo toxicidade e o desenvolvimento de resistência aos antifúngicos disponíveis, há a necessidade de se estudar novas estratégias para o tratamento dessa doença. O uso de imunomoduladores vem sendo difundido como opção no combate aos microrganismos patogênicos através da estimulação da resposta imune. Segundo Guterres e colaboradores (2014), o uso da β-glucana associada ao itraconazol no tratamento de um cão com esporotricose refratária ao tratamento isolado com itraconazol foi efetivo para o desaparecimento das lesões e da infecção. Isto evidencia a efetividade da associação de um antifúngico com um imunoestimulante como alternativa ao tratamento convencional da esporotricose.

O imiquimode é uma imidazoquinolina sintética (**Figura 2B**) que possui, além de potentes propriedades antivirais e antitumorais, um efeito imunoestimulador através da ativação de células da imunidade inata e adaptativa por um mecanismo dependente de TLR-7 ou TLR- 8 (**Figura 3**), através da ativação do fator NF-κB, resultando na secreção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Também pode ativar o inflamassoma via NALP3, levando a ativação de caspase 1 e produção de IL-1β e IL-18. Adicionalmente, pode atuar como um antagonista do receptor de adenosina e, em altas concentrações, pode contribuir para apoptose (Garland, 2003; Schön e Schön, 2007; Fluter e Nestle, 2013). Existem poucos estudos avaliando o efeito antifúngico de imiquimode (Erbagci *et al*. 2005; Sousa *et al*. 2014). Sousa e colaboradores (2011)

mostraram um efeito benéfico, com diminuição da carga fúngica dos animais que receberam administração tópica de imiquimode no tratamento da cromoblastomicose. Foi descoberto um defeito subjacente no reconhecimento inato desse fungo pelos TLRs que, poderia ser restaurado pela administração exógena de agonistas de TLRs, como o imiquimode. Erbagci e colaboradores (2005) relataram um caso de uma paciente com dermatofitose que, após passar por inúmeros tratamentos sem sucesso utilizando antifúngicos tópicos e sistêmicos, obteve melhora do quadro clínico ao optar por uma associação de itraconazol oral e imiquimode tópico. Os autores sugeriram que essa terapia combinada é uma alternativa promissora para casos persistentes de hialo-hifomicoses subcutâneas antes mesmo da realização de intervenções cirúrgicas que poderiam resultar em cicatrizes e desfigurações na pele.

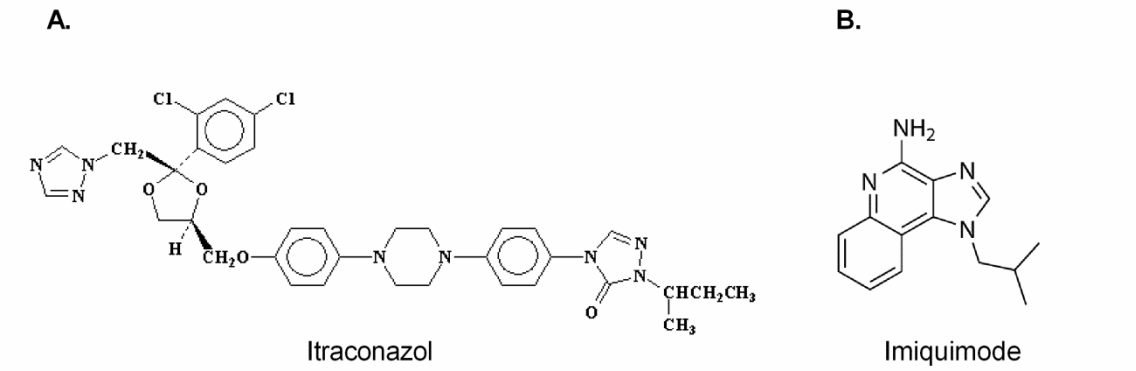


Figura 2. Estrutura química itraconazol (**A**) e imiquimode (**B**).

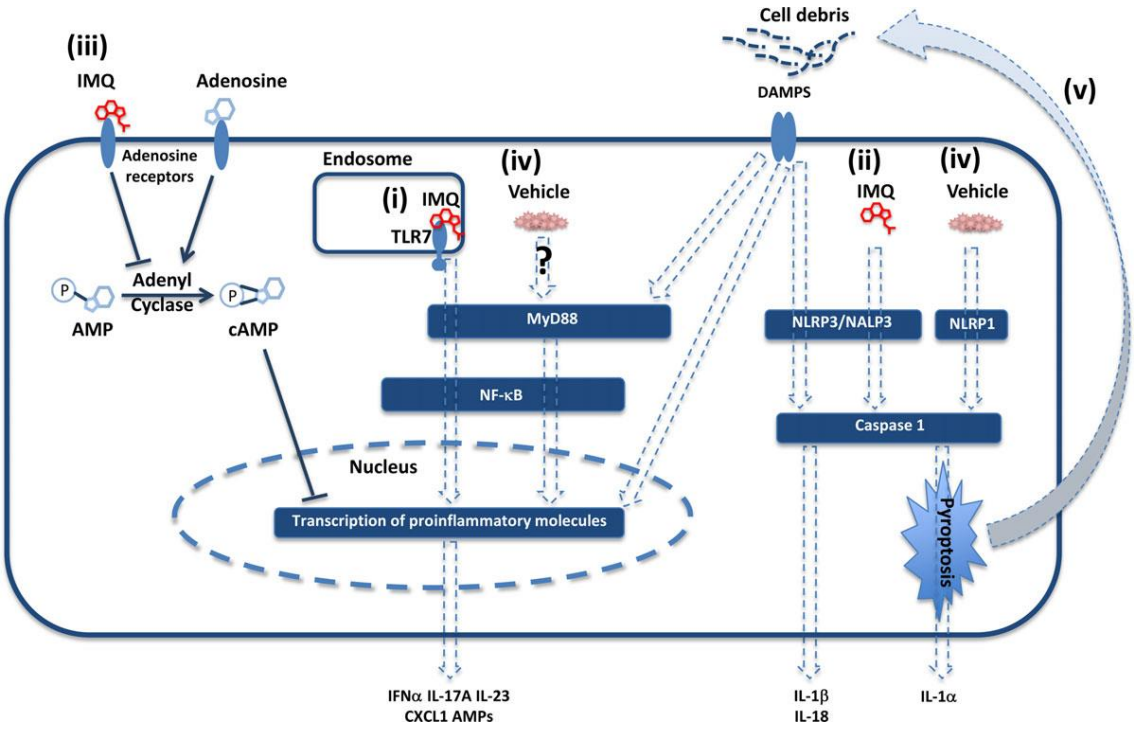


Figura 3. Mecanismo de ação imiquimode. O imiquimode pode ativar o sistema imune através de diferentes vias como: (i) ativação via MyD88 dependente de TLR-7 ou 8, (ii) ativação de NALP3 do inflamassoma, (iii) antagonismo da sinalização do receptor de adenosina, reduzindo os níveis de cAMP, (iv) ativação direta do inflamassoma ou via MyD88 através de receptores desconhecidos pelo veículo ácido isoesteárico, (v) morte celular induzida por imiquimode ou veículo conduzindo à liberação de IL-lα e debris celulares, que por sua vez podem ativar outras células próximas. Fonte: Flutter e Nestle, 2013.

Na esporotricose as ferramentas terapêuticas existentes não conseguem controlar a enfermidade em curto tempo e, com frequência, estão associadas a efeitos adversos e resistência do fungo. O principal foco de atenção atualmente vem ser a procura de alternativas terapêuticas nos casos de pacientes imunossuprimidos onde ocorrem as manisfetações mais graves da doença (Batista-Duharte *et al*., 2015).

No presente projeto pretende-se mimetizar o estado de imunossupressão nos animais pelo uso de ciclofosfamida e avaliar a eficácia do tratamento utilizando imiquimode associado ou não a itraconazol. Vale ressaltar que a via de infecção subcutânea será utilizada para a infecção dos animais, similar à patogenia deste fungo em humanos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito do imiquimode associado ao itraconazol como alternativa terapêutica na esporotricose em animais imunossuprimidos e imunocompetentes.

3.2. Objetivos específicos

Testes *in vitro* e *ex vivo*

- ✓ Avaliar a possível interação química entre itraconazol e imiquimode.
- ✓ Avaliar a capacidade antifúngica por microdiluição do imunoestimulante imiquimode e sua associação ao itraconazol.
- ✓ Verificar a formação do biofilme e a capacidade dos compostos do estudo de inibi-lo.
- ✓ Avaliar a capacidade da atividade fungicida de macrófagos utilizando imiquimode e/ou itraconazol e dosar os mediadores óxido nítrico e citocinas.

Padronização dos modelos experimentais murinos

- ✓ Padronizar um modelo de infecção subcutânea por *S. schenckii*.
- ✓ Padronizar o modelo de imunossupressão utilizando a ciclofosfamida.

Testes *in vivo* em camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos

- ✓ Avaliar o efeito do tratamento tópico por imiquimode de maneira isolada e em associação ao itraconazol (oral) utilizando um modelo de infecção por *S. schenckii*.
- ✓ Avaliar o perfil da resposta imunológica por meio da fenotipagem (Th1, Th17 e células NK) e produção de citocinas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

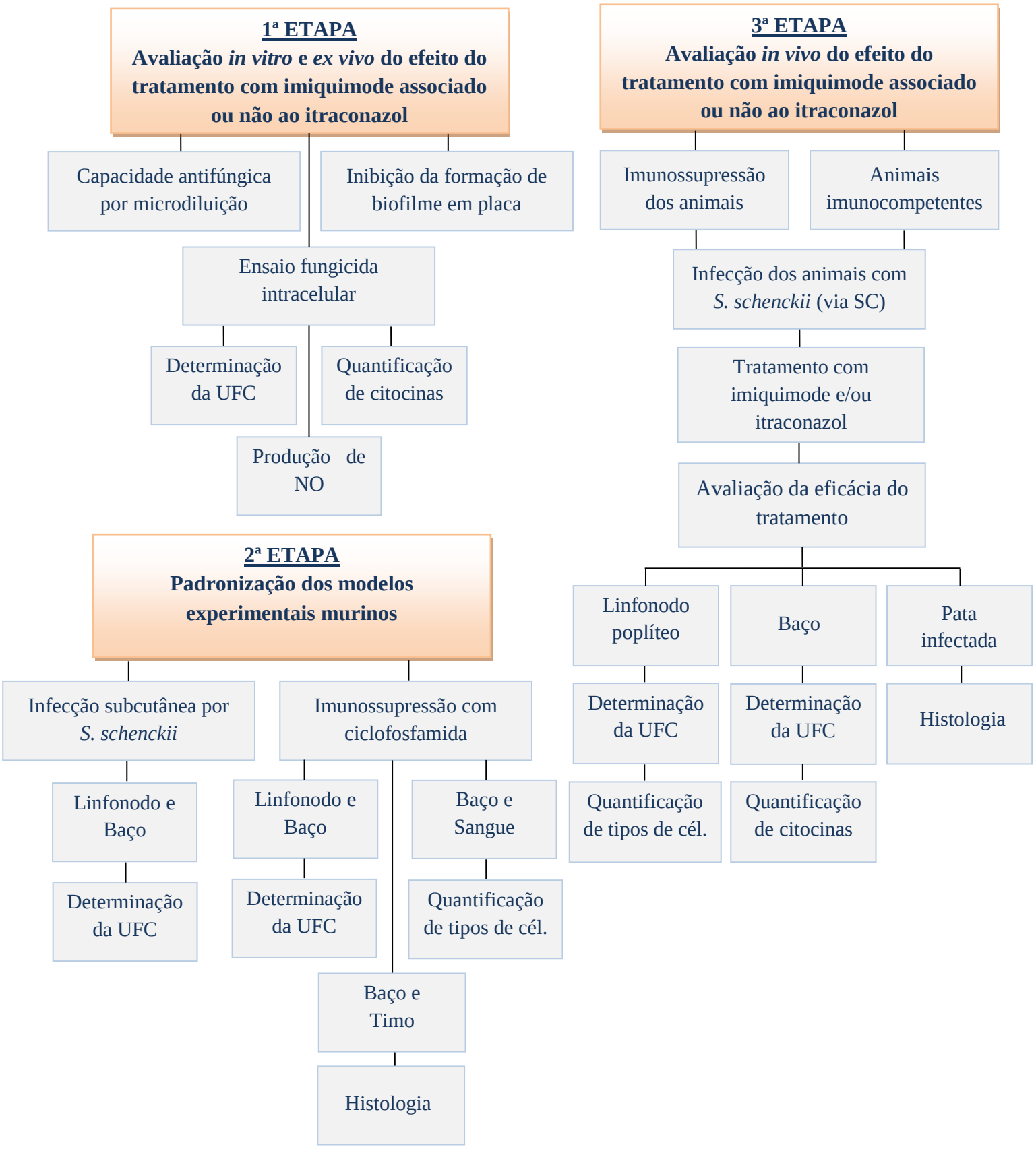


Figura 4. Organograma de desenvolvimento experimental.

4.1. Animais

Camundongos BALB/c, machos, pesando entre 18 e 25g, com aproximadamente quatro semanas de idade foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica - CEMIB/UNICAMP, Campinas, São Paulo. Os animais foram mantidos em mini-isoladores com temperatura e umidade estáveis (23 ± 2°C e 56 ± 2% de umidade relativa do ar) e ciclos de luz claro/escuro de 12 horas, água esterilizada e ração (Purina) *ad libitum*. O protocolo experimental foi aprovado sob o número 25/2015 pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

4.2. Microrganismo e condições de cultivo

Foi utilizada a cepa ATCC 16345 de *Sporothrix schenckii*, isolada de um caso de infecção pulmonar humano (Baltimore, MD), cedida gentilmente pelo Departamento de Microbiologia, Laboratório de Materiais de Referências da Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro. Atualmente, este isolado é mantido no Laboratório de Imunologia do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP, na fase filamentosa em meio Mycosel^{TM}, à temperatura ambiente (± 25°C). A forma leveduriforme foi obtida em meio caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, Difco) a 37°C sob agitação constante de 150rpm de modo a obter uma cultura em fase logarítmica de crescimento e com taxa de conversão hifa-levedura de visualmente 100%.

4.3. Avaliação da atividade antifúngica

A avaliação da atividade antifúngica foi realizada através do teste de microdiluição de acordo com a Norma M27-A3 do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* com revelação por Alamar Blue (resazurina). O itraconazol foi testado numa faixa de concentração de 16 a 0,008µg/mL em diluição seriada 1/2, conforme recomendado pela norma. O imiquimode, a fim de permitir a comparação entre os dois compostos, foi testado na mesma faixa de concentração do itraconazol. A associação entre os dois compostos foi feita segundo a técnica de *checkerboard* (tabuleiro de xadrez) partindo de uma concentração de 16µg/mL de cada uma das

substâncias e fazendo todas as combinações possíveis. Uma suspensão de *S. schenckii* foi ajustada para a concentração de 2,5 × 10^3 unidades/mL em RPMI-1640 acrescido de MOPS (RPMI/MOPS), da qual 100µL foram adicionados a cada poço. A placa foi mantida por 4 dias em estufa a 37ºC com tensão constante de 5% de CO_2. Após, foram adicionados 10µL/poço de Alamar Blue e, após 24 horas, a leitura foi realizada de maneira visual, através da mudança de cor, e em espectrofotômetro (Multiskan Ascent, Labsystems) com comprimento de onda de 570nm e filtro de referência em 620nm. Para a avaliação do teste de checkerboard determinou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cada uma das amostras isoladas e associadas, para depois determinar a Concentração Inibitória Fracionada (CIF) de cada uma das substâncias que consiste na CIM da amostra associada dividida pela CIM da amostra isolada, para finamente calcular o Índice de Concentração de Inibição Fracionada (ICIF) determinado pela somatória dos valores de CIF de cada amostra. Valores menores ou iguais a 0,5 classificam as amostras como sinérgicas, maior que 0,5 e menor que 4 indica indiferença e maior que 4 antagonismo (Chaturvedi *et* al., 2011).

4.3.1. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Após a determinação da CIM, os poços em que não houve visível crescimento fúngico, além do controle de crescimento do fungo, foram checados quanto à presença de fungos viáveis para a determinação da CFM. Para isso, uma alíquota de 20µL foi retirada e diluída em PBS pH 7,4 estéril (daqui em diante denominado apenas como PBS) para um volume final de 200µL, dos quais 100µL foram plaqueados em ágar Mycosel™. Após 3 dias de incubação à temperatura ambiente (± 25°C) as colônias foram contadas e a CFM foi determinada como a menor concentração capaz de reduzir em 99,9% o crescimento de unidades formadoras de colônia (UFC).

4.4. Avaliação da inibição da formação de biofilme

Esse ensaio foi adaptado de Krom e colaboradores (2009), com modificações. Brevemente, uma suspensão de *S. schenckii* na concentração de 1 × 10^7 leveduras/mL em meio RPMI/MOPS foi incubada a 37ºC em placas de cultura de tecidos de 96 poços de fundo plano, 150µL/poço, por 24 horas sem agitação para permitir a formação do biofilme. Após, a placa foi lavada com RPMI/MOPS para remoção das leveduras não

aderidas e, em seguida, foram adicionados itraconazol e imiquimode, isolados ou em associação, numa concentração inicial de 16µg/mL. A capacidade das amostras de desestruturar o biofilme já formado, determinada pela CIM séssil ($SCIM_{50}$, definido como a menor concentração capaz de causar uma diminuição de pelo menos 50% do biofilme já formado), foi analisada após 24 horas através do método de MTT. Em um experimento paralelo, analisou-se se as substâncias testadas seriam capazes de inibir a formação do biofilme, determinado pela CIM planctônica ($PCIM_{50}$, definido como a menor concentração capaz de causar uma inibição de pelo menos 50% na formação do biofilme). Para isso, o imiquimode e o itraconazol, isolados ou em associação, foram adicionados à suspensão fúngica previamente à incubação da mesma para formação do biofilme. Após 24 horas, a presença ou ausência de biofilme foi avaliada por microscopia óptica e pelo método de MTT.

4.5. Espectrometria de massas com ionização por *Electrospray*

Para analisar se houve ou não a formação de algum complexo entra as amostras, estas foram submetidas à espectrometria de massas, após serem preparadas como nos ensaios *in vitro*. O espectro foi registrado no aparelho 3200 QTRAP, AB SCiex, com fonte de ionização de *electrospray* (ESI), operando no modo positivo, com varredura na faixa de 210-1200 m/z. Os seguintes parâmetros foram utilizados para a obtenção do espectro: IonSpray (IS): 5500 V, Declustering Potential (DP): 75 V, Entrance Potential (EP): 10 V.

4.6. Obtenção e cultura de macrófagos peritoneais

Os animais foram inoculados por via intraperitonial (i.p.) com 3mL de tioglicolato de sódio a 3% (Difco) três dias antes de serem eutanasiados em câmara de CO_2. A pele da região abdominal foi retirada assepticamente em câmara de fluxo laminar classe 100 (Veco) e o peritôneo exposto. Foram então inoculados 5mL de PBS gelado na cavidade abdominal, aplicando-se leve massagem para estimular a liberação das células. O líquido resultante foi aspirado com agulha e seringa, transferido para tubo cônico estéril de 15mL (Corning) e centrifugado a 300x *g* por 5 minutos. O sedimento celular foi lavado 3 vezes com 3mL de PBS e ressuspendido após a última lavagem em 1mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma) contendo 2β-mercaptoetanol a 2x10-5M,

penicilina 100U/ml, estreptomicina 100U/ml, L-glutamina 2mM e 5% de soro fetal bovino (Cutilab), sendo o meio assim composto designado como RPMI-1640 completo (RPMI-1640C) para a contagem das células em câmara de Neubauer (Boeco, Germany). A concentração de células foi ajustada a uma concentração de 5×10^6 células/mL em meio de cultura.

4.6.1. Avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT

Foi empregada para a determinação da viabilidade celular a técnica colorimétrica utilizando uma solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), de acordo com Mosmann (1983), que consiste na capacidade que as células viáveis têm de clivar o anel tetrazólico presente no sal de MTT pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa, formando cristais de formazana. Em placa de cultura de tecido de 96 cavidades de fundo plano (Corning, Inc.) foram distribuídos 100µL por cavidade da suspensão de células do exsudato peritoneal ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL em meio de cultura RPMI-1640C, em presença de 100µL de LPS (5µg/mL - controle positivo), somente meio de cultura RPMI-1640C (controle negativo) e diferentes concentrações de itraconazol e imiquimode. As placas foram incubadas por 24 h a 37ºC em estufa contendo tensão constante de 5% de CO_2. Após esta incubação, 50µL dos sobrenadantes foram separados para posterior dosagem de óxido nítrico (NO), sendo o restante descartado. Às células aderentes expostas aos estímulos foram adicionados 100µL de uma solução de MTT a 1mg/mL diluída em PBS e RPMI na proporção de 1:5. A placa foi então incubada por mais 3 horas nas mesmas condições anteriores. Após esta incubação, os sobrenadantes foram descartados e as células aderentes do exsudato peritoneal foram tratadas com 100µL de isopropanol (Mallinckrodt Chemical) para solubilizar os cristais de formazana. A leitura da densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro UV/visível (Multiskan Ascent, Labsystems) para microplacas em 540nm, com filtro de referência em 620nm.

4.6.2. Determinação de Óxido Nítrico (NO)

O NO foi quantificado espectrofotometricamente pelo acúmulo de nitrito no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais através da reação de diazotação com

o reagente de Griess (1% de sulfanilamida (Merck), 0,1% de dicloro N(1-naftil-1-etilenodiamina) (Merck), 2,5% ácido orto-fosfórico (Mallinckrodt Chemical) e água deionisada q.s.p 100mL), conforme descrito por Green e colaboradores (1982). Após as células do exsudato peritoneal serem obtidas, plaqueadas e incubadas por 24 horas, segundo o **item 4.6.**, alíquotas de 50µL do sobrenadante da cultura destas células foram transferidas para outra placa de cultura de células contendo 96 poços de fundo plano (Corning, Inc.) e acrescentou-se 50µL da solução de Griess. Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foi feita a leitura da absorvância em espectrofotômetro UV/visível para microplacas em 540nm. A concentração de NO foi calculada a partir de uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas de nitrito de sódio e os valores foram expressos em µmols de nitrito/mL.

4.7. Determinação da capacidade da atividade fungicida de macrófagos

Macrófagos peritoneais, obtidos de acordo com o **item 4.6.** e ajustados para a concentração de 10^6 células/mL em meio RPMI-1640C foram incubados em placas de 24 poços, 500µL por poço. Após, cada poço foi adicionado de 500µL de RPMI-1640C e as placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO_2 por 2 horas. Em seguida, foi realizada uma lavagem com RPMI/MOPS, adicionadas leveduras de *S. schenckii* na proporção de 1:3 (macrófago:levedura) e a placas foram incubadas por mais 4 horas. As leveduras não fagocitadas foram removidas através de três lavagens com o meio RPMI/MOPS. Então, foram adicionadas diferentes concentrações de itraconazol (4, 1, 0,25, 0,0625 e 0,0156µg/mL) e imiquimode (16, 8, 4, 2, 1, 0,25, 0,0625 e 0,0156µg/mL), colocando as placas para incubar por mais 24 horas. Após, o sobrenadante foi colhido e congelado a -80°C para posterior dosagem de citocinas (TNF-α e IL-10) e NO. Para a avaliação da capacidade fungicida os macrófagos foram lisados com água destilada estéril gelada, sendo a suspensão resultante plaqueada em ágar Mycosel™ e as colônias contadas após 3 e 7 dias de incubação à temperatura ambiente. Paralelamente, a toxicidade dos compostos testados sobre os macrófagos peritoneais foi avaliada pelo método de MTT.

Para confirmar se as leveduras foram fagocitadas pelos macrófagos, foi realizado um controle em lâminas Lab-Tek (Thermo Scientific, USA), seguindo o mesmo procedimento acima, com diferença de que os macrófagos não foram lisados, mas sim fixados com metanol e corados pelo método de Giemsa. A ocorrência de fagocitose foi

verificada por microscopia óptica e fotos foram capturadas através do *software* VD480 OPTMEDICAL.

4.8. Desenvolvimento do modelo de esporotricose experimental

4.8.1. Padronização da infecção

A infecção foi induzida por via subcutânea (s.c.) no coxim do metacarpo da pata traseira esquerda dos camundongos como descrito por Brito e colaboradores (2007), com algumas adaptações. Os animais foram inoculados com uma suspensão contendo $1,6 \times 10^7$ leveduras em 20µL de PBS, ou com PBS apenas. Para isso, uma alíquota da cultura do fungo foi obtida conforme descrito no **item 4.2.** e centrifugada a 700 x *g* por 5 minutos e o *pellet* obtido foi ressuspendido em 1mL de PBS para contagem em câmara de Neubauer (Boeco, Germany). A suspensão foi ajustada para a concentração de 8×10^8 leveduras/mL e inoculada utilizando agulha de calibre 26G e uma seringa de 1mL.

Inicialmente, foi realizado um teste de sobrevivência durante 60 dias, findo os quais foram determinados o peso dos animais, a carga fúngica presente no baço e linfonodo poplíteo (através da contagem das UFC recuperadas desses órgãos) e o peso relativo do baço (peso do baço dividido pelo peso do animal). Posteriormente, para a determinação da cinética da infecção os animais foram eutanasiados de 3 em 3 dias após a infecção e os mesmos parâmetros citados acima foram avaliados.

Após a padronização, definiu-se que os animais seriam eutanasiados no dia 7 e 14 pós-infecção para a análise da eficácia do tratamento utilizando imiquimode e/ou itraconazol.

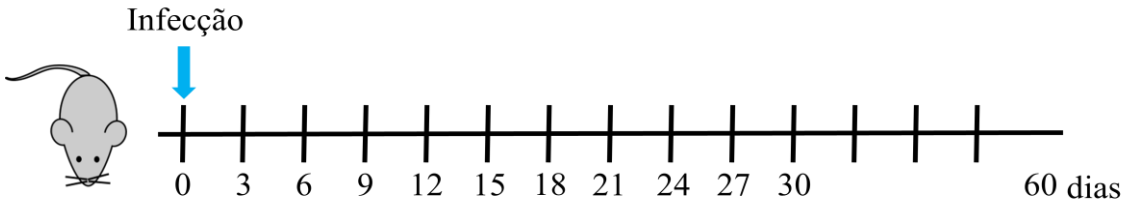


Figura 5. Esquema de infecção dos animais.

4.8.2. Padronização da imunossupressão

A imunossupressão dos animais foi induzida por uma droga antineoplásica, a ciclofosfamida (CY). Os animais receberam uma dose inicial de 200mg/kg de CY em PBS pela via i.p., com doses de manutenção de 150mg/kg após 9 dias, como descrito por Huyan e colaboradores (2011), com algumas adaptações. A infecção foi feita como descrito no **item 4.8.1.**, 3 dias após a dose inicial de CY. Os animais controle receberam PBS apenas, pela via s.c. e i.p.. Para a padronização, os animais foram eutanasiados nos dias 7 e 14 após a infecção para a análise da imunossupressão. Foi feita a coleta de sangue por punção cardíaca para análise da frequência de células T *helper* e citotóxicas e células B, por citometria de fluxo. Em seguida, o baço foi extraído, pesado e medido para determinação do índice esplênico (comprimento × largura × espessura), e depois dividido em duas partes, sendo uma para a realização da análise histológica e a outra para determinação do número de UFC e análise da frequência de células T *helper* e citotóxicas e células B, por citometria de fluxo. O timo dos animais também foi retirado, pesado e submetido à análise histológica. Além disso, o linfonodo poplíteo da pata traseira esquerda foi extraído para determinação do número de UFC.

Adicionalmente, foi realizado um teste de sobrevivência com os camundongos imunossuprimidos e infectados. Os animais foram mantidos imunossuprimidos como descrito anteriormente e acompanhados por 60 dias. Findo esse tempo, a carga fúngica foi determinada pela contagem do número de UFC recuperadas do baço e linfonodo poplíteo.

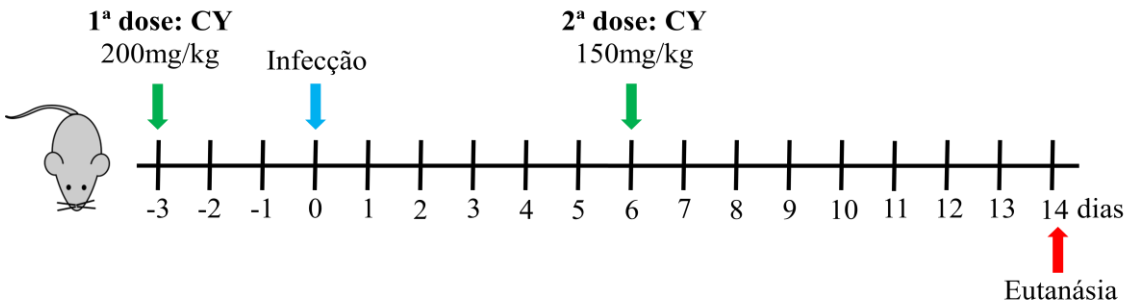


Figura 6. Esquema de imunossupressão dos animais com ciclofosfamida.

4.8.3. Obtenção de sangue

Após a eutanásia, aproximadamente 1mL de sangue de cada animal foi coletado por punção cardíaca em tubos contendo EDTA. Para a realização da imunofenotipagem, as hemácias foram lisadas com NH_4Cl por 5 minutos em gelo e em seguida a suspensão foi lavada 3 vezes com PBS a 300 x *g* por 5 minutos a 4°C. Após a última lavagem, as células foram ressuspendidas em 1mL de tampão de citometria (PBS acrescido de 1% de albumina sérica bovina – PBS/BSA) e contadas em câmara de Neubauer (Boeco) pela técnica de exclusão com azul de Trypan a 0,04%. As células foram ajustadas para 1 × 10^6 células/100µL fenotipadas para análise da frequência de células T *helper* ($CD3^+CD4^+$) e citotóxicas ($CD3^+CD8^+$) e células B ($CD19^+$) no sangue dos camundongos por citometria de fluxo.

4.8.4. Obtenção de células do baço

Após eutanásia, o peritôneo do camundongo foi exposto e aberto para a extração do baço, o qual foi assepticamente removido. Após as medições necessárias para o cálculo o índice esplênico, o baço foi dividido em dois (somente nos experimentos para padronização da imunossupressão), sendo que uma parte foi processada para a realização da análise histológica e a outra foi macerada utilizando um filtro com malha de nylon de poros de 100µm. Uma alíquota foi plaqueada em ágar Mycosel™, em diluição apropriada, para posterior contagem de UFC recuperadas do órgão e o conteúdo restante foi aspirado e transferido para um tubo cônico estéril (Corning) de 15mL. As hemácias foram lisadas com NH_4Cl e a suspensão foi lavada 3 vezes com PBS a 300 x *g* por 5 minutos a 4°C. Após a última lavagem, as células foram ressuspendidas em 1mL de tampão de citometria, contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para 10^6 células/100µL para análise da frequência de células T e B, por citometria de fluxo.

4.8.5. Histologia do baço e timo

Após a eutanásia, o baço e o timo dos camundongos foram extraídos e imediatamente submersos em formaldeído a 10% para subsequente análise histológica, utilizando coloração de hematoxilina e eosina (H&E) para avaliar a celularidade da

polpa branca e a frequência de células apoptóticas. A análise das lâminas foi feita por microscopia óptica (NIKON Eclipse TS100) e fotos foram capturadas através do *software* VD480 OPTMEDICAL.

4.8.6. Determinação da carga fúngica

A carga fúngica do baço e linfonodo poplíteo dos animais foram determinadas pela contagem do número de UFC recuperadas desses órgãos, após a maceração dos mesmos em malha de nylon com poros de 100µm. Para isso, alíquotas dos órgãos foram diluídas apropriadamente e plaqueadas em ágar Mycosel^{TM}. As placas foram mantidas à temperatura ambiente e checadas após 3 e 7 dias de incubação para a contagem das UFC.

4.9. Tratamento dos animais em estudo

O tratamento dos camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos foi realizado diariamente, a partir de 48 horas após a infecção. O itraconazol foi utilizado na concentração de 10mg/kg/dia em água estéril por gavagem. A pomada de imiquimode 5% (Modik, Germed) foi aplicada na pata inoculada com o fungo, em quantidade equivalente a uma pequena gota por pata, com leve massagem até completa absorção. Os animais foram eutanasiados apenas no 14º dia após a infecção, uma vez que experimentos prévios indicaram esse tempo como adequado à avaliação da eficácia do tratamento.

A seguir são descritos os grupos utilizados no estudo:

a. Grupo I (não infectados): animais inoculados apenas com PBS e tratados com PBS por gavagem;
b. Grupo II (não tratados): animais infectados e tratados com PBS por gavagem;
c. Grupo III (imiquimode): animais infectados e tratados com imiquimode e PBS por gavagem;
d. Grupo IV (itraconazol): animais infectados e tratados com itraconazol;
e. Grupo V (itraconazol+imiquimode): animais infectados e tratados com imiquimode e itraconazol.

4.9.1 Índice de inflamação da pata

Após a eutanásia dos animais as patas foram cortadas com o auxílio de um alicate veterinário na mesma altura e então pesadas. O índice de inflamação foi calculado subtraindo a massa da pata direita da massa da pata esquerda.

4.9.2. Imunofenotipagem celular por citometria de fluxo

Os seguintes anticorpos monoclonais anti-camundongo foram usados: anti-CD16/CD32 purificado (clone 93), anti-CD3 FITC (clone 17A2), anti-CD4 APC (clone RM4-5), anti-CD8 PerCP-Cyanine5.5 (clone 53-6.7), anti-CD19 APC (clone eBio1D3 (1D3)), anti-RORγt PE (clone B2D), anti-T-bet PerCP-cy5.5 (clone eBio4B10) e anti-CD49b APC (clone DX5); todos obtidos da eBioscience. As células totais dos linfonodos poplíteos não estimulados foram avaliadas quanto à presença de células Th1 (células Th T-bet simples-positivas), Th17 (células Th RORγt simples-positivas), Th1/Th17 (células Th T-bet+RORγt+) e natural killer (NK; células CD3-CD49b+). Para as células totais do sangue e do baço foram avaliadas as células T *helper* ($CD3^+CD4^+$) e citotóxicas ($CD3^+CD8^+$) e células B ($CD19^+$). As células foram marcadas extracelularmente, depois fixadas e permeabilizadas com o *intracellular fixation & permeabilization buffer set* (eBioscience), quando necessário, e então marcadas intracelularmente para os fatores de transcrição T-bet e RORγt. Alternativamente, as células foram marcadas extracelularmente com anti-CD3 FITC mais anti-CD49b APC apenas. O controle da marcação inespecífica foi feito por amostras marcadas com anti-CD3 FITC mais anti-CD4 APC e incubadas com os isotipos controle PE e PerCP-cy5.5 apropriados (Th1/Th17) ou pela incubação prévia de todas as amostras com anti CD16/CD32 purificado seguida do uso de amostras incubadas apenas com os isotipos controle FITC e APC apropriados (NK). As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD Accuri C6 (BD Biosciences) e analisadas usando o software proprietário do equipamento. O limiar de aquisição das amostras foi ajustado para 800.000 no parâmetro FSC-H (*forward scatter – height*) para exclusão do *debri* celular e pelo menos 60.000 eventos foram efetivamente incluídos em cada análise. A determinação do percentual de células positivas para cada marcação foi feita pela subtração das leituras dos isotipos controle daquela dos anticorpos de interesse.

4.9.3. Quantificação de citocinas no sobrenadante das culturas através de ensaio imunoenzimático (ELISA)

As células totais do baço, obtidas conforme descrito acima, foram cultivadas em placas de cultura de tecidos de 48 poços de fundo chato, na presença da levedura termo-inativada de *S. schenckii*, na proporção de 5 leveduras para cada célula, numa concentração final de, respectivamente, 1,25 x 10^7 e 2,5 x 10^6 por mL. Concanavalina A (0,25μg/mL de concentração final em RPMI-1640C) ou somente RPMI-1640C foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente. Após 24 horas de cultivo em estufa com 5% de CO_2 a 37ºC, a concentração das citocinas IL-17, IL-10 e IFN-γ acumuladas no sobrenadante foi determinada por ELISA (eBioscience) de acordo com as instruções do fabricante. As condições da cultura foram replicadas em placas de 96 poços, em duplicata, para controle da viabilidade das células do baço através do ensaio de MTT. As densidades ópticas foram calculadas através da interpolação com a curva padrão e os resultados expressos em pg/mL.

4.9.4. Análise histológica da pata

A análise histológica da pata foi realizada utilizando a coloração de hematoxilina e eosina (H&E) para avaliar a inflamação e o método de Grocott para observar a presença de fungo. As patas foram removidas dos camundongos com o auxílio de um alicate, e colocadas em formol 10% por 24 horas. Após, foram colocadas em uma solução descalcificante (EDTA 7%) por aproximadamente um mês, para completa descalcificação, para então serem processadas, cortadas e coradas. A análise das lâminas foi feita por microscopia óptica (NIKON Eclipse E200) e as fotos foram capturadas através do *software* VD480 OPTMEDICAL.

4.10. Análise Estatística

Para realização da análise estatística dos resultados foi utilizado o programa Graph Prism versão 6.01. A análise de variância (ANOVA) de 1 ou 2 vias, com teste para comparações múltiplas de Tukey ou Sidak, respectivamente, conforme indicado. No caso dos estudos de carga fúngica foi utilizado o teste *t*-Student. O intervalo de

confiança foi definido em 95%. Foram usados grupos de 5, 6 ou mais animais, conforme indicado em cada caso.

5. RESULTADOS

5.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Inicialmente, a fim de avaliar a capacidade antifúngica direta do imiquimode, associado ou não ao itraconazol, determinou-se a CIM desses compostos ante leveduras de *S. schenckii*. O método padrão foi modificado pela adição do corante Alamar Blue para facilitar a leitura dos resultados. Na figura abaixo (**Figura 7**) é possível ver a mudança de cor do azul para o rosa, indicativa do crescimento fúngico. Os resultados mostram que, assim como o itraconazol, que apresentou uma CIM de 0,031µg/mL, o imiquimode possui ação antifúngica direta, apesar desta se manifestar apenas em concentrações maiores quando comparada ao itraconazol, que foi a partir da concentração de 4µg/mL. Além disso, foi realizado o plaqueamento do itraconazol, a fim de determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM), que foi de 0,5 µg/mL. Entretanto, a faixa de concentrações utilizada, não permitiu determinar a CFM do imiquimode (**Tabela 1**).

A fim de avaliar se esses compostos apresentam sinergismo, aplicou-se a técnica de *checkerboard*, que consiste em associar todas as possibilidades de combinações dentro de uma faixa de concentração das amostras. Interessantemente, a associação dos dois compostos resultou numa CIM equivalente à metade daquela obtida quando as substâncias foram testadas isoladamente. No entanto, quando se calcula o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) o resultado é classificado como indiferente, sugerindo ausência de sinergismo entre os compostos (**Tabela 1** e **Figura 8**).

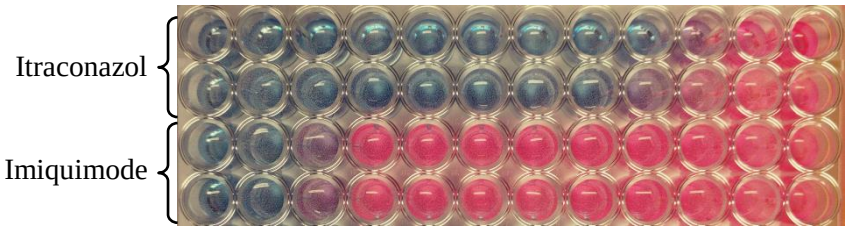


Figura 7. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Avaliação da capacidade antifúngica por microdiluição combinado com Alamar Blue, em que as leveduras de *S. schenckii* foram incubadas com diluições seriadas de itraconazol e imiquimode, a partir da concentração de 16µg/mL, por 5 dias em estufa com 5% de CO_2 a 37ºC. Os valores do CIM foram determinados pela observação da mudança de cor azul (negativo) para rosa (positivo) após a adição do Alamar Blue.

Tabela 1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Inibitória Fracionada (CIF), Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) após a adição do Alamar Blue e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Substância	CIM (µg/mL)	CIF	CFM (µg/mL)
Itraconazol	0,031	0,5	0,5
Imiquimode	4	0,5	ND*
Itraconazol + Imiquimode	0,0156 / 2	**ICIF**= 1	0,5

* Não determinada

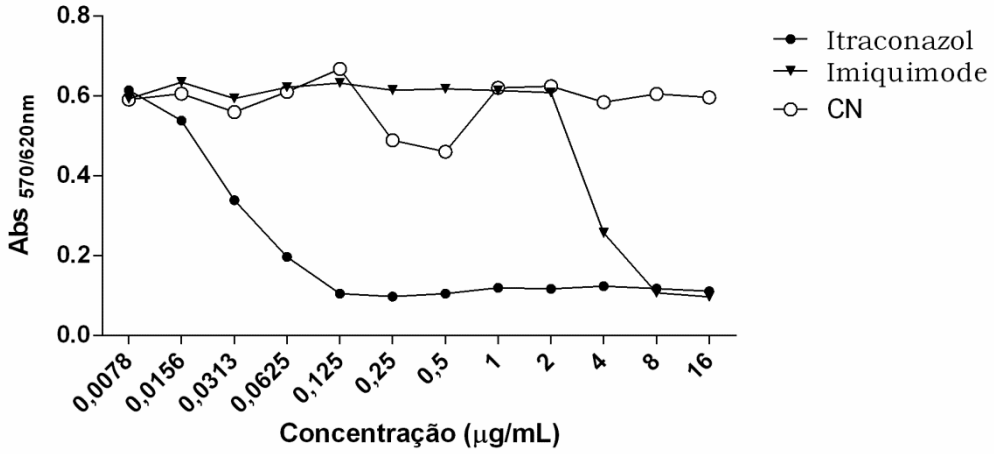


Figura 8. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM). As leveduras de *S. schenckii* foram incubadas com diluições seriadas dos compostos indicados por 5 dias em estufa com 5% de CO_2 a 37ºC. Os valores da CIM foram determinados pela leitura da absorvância em 570nm com filtro de referência de 620nm após a adição de Alamar Blue. Os resultados são apresentados como a média dos valores de três experimentos independentes.

5.2. Avaliação de inibição da formação de biofilme em placa

Inicialmente foi realizada uma padronização para avaliar se o *S. schenckii* é capaz de formar biofilme e as melhores condições para sua formação, para posterior avaliação de atividade inibitória do biofilme pelos compostos do estudo. O que se observou é que após 24 horas houve uma formação de biofilme estável em placa e este resultado foi comprovado através de microscopia (**Figura 9**).

Levando-se em conta que *S. schenckii* é capaz de formar biofilme, decidiu-se avaliar o potencial dos compostos de inibirem a formação ou desestruturarem o biofilme já formado. O imiquimode mostrou-se capaz de inibir diretamente a formação do

biofilme, ainda que, apenas em concentrações maiores quando comparado ao itraconazol (**Figura 10A**). Este, por sua vez, foi capaz de inibir a formação do biofilme em todas as concentrações testadas, seja de forma isolada ou em associação ao imiquimode. É importante notar que aqui também não foi observado nenhum efeito sinérgico ou aditivo quando os dois compostos foram usados em associação. Os valores de $PCIM_{50}$ foram de 4µg/mL para o itraconazol e de 16µg/mL para o imiquimode e para a associação (**Tabela 2**).

Quando os compostos foram testados quanto à capacidade de desestruturar o biofilme já formado, observou-se um padrão muito semelhante ao anterior (**Figura 10B**). Destaca-se que os valores de $SCIM_{50}$ foram, de forma geral, menores que os de $PCIM_{50}$ (**Tabela 2**).

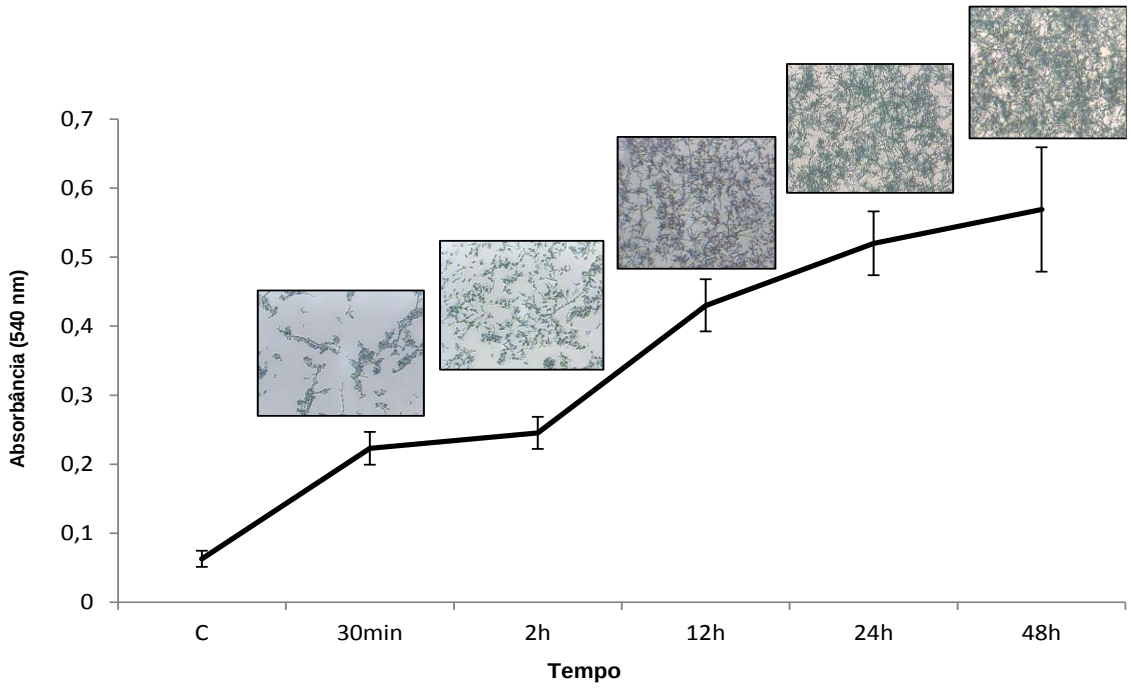


Figura 9. Formação de biofilme em placa. As leveduras de *S. schenckii* foram incubadas em estufa com 5% de CO_2 a 37ºC, em placa de 96 poços. A quantificação da atividade metabólica de biofilme foi determinada por meio do método de MTT nos tempos indicados. As imagens mostradas são representativas do estágio de formação do biofilme. Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

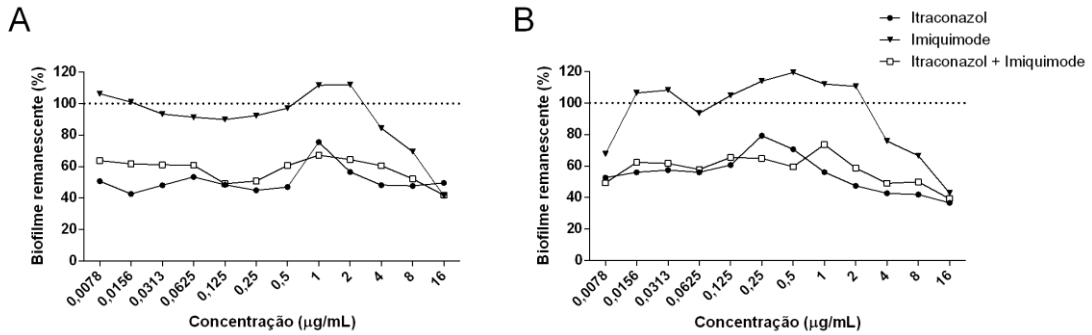


Figura 10. Avaliação da inibição da formação e desestruturação do biofilme em placa. Leveduras de *S. schenckii* foram incubadas em estufa com 5% de CO_2 a 37ºC em placa de 96 poços para permitir a formação de biofilme. Os compostos indicados foram incubados junto com o fungo para avaliação da inibição na formação do biofilme (**A**) ou após o biofilme já estar formado para avaliação da capacidade de desestruturar o biofilme (**B**). Em ambos os testes, a avaliação da formação do biofilme foi realizada por meio do método de MTT. Os resultados apresentados são a média de dois experimentos independentes.

Tabela 2. Valores da Concentração inibitória mínima planctônica ($PCIM_{50}$) e Concentração inibitória mínima séssil ($SCIM_{50}$) do itraconazol e imiquimode, isolados ou associados, contra *S. schenckii*

Substância	$PCIM_{50}$ (µg/mL)	$SCIM_{50}$ (µg/mL)
Itraconazol	4	2
Imiquimode	16	16
Itraconazol + Imiquimode	16	4

5.3. Espectrometria de massas com ionização por *Electrospray*

Para descartar a possibilidade de interação entre o imiquimode e o itraconazol quando associados, foi realizada uma avaliação por espectrometria de massas. De acordo com a estrutura dos compostos, esperava-se que poderia ocorrer uma reação semelhante à de formação de iminas (**Figura 11**), que resultaria em um pico m/z 928, o qual não foi encontrado (**Figura 12**). Além disso, os picos referentes ao imiquimode (m/z 241) e ao itraconazol (m/z 705) foram encontrados, indicando a presença das duas substâncias livres em solução, mesmo quando os compostos foram usados em associação.

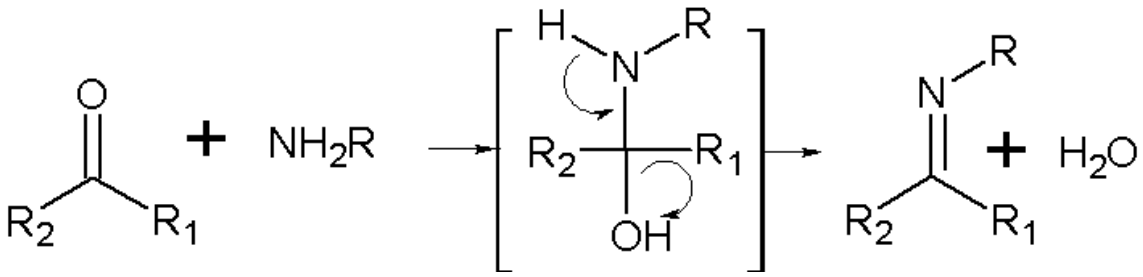


Figura 11. Reação de formação de iminas.

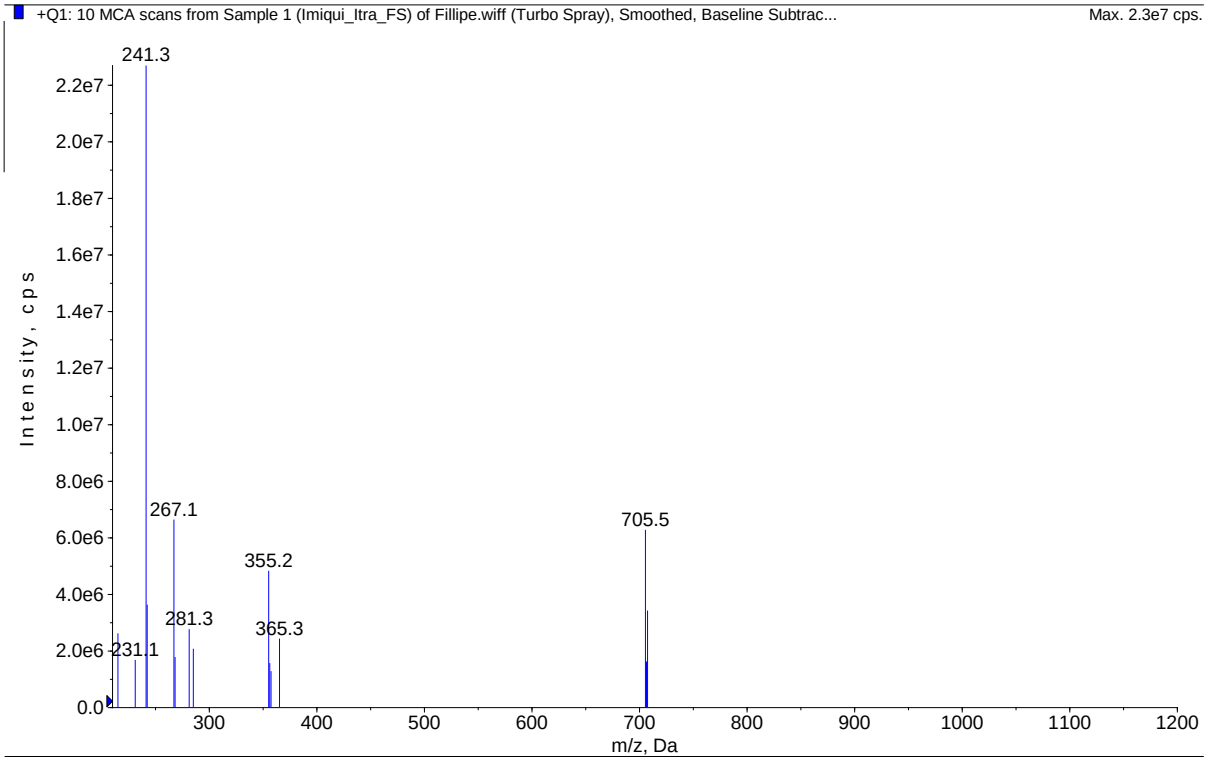


Figura 12. Espectro de massas da mistura de imiquimode e itraconazol, por varredura de íons (210 – 1200 Da) por infusão direta (fluxo de 10uL/min).

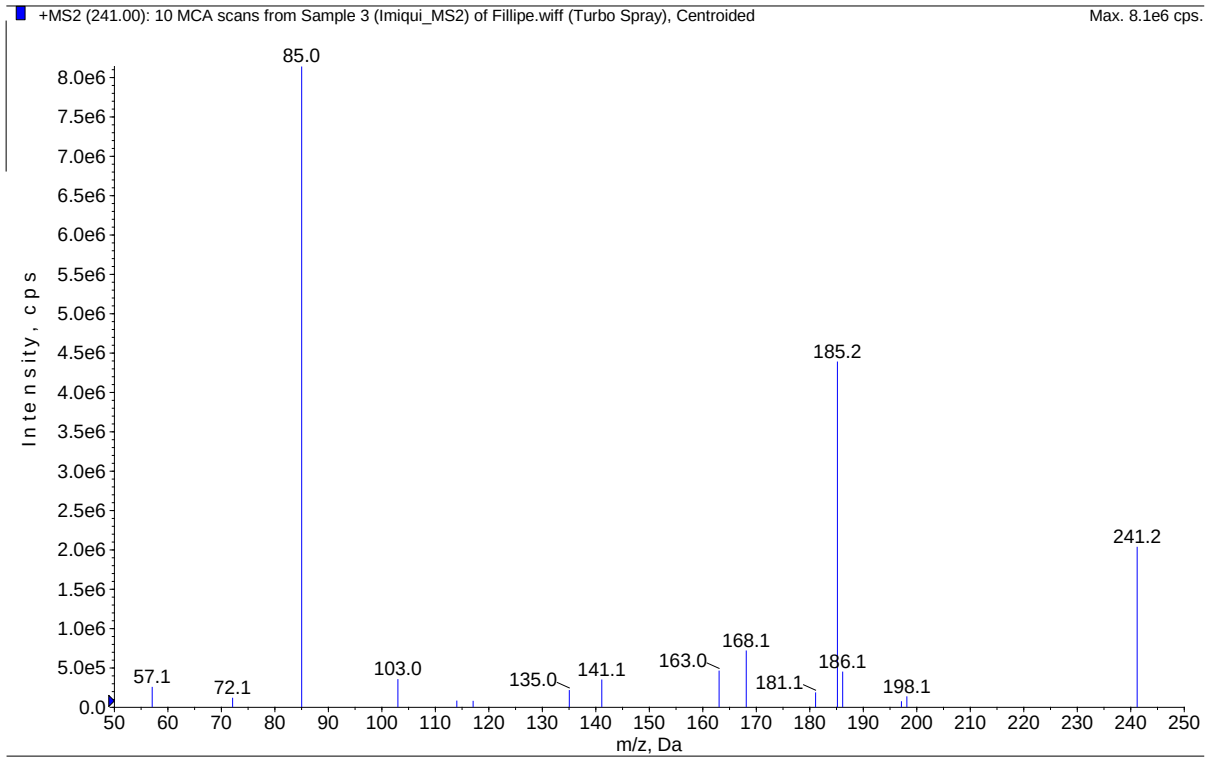


Figura 13. Espectro de íons fragmentos de *m/z* 241 (imiquimode).

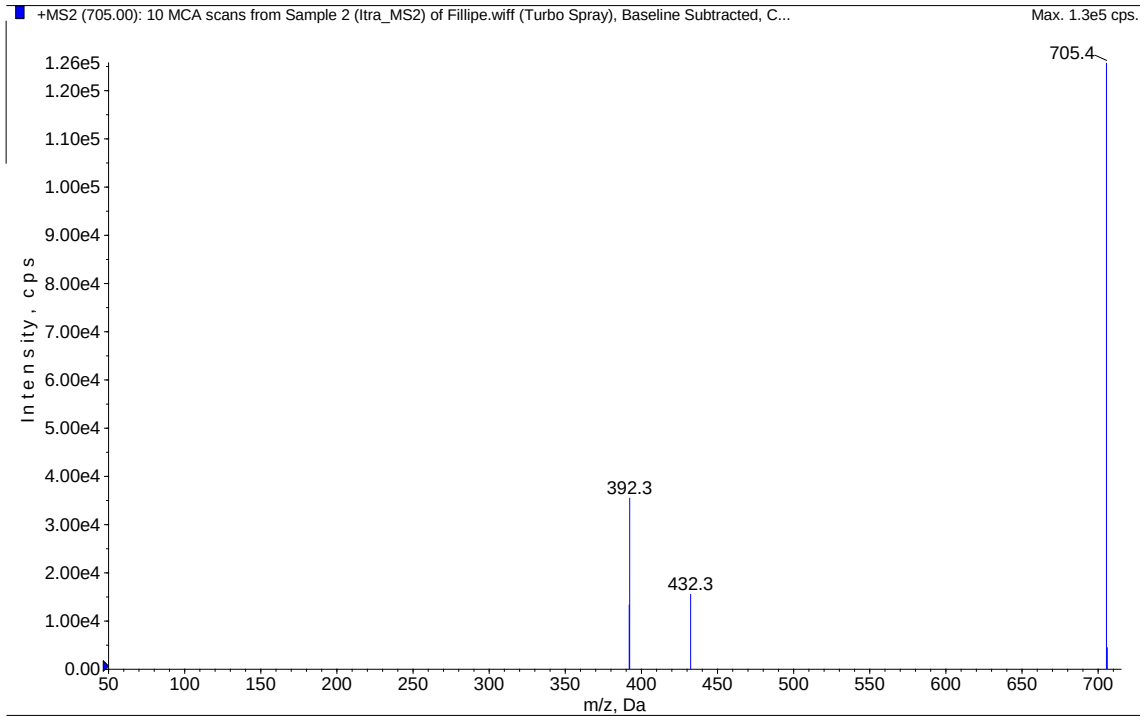


Figura14. Espectro de íons fragmentos de *m/z* 705, referente ao itraconazol.

5.4. Determinação da atividade fungicida de macrófagos

Com o objetivo de avaliar se o imiquimode e o itraconazol são capazes de potencializar a atividade fungicida dos macrófagos, primeiramente foi realizado um controle em lâmina para confirmar a presença de fagocitose das leveduras pelos macrófagos. Como pode ser visto na **Figura 15**, nas condições testadas, os macrófagos se mostraram capazes de fagocitar as leveduras de *S. schenckii*.

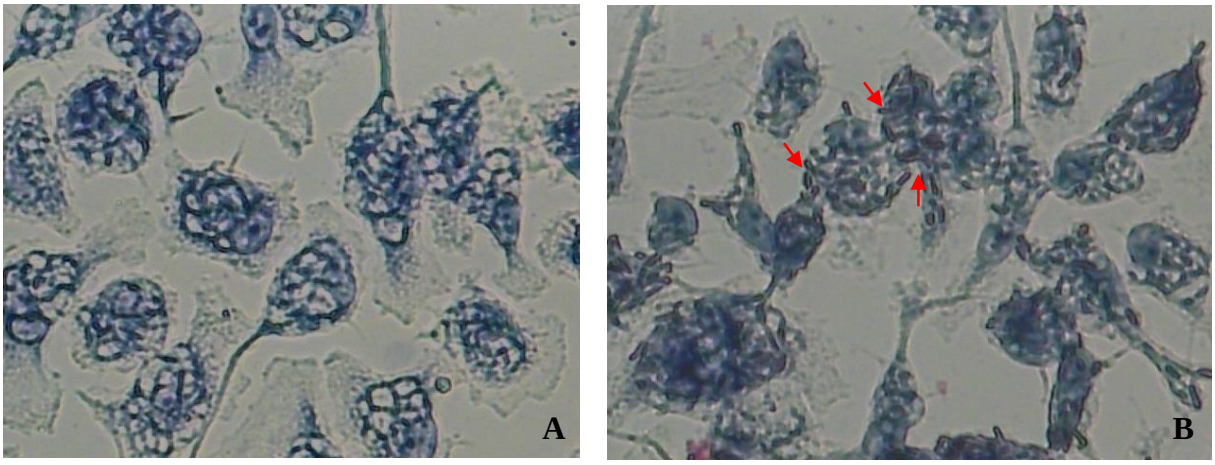


Figura 15. Determinação da presença de fagocitose nos macrófagos. Macrófagos peritoneais foram incubados junto com leveduras de *S. schenckii* na proporção de 1:3 em estufa com 5% de CO2 a 37ºC por 24 horas em lâminas Lab-Tek. A ocorrência de fagocitose foi visualizada pela coloração de Giemsa. Macrófagos peritoneais incubados na ausência (**A**) ou na presença (**B**) das leveduras (setas).

Ao contrário do itraconazol, que apresentou efeito nas concentrações de 4 e 1µg/mL, o imiquimode não se mostrou capaz de potencializar a atividade fungicida dos macrófagos em nenhuma das concentrações testadas (**Figura 16**). Entretanto, como os resultados apresentaram grande desvio, o ensaio foi repetido para que fosse possível testar uma faixa de concentração maior para o imiquimode, além que as mesmas concentrações foram testadas em macrófagos de animais imunocompetentes e imunossuprimidos, sendo que o imiquimode apresentou ação a partir da concentração de 4µg/mL em macrófagos de animais imunocompetentes e 8µg/mL nos imunossuprimidos (**Figura 17**).

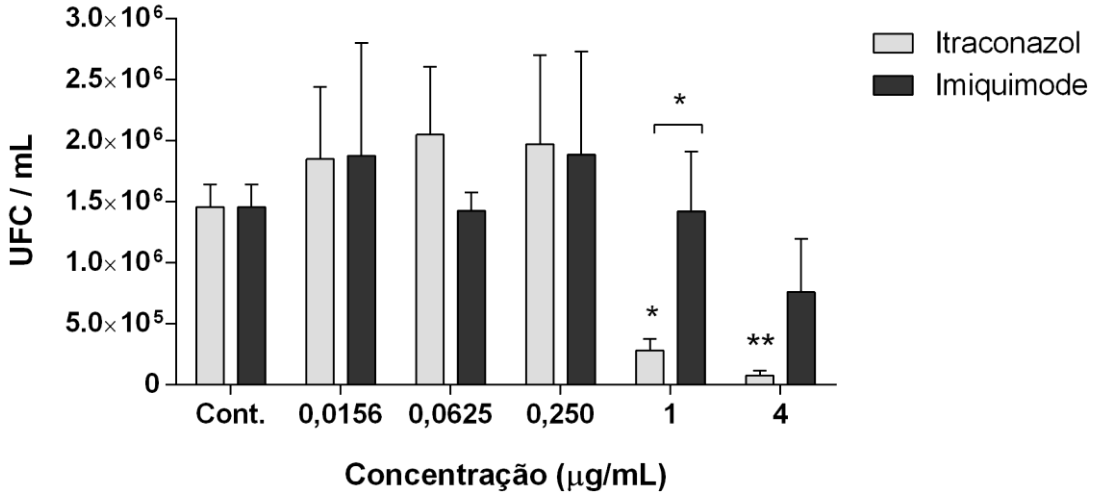


Figura 16. Determinação da atividade fungicida de macrófagos. Macrófagos peritoneais foram incubados com leveduras de *S. schenckii* na proporção de 1:3 (macrófago:levedura), na presença ou ausência dos compostos indicados, em estufa com 5% de CO2 a 37ºC por 24 horas em placas de cultura de tecidos de 24 poços. Após, os macrófagos foram lisados e a suspensão resultante foi plaqueada em ágar Mycosel para determinação das UFC remanescentes. A significância estatística foi determinada por ANOVA de 2 vias usando o teste de comparações múltiplas de Sidak e intervalo de confiança em 95%. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão dos valores de quatro animais. *($p< 0,05$) e **($p< 0,01$) para a comparação entre os dois grupos com o controle e em cada concentração.

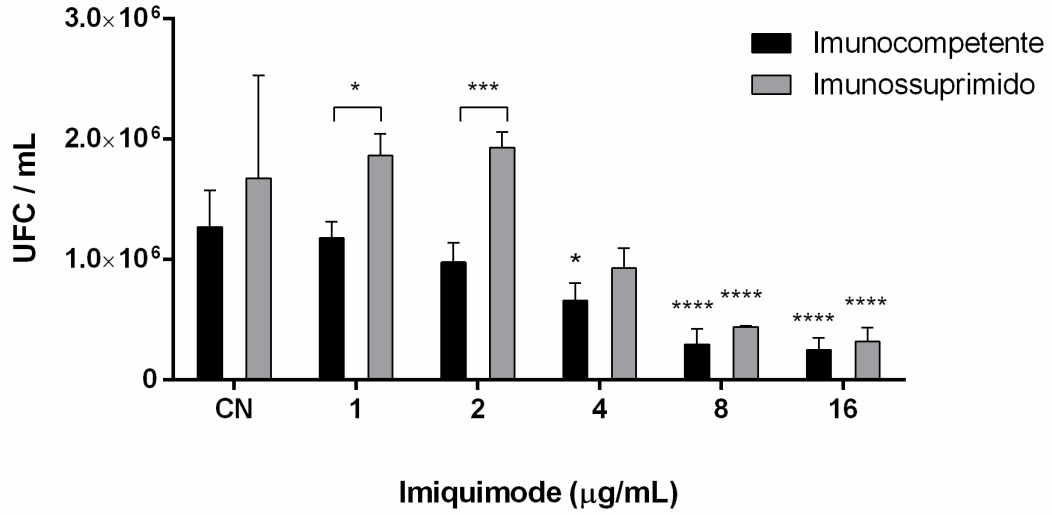


Figura 17. Determinação da atividade fungicida de macrófagos em animais imunocompetentes e imunossuprimidos. Macrófagos peritoneais foram incubados com leveduras de *S. schenckii* na proporção de 1:3 (macrófago:levedura), na presença ou ausência de diferentes concentrações de imiquimode, em estufa com 5% de CO2 a 37ºC por 24 horas em placas de cultura de tecidos de 24 poços. Após, os macrófagos foram lisados e a suspensão resultante foi plaqueada em ágar Mycosel para determinação das UFC remanescentes. A significância estatística foi determinada por ANOVA de 1 via usando o teste de comparações múltiplas de Tukey e intervalo de confiança em 95%. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão dos valores de cinco animais. *($p< 0,05$) e ****($p< 0,0001$) para a comparação entre as diferentes concentrações de imiquimode.

No sobrenadante do teste anterior, dosaram-se as citocinas TNF-α e IL-10. Todas as concentrações testadas de imiquimode foram capazes de estimular a liberação de TNF-α de forma inversamente proporcional à concentração pelos macrófagos dos camundongos imunocompetentes, enquanto que pelos macrófagos dos animais imunossuprimidos a liberação foi menor e, no geral, sem diferença significativa (**Figura 18A**). Já para a IL-10 não houve diferença entre o controle e as diferentes concentrações de imiquimode. Entretanto, apesar de não significativa, a liberação de IL-10 foi visivelmente maior nas maiores concentrações de imiquimode pelos macrófagos dos animais imunocompetentes. Interessantemente, a liberação de IL-10 pelos macrófagos dos animais imunossuprimidos, no geral, foi maior que dos imunocompetentes, e somente a maior concentração imiquimode testada que apresentou diferença significa em relação ao controle (**Figura 18B**).

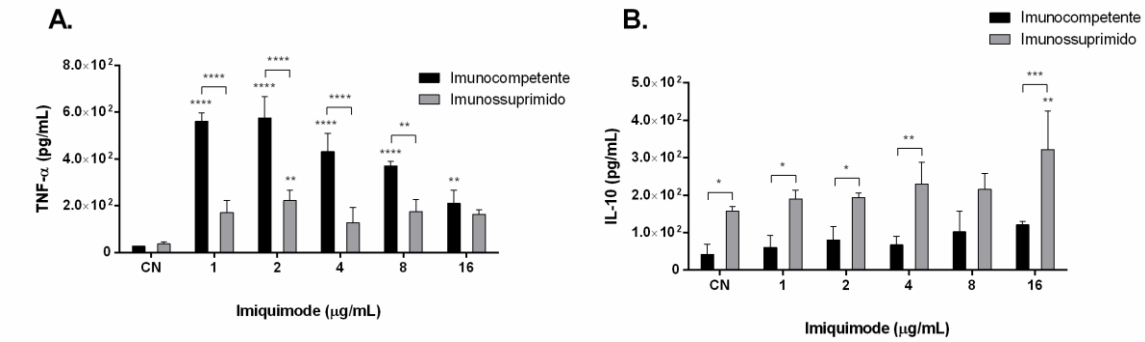


Figura 18. Liberação de citocinas de cultura de macrófagos. As leveduras de *S. schenckii* que foram fagocitadas pelos macrófagos peritoneais de camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos, foram colocadas em contato com diferentes concentrações de imiquimode, incubados em estufa por 24 horas com 5% de CO_2. Após, o sobrenadante foi colhido e as citocinas TNF-α. (**A**) e IL-10 (**B**) foram dosadas. A significância estatística foi determinada por ANOVA de 1 via usando o teste de comparações múltiplas de Tukey e intervalo de confiança em 95%. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de cinco animais. *($p< 0,05$); **($p< 0,01$); ***($p< 0,001$) e ****($p< 0,0001$) para a comparação com o controle negativo em cada ponto respectivo ou conforme indicado.

5.5. Determinação de NO

Na determinação do óxido nítrico observa-se que o imiquimode foi capaz de induzir a produção de NO em cultura de macrófagos peritoneais nas maiores concentrações testadas, enquanto o itraconazol não estimulou os macrófagos a liberar óxido nítrico (**Figura 19**).

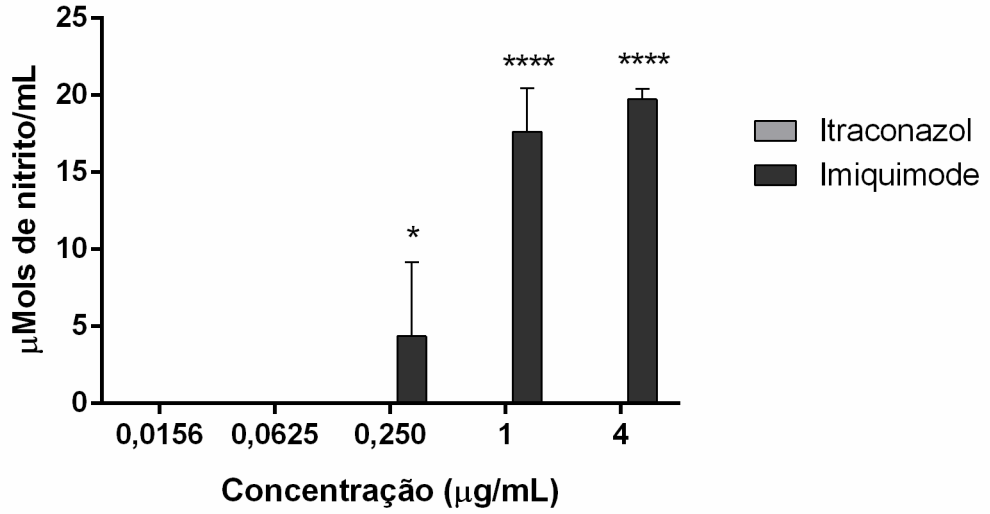


Figura 19. Produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais. Os macrófagos foram colocados em contato com diferentes concentrações de itraconazol e imiquimode e incubados por 24 horas em estufa com 5% de CO_2 a 37ºC. A concentração de óxido nítrico foi determinada no sobrenadante da cultura pelo método de Griess. A significância estatística foi determinada por ANOVA de 2 vias usando o teste de comparações múltiplas de Sidak e intervalo de confiança em 95%. Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão de quatro animais *(p< 0,05) e****(p< 0,001) para a comparação entre os grupos em cada concentração.

5.6. Desenvolvimento de modelo de esporotricose em camundongos imunossuprimidos e imunocompetentes

5.6.1. Padronização da infecção

A infecção foi realizada pela via s.c. no coxim do metacarpo da pata traseira esquerda e os camundongos foram eutanasiados a cada 3 dias para acompanhamento da carga fúngica do linfonodo poplíteo drenante e do baço. Como mostrado na **Figura 20**, a infecção local atinge o pico por volta de uma semana pós-infecção e depois regride gradativamente até a completa eliminação do fungo pela maioria dos animais no dia 60 pós-infecção. Por outro lado, a infecção se torna sistêmica tão cedo como no dia 3 pós-infecção e, acompanhando a continuada regressão da infecção local, o número de UFC recuperadas do baço diminui até atingir um mínimo no dia 15 pós-infecção, embora alguns animais não sejam capazes de zerar a carga fúngica mesmo no dia 60 pós-infecção.

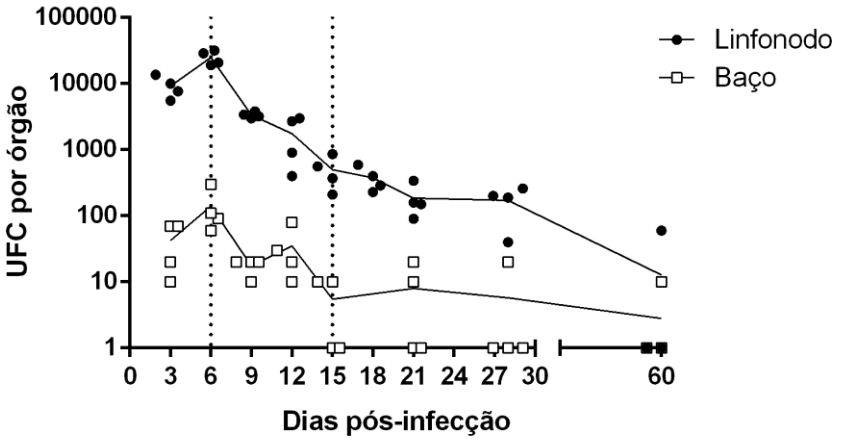


Figura 20. Cinética da infecção. Camundongos Balb/c foram infectados pela via subcutânea s.c. no coxim do metacarpo da pata traseira esquerda com 1,6 × 10^7 leveduras de S. schenckii e eutanasiados nos dias indicados. A carga fúngica no baço e linfonodo poplíteo foi determinada pela recuperação de UFC desses órgãos. Os resultados estão apresentados como valores individuais de 4 animais, com a linha na média. Contagens iguais a zero estão apresentadas como 1 (um) para que possam ser mostradas em escala logarítmica e, como resultado, aparecem na base do eixo "y", sobre a linha do eixo "x". As linhas pontilhadas representam os dias selecionados para a condução dos experimentos posteriores.

O peso relativo do baço (**Figura 21**) apresenta-se aumentado no pico da infecção e, com o passar dos dias, diminui juntamente com a carga fúngica. O primeiro ponto do gráfico representa o peso relativo basal, medido em animais controle.

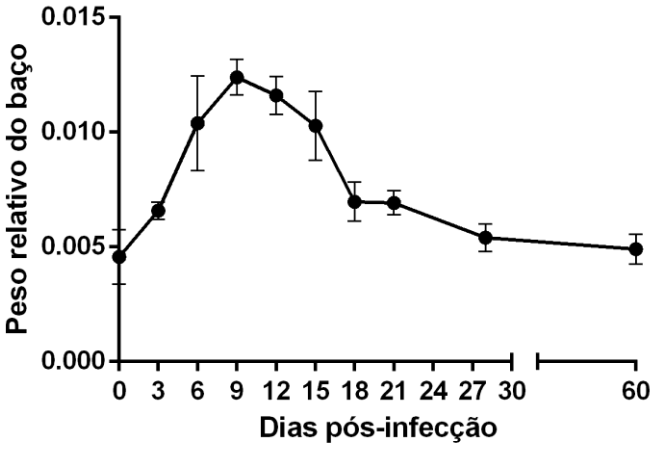


Figura 21. Peso relativo do baço. Camundongos Balb/c foram infectados pela via subcutânea s.c. no coxim do metacarpo da pata traseira esquerda com 1,6 × 10^7 leveduras de S. schenckii e eutanasiados nos dias indicados. O peso relativo do baço foi determinado como o peso do baço dividido do peso do animal. Os resultados estão apresentados como a média ± desvio padrão de 4 animais.

Diante dos resultados obtidos na cinética da infecção, os dias 7 e 14 pós-infecção foram selecionados para a condução dos demais experimentos de forma a permitir a avaliação dos parâmetros propostos numa fase precoce e em outra mais avançada da infecção.

5.6.2. Padronização da imunossupressão

A imunossupressão foi realizada com uma dose inicial de ciclofosfamida três dias antes da infecção e uma dose de reforço 6 dias pós-infecção. Para avaliação da imunossupressão foi realizada a fenotipagem de linfócitos do sangue e baço dos animais a fim de verificar redução da frequência de linfócitos T *helper*: $CD3^+CD4^+$, linfócitos T citotóxicos: $CD3^+CD8^+$ e linfócitos B: $CD19^+$. A estratégia de gating é apresentada na **Figura 22**. A **Figura 23** mostra que a frequência de células T *helper* e citotóxicas e células B no baço dos camundongos que receberam CY, infectados ou não, foi significativamente menor quando comparados aos controles (PBS e fungo). Essa diferença significativa existiu tanto no dia 7, como no dia 14 pós-infecção. Ainda, a manutenção da frequência diminuída de linfócitos T e B no baço dos animais até o 14º dia após a infecção evidenciam a eficiência da dose de reforço utilizada.

Analisando os resultados de frequência de linfócitos no sangue não houve diferença significativa entre os grupos, embora aqueles que receberam ciclofosfamida tenham apresentado uma diminuição da frequência das populações avaliadas.

Em conclusão, estes resultados apontam que o protocolo de administração de CY, com doses de reforço de 150mg/kg a cada 9 dias, resultou na imunossupressão dos animais, com diminuição da frequência de importantes células do sistema imunológico.

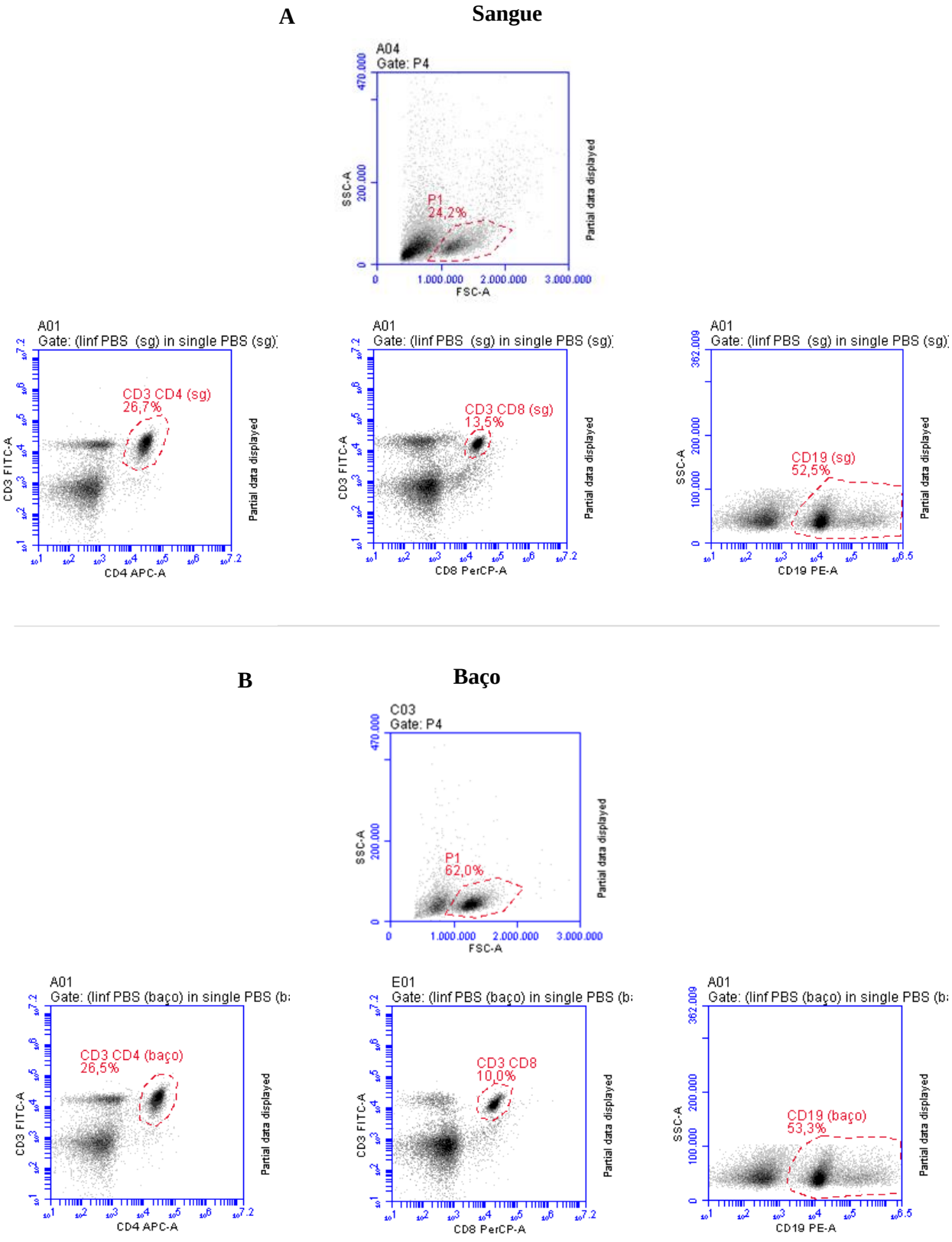


Figura 22. *Dot plots* representativos do *gate* de linfócitos totais. Com base no tamanho (*forward scatter*, FSC) e granulosidade celular (*side scatter*, SSC), e *gate* das populações de linfócitos T *helper* ($CD3^+CD4^+$), citotóxicos ($CD3^+CD8^+$) e linfócitos B ($CD19^+$) do sangue (**A.**) e baço (**B.**) dos animais.

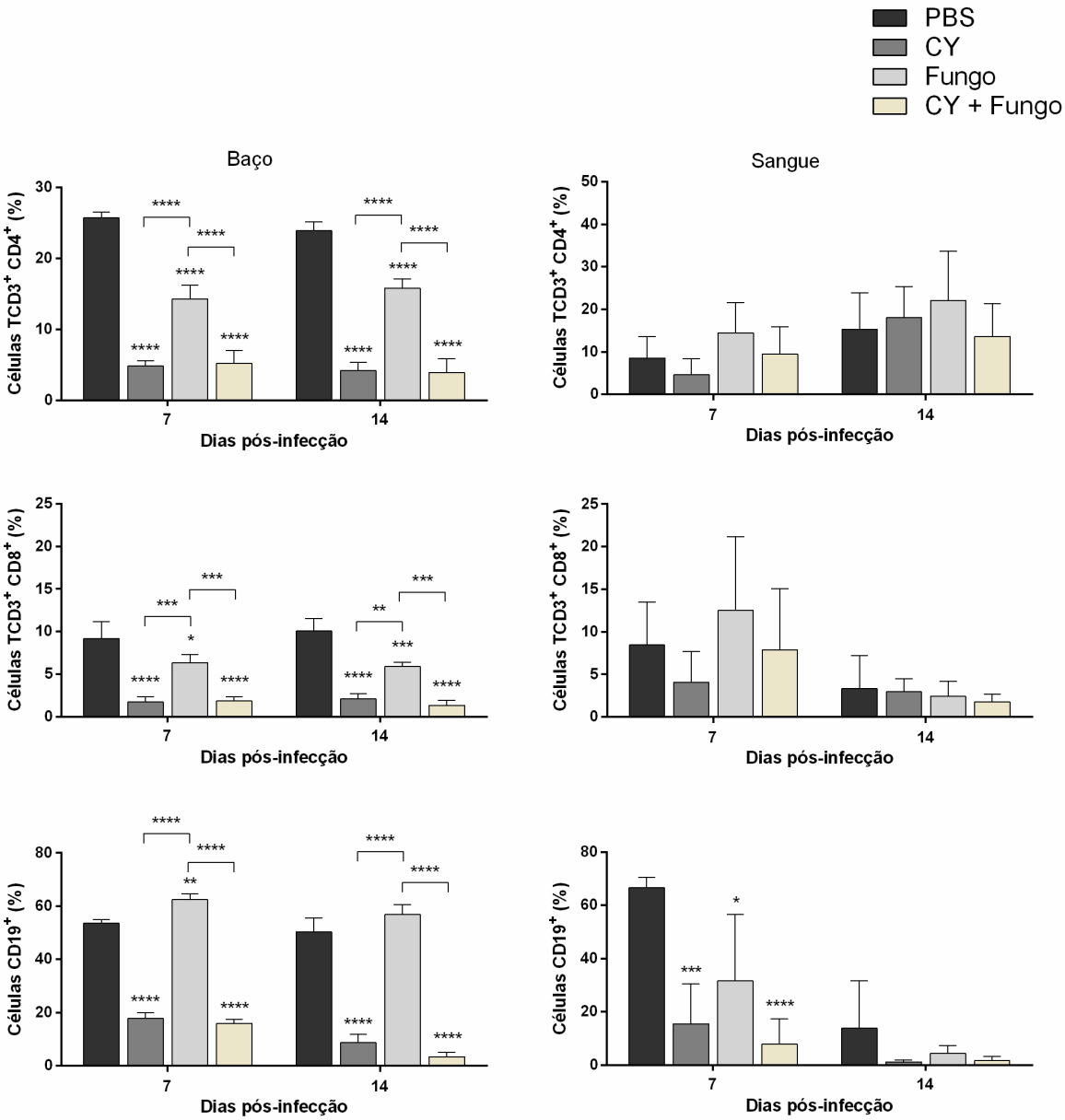


Figura 23. Avaliação da frequência de células T *helper*, T citotóxicas e B no baço e sangue. Camundongos Balb/c, imunossuprimidos ou não com CY, foram inoculados pela via s.c. com $1{,}6 \times 10^7$ leveduras de *S. schenckii* em PBS (infectado"CY + fungo" ou "fungo") ou somente com PBS estéril (controle"CY" ou "PBS"). Nos dias indicados, os camundongos, imunossuprimidos ou não, foram eutanasiados e as células do baço e do sangue foram marcadas conforme mostrado A significância estatística foi determinada por ANOVA de 2 vias usando o teste de comparações múltiplas de Tukey e intervalo de confiança em 95%. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de 6 animais em 2 experimentos independentes. *($p< 0{,}05$); **($p< 0{,}01$); ***($p< 0{,}001$); ****($p< 0{,}0001$) para comparações com o grupo PBS em cada ponto respectivo ou conforme indicado.

A avaliação da carga fúngica nos animais imunossuprimidos mostrou que, conforme pode ser visto na **Figura 24**, apesar da infecção ser primariamente local, esta foi capaz de se espalhar e atingir o nível sistêmico já no dia 7 pós-infecção, conforme demonstrado pela recuperação de formas viáveis do fungo do baço dos animais. A imunossupressão parece ter tornado os animais mais suscetíveis ao espalhamento sistêmico do fungo, e no dia 14 pós-infecção a carga fúngica nos animais imunossuprimidos está maior que aquela encontrada nos animais apenas infectados.

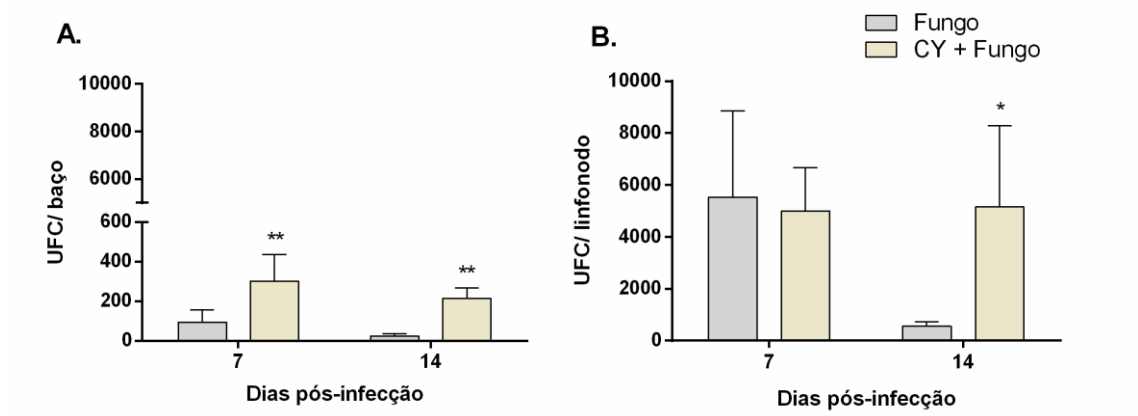


Figura 24. Avaliação da suscetibilidade de animais imunossuprimidos à infecção por *S. schenckii*. Camundongos Balb/c, imunossuprimidos ou não, foram inoculados pela via s.c. com $1{,}6 \times 10^7$ leveduras de *S. schenckii* em PBS. Nos dias indicados, os camundongos foram eutanasiados e o baço (**A**) e o linfonodo poplíteo (**B**) foram removidos para determinação da carga fúngica. A significância estatística foi determinada por ANOVA de 2 vias usando o teste de comparações múltiplas de Tukey e intervalo de confiança em 95%. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de 6 animais em 2 experimentos independentes. *($p < 0{,}05$) e **($p < 0{,}01$) para a comparação entre os grupos em cada ponto.

Por outro lado, tanto o índice esplênico como o peso relativo do baço tiveram um aumento significativo nos animais imunossuprimidos e infectados quando comparados a todos os outros grupos (**Figura 25**). Interessantemente, os animais apenas imunossuprimidos apresentaram índice esplênico e peso relativo do baço aumentados, em nível semelhante àquele dos animais apenas infectados (Fungo), quando comparado aos animais controle (PBS).

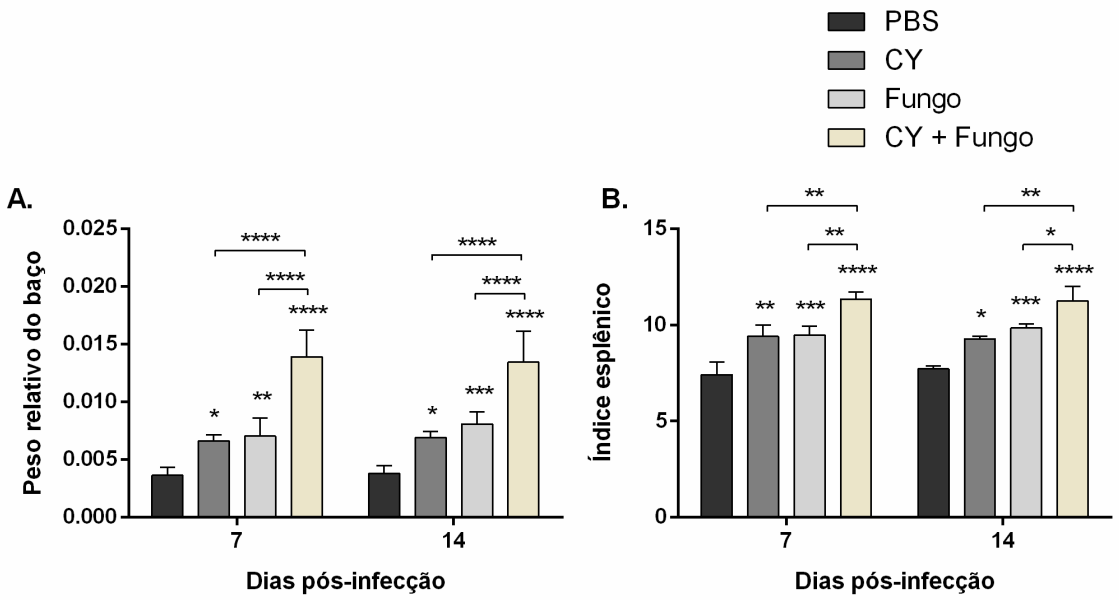


Figura 25. Determinação do peso relativo do baço e índice esplênico. Camundongos Balb/c, imunossuprimidos ou não com CY, Os camundongos foram inoculados pela via s.c. com $1{,}6 \times 10^7$ leveduras de *S. schenckii* em PBS (CY + fungo ou fungo) ou somente com PBS estéril (CY ou PBS). Nos dias indicados, os camundongos foram eutanasiados e o baço foi removido para determinação de seu peso relativo (peso do baço/peso do animal) (**A**) e índice esplênico (comprimento x largura x espessura) (**B**). A significância estatística foi determinada por ANOVA de 2 vias usando o teste de comparações múltiplas de Tukey e intervalo de confiança em 95%. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de 6 animais em 2 experimentos independentes. *($p< 0{,}05$); **($p< 0{,}01$); ***($p< 0{,}001$); ****($p< 0{,}001$), para comparações com o grupo controle (PBS) em cada ponto respectivo ou conforme indicado.

O peso relativo do timo foi notavelmente reduzido nos camundongos que receberam a CY, infectados ou não, especialmente no dia 14 pós- infecção com diferença significativa entre esses grupos (**Figura 26**).

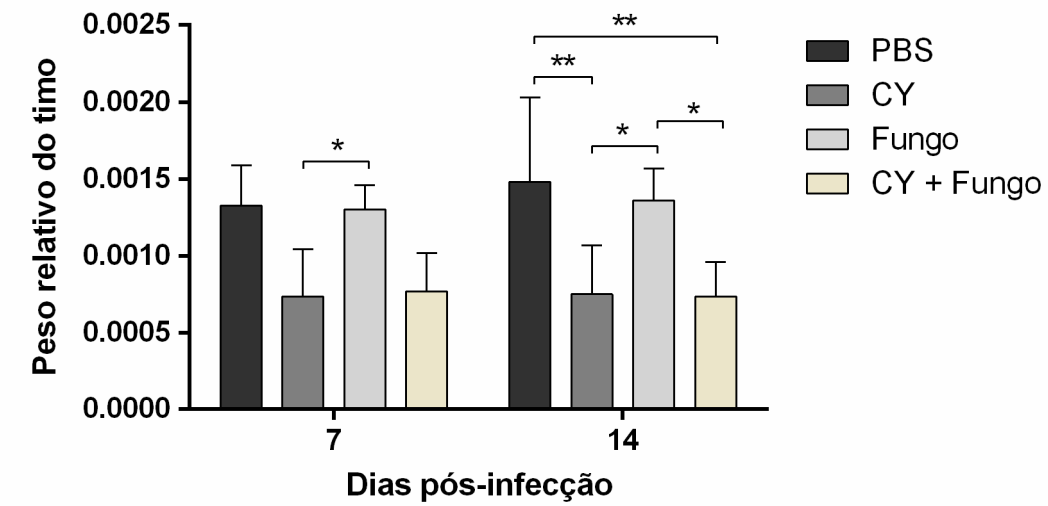


Figura 26. Peso relativo do timo. Camundongos Balb/c, imunossuprimidos ou não com CY, foram inoculados pela via s.c. com 1,6 × 10^7 leveduras de *S. schenckii* em PBS (CY + fungo ou fungo) ou somente com PBS estéril (CY ou PBS). Nos dias indicados, os camundongos foram eutanasiados, e o timo removido para determinação de seu peso relativo (peso do timo/ peso do animal). A significância estatística foi determinada por ANOVA de 2 vias usando o teste de comparações múltiplas de Tukey e intervalo de confiança em 95%. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de 6 animais em 2 experimentos independentes. *($p< 0,05$) e **($p< 0,01$), para comparações com o grupo controle (PBS) em cada ponto respectivo ou conforme indicado.

A **Figura 27** ilustra secções histológicas de baços de animais imunossuprimidos ou não, 7 e 14 dias pós-infecção com *S. schenckii* ou não. Os baços dos camundongos que receberam apenas PBS apresentam sua morfologia normal tanto no dia 7 como no dia 14 pós-infecção, com centros germinativos definidos e a relação normal de celularidade de polpa branca (PB) contendo linfócitos e células imunes, e polpa vermelha (PV). Já no baço dos camundongos imunossuprimidos (infectados e não infectados), é possível observar a desorganização da zona marginal e a ausência de centros germinativos, com diminuição da celularidade da polpa branca. No dia 7 pós-infecção esta característica parece ser mais evidente. Também no baço deste mesmo dia, observou-se infiltração da polpa vermelha com células mielóides, sinal de hematopoiese extramedular (HEM) no grupo imunossuprimido. A infiltração das células mielóides foi menor no grupo infectado e imunossuprimido (CY+fungo), e apresentou-se muito reduzida no dia 14 do estudo, sendo observada apenas nas áreas periféricas da polpa vermelha. O baço dos animais infectados apresentou morfologia normal, com a presença de centros germinativos. Mas o baço dos animais imunossuprimidos e infectados tem morfologia semelhante ao baço dos imunossuprimidos e não infectados,

com diferenças entre os dias 7 e 14 pós-infecção. No sétimo dia, os centros germinativos parecem tentar retomar sua estrutura natural, organizada devido à presença do fungo. Contudo, no dia 14, com carga fúngica já reduzida, verifica-se novamente uma diminuição da celularidade da polpa branca do baço e uma ausência de centros germinativos.

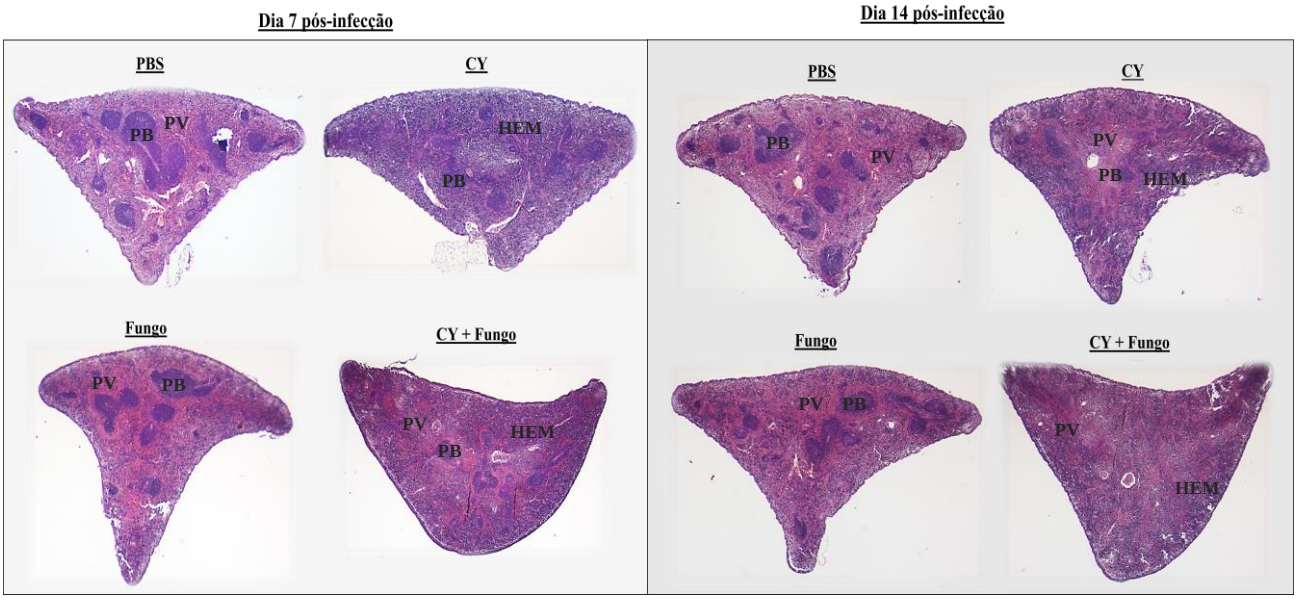
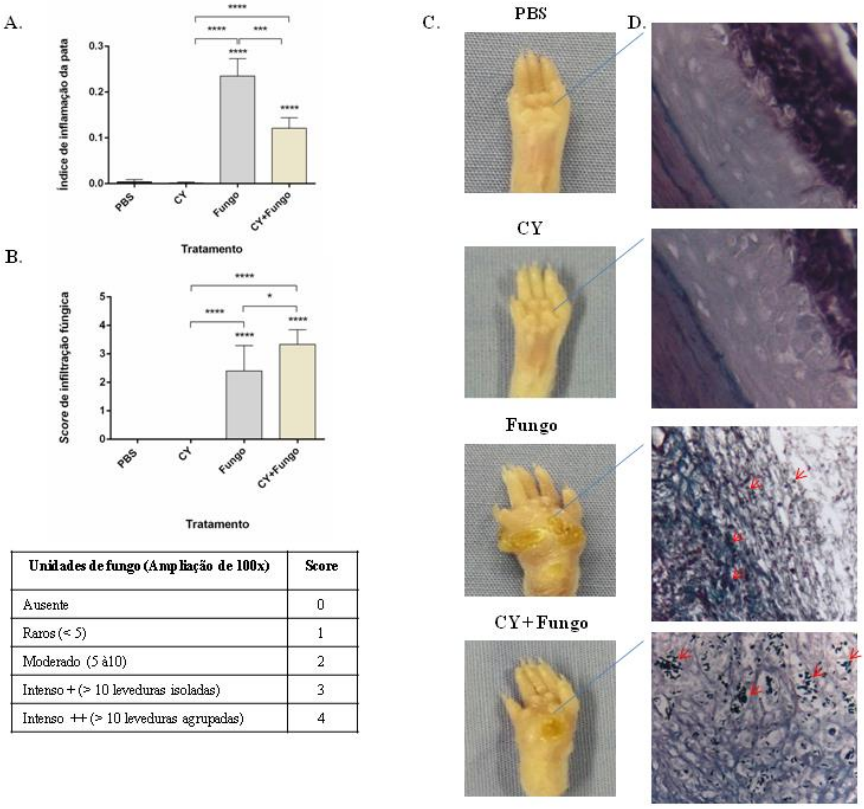


Figura 27. Avaliação histológica do baço. Camundongos Balb/c, imunossuprimidos ou não com CY, foram inoculados pela via s.c. com 1,6 × 10^7 leveduras de S. schenckii em PBS (Fungo ou CY+fungo) ou somente com PBS estéril (PBS ou CY). Nos dias indicados, os camundongos foram eutanasiados e o baço foi removido, processado e corado por H&E.

Na **Figura 28** observamos que apesar de os animais apenas infectados apresentarem um índice de inflamação da pata maior que dos animais infectados e imunossuprimidos, a quantidade de fungo encontrada na pata foi maior e com presença de aglomerados de leveduras.



Unidades de fungo (Ampliação de 100x)	Score
Ausente	0
Raros (< 5)	1
Moderado (5 à10)	2
Intenso + (> 10 leveduras isoladas)	3
Intenso ++ (> 10 leveduras agrupadas)	4

Figura 28. Índice de inflamação da pata e avaliação histológica da presença de *S. schenckii* na pata. Camundongos Balb/c, imunossuprimidos ou não com CY, foram inoculados pela via s.c. com $1{,}6 \times 10^7$ leveduras de *S. schenckii* em PBS (Fungo ou CY+fungo) ou somente com PBS estéril (PBS ou CY). O índice de inflamação das patas foi obtido através da diferença de massa entre as patas direita e esquerda em animais imunocompetentes e imunossuprimidos (**A**). Avaliação histológica da presença das leveduras nos cortes das patas (**B**) foi feita de forma visual de acordo com a tabela abaixo do gráfico. Fotos das patas (**C**) com seu respectivo corte histológico corado com Grocott (**D**). A significância estatística foi determinada por ANOVA de 1 via usando o teste de comparações múltiplas de Tukey e intervalo de confiança em 95%. Os resultados são apresentados como a média ± desvio padrão dos valores de 6 animais de 2 experimentos independentes. *($p < 0{,}05$), ***($p < 0{,}001$) e ****($p < 0{,}001$), para comparações com o grupo controle (PBS) em cada ponto respectivo ou conforme indicado.

5.7. Avaliação da eficácia do tratamento

Durante o tratamento foi possível observar que todos os animais infectados apresentaram sinais clínicos de doença, como o pelo eriçado, porém os animais tratados apenas com imiquimode ou a associação (imiquimode e itraconazol) apresentaram, também, uma diminuição do peso corporal (dados não mostrados).

A eutanásia dos animais foi realizada no dia 14 pós-infecção de acordo com resultados obtidos anteriormente. O primeiro parâmetro analisado foi o índice de inflamação das patas (**Figura 29**). Nos gráficos abaixo é possível notar que todos os

grupos infectados tiveram um índice muito maior que do grupo não infectado, porém nenhum dos tratamentos foi capaz de alterar o nível de inflamação nos camundongos imunocompetentes (**Figura 29B**) nem nos imunossuprimidos (**Figura 29C**). É possível observar que os valores do índice de inflamação da pata dos animais imunocompetentes são maiores do que dos imunossuprimidos, conforme pode ser notado nas fotos da **Figura 29A**.

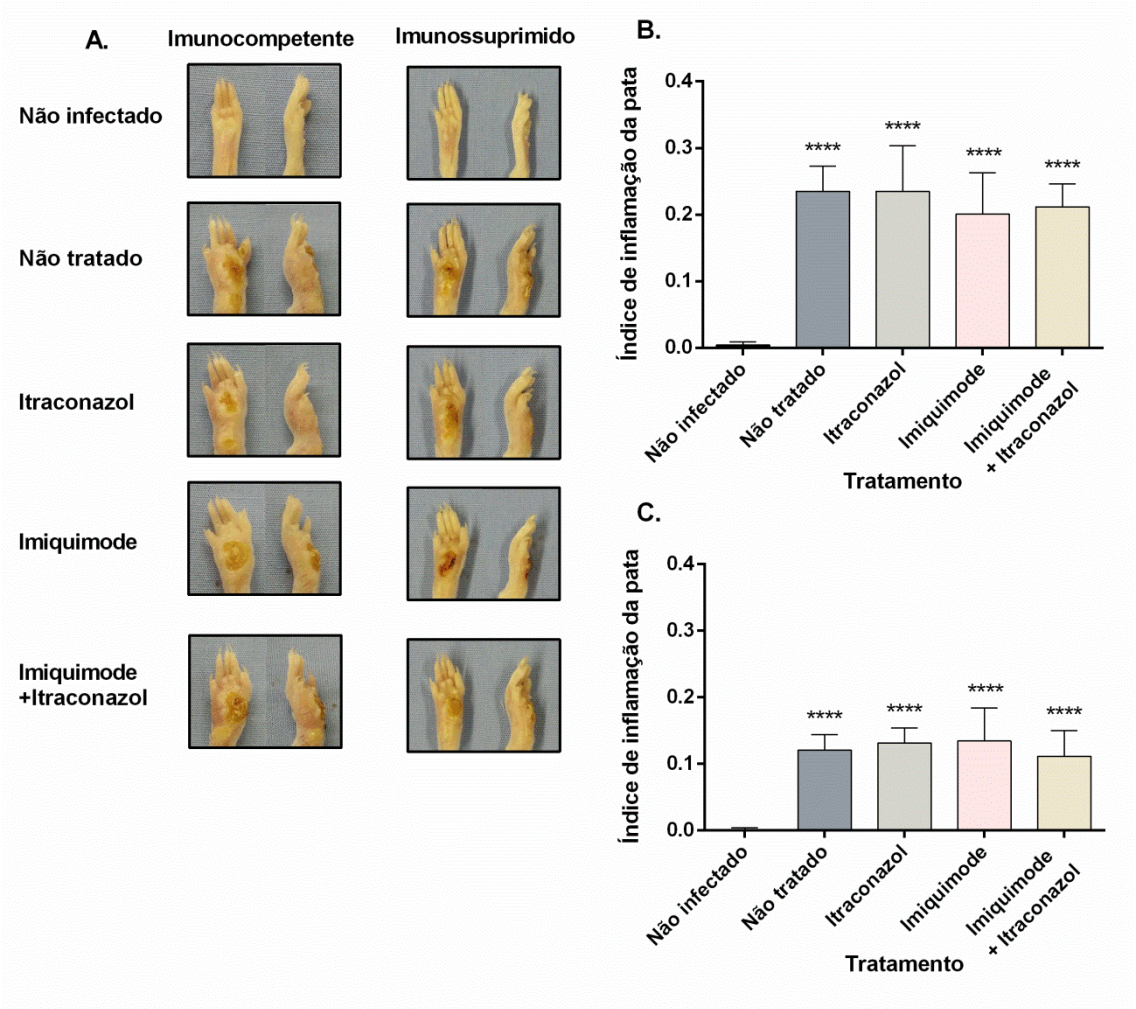


Figura 29. Índice de inflamação das patas. Camundongos Balb/c, imunossuprimidos ou não com CY, foram inoculados pela via s.c. com 1,6 × 10^7 leveduras de *S. schenckii* em PBS (não tratado, itraconazol, imiquimode ou imiquimode+itraconazol) ou somente com PBS estéril (não infectado) e tratados diariamente conforme indicado. O índice de inflamação das patas foi obtido através da diferença de massa entre as patas direita e esquerda em animais imunocompetentes (**B**) e imunossuprimidos (**C**). Fotos das patas (**A**). A significância estatística foi determinada por ANOVA de 1 via usando o teste de comparações múltiplas de Tukey e intervalo de confiança em 95%. Os resultados são apresentados como a média ± desvio padrão dos valores de 6 animais de 2 experimentos independentes. Todos os grupos apresentaram ****(p< 0,001), para comparações com o grupo controle não infectado.

A avaliação histológica das patas apresentada na **Figura 30** mostra que não houve diferença significativa entre os grupos infectados tratados e não tratado quanto à carga fúngica na pata. Também foi observada a presença de intenso infiltrado inflamatório misto na região plantar, com abscessos na superfície epitelial chegando até o tecido muscular e muitas vezes até o tecido ósseo, divulsionando as fibras musculares, as quais se apresentam dilaceradas em todos os grupos infectados.

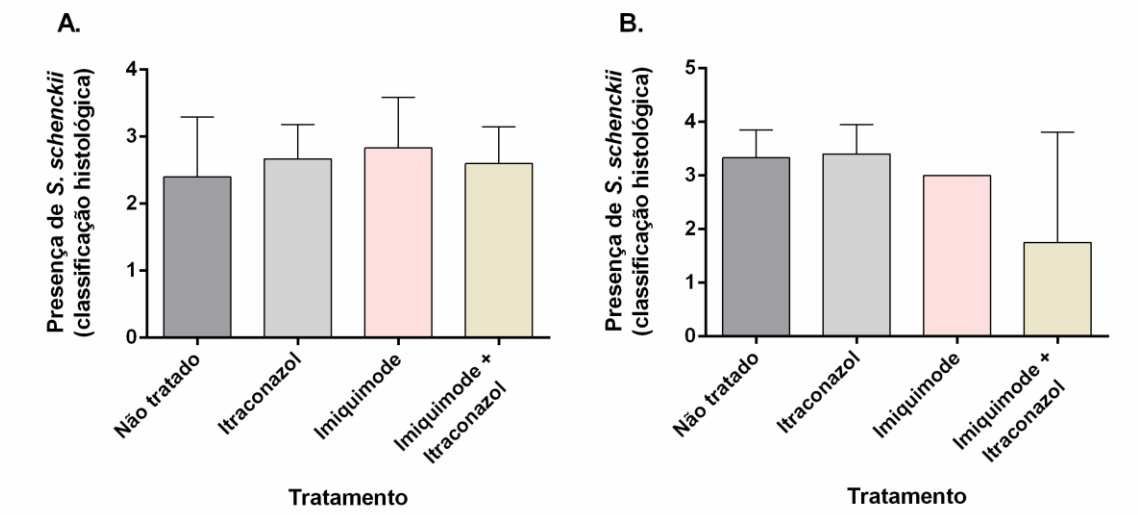


Figura 30. Avaliação histológica da presença de *S. schenckii* na pata. Camundongos Balb/c, imunossuprimidos ou não com CY, foram inoculados pela via s.c. com $1{,}6 \times 10^7$ leveduras de *S. schenckii* em PBS (não tratado, itraconazol, imiquimode ou imiquimode+itraconazol) ou somente com PBS estéril (não infectado) e tratados diariamente conforme indicado. As patas foram descalcificadas, processadas e coradas com Grocott. A presença das leveduras nos cortes das patas dos animais imunocompetentes (**A**) e imunossuprimidos (**B**) foi feita de forma visual de modo que 0 significa ausente, 1 raros, 2 presente, 3 moderado e 4 intensa quantidade de fungo. A significância estatística foi determinada por ANOVA de 1 via usando o teste de comparações múltiplas de Tukey e intervalo de confiança em 95%. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de 6 animais em 2 experimentos independentes.

Após a observação da carga fúngica presente no local da infecção, através da histologia, avaliou-se a presença do fungo no baço e no linfonodo poplíteo. No linfonodo (**Figura 31A e B)** a quantidade de UFC foi maior que a encontrada no baço, provavelmente pelo fato do linfonodo estar mais próximo do local da infecção. Os animais tratados com imiquimode apresentaram maior carga fúngica tanto nos testes com animais imunossuprimidos como imunocompetentes em relação aos animais não tratados. Nos imunocompetentes os grupos tratados com itraconazol ou associação

também apresentaram maior carga fúngica em relação ao grupo não tratado, porém a diferença não foi significativa. Já nos animais imunossuprimidos, todos os tratamentos causaram aumento da carga fúngica, mas especialmente imiquimode e associação, os quais resultaram em valores de UFC significativamente maiores que o itraconazol. Quando se analisa a quantidade de UFC no baço, observa-se que esta foi maior nos animais imunossuprimidos que nos imunocompetentes, embora em ambos os casos essa tenha sido menor que a encontrada no linfonodo. Dentre os animais imunocompetentes (**Figura 31C**), a infecção se tornou sistêmica nos grupos não tratados ou tratados com itraconazol em apenas alguns animais, enquanto os grupos tratados com imiquimode ou com a associação apresentaram carga fúngica aumentada, mas não significativa. Nos imunossuprimidos, o grupo tratado com a associação apresentou menor carga fúngica que aqueles tratados com os compostos isolados e também com o grupo não tratado (**Figura 31D**).

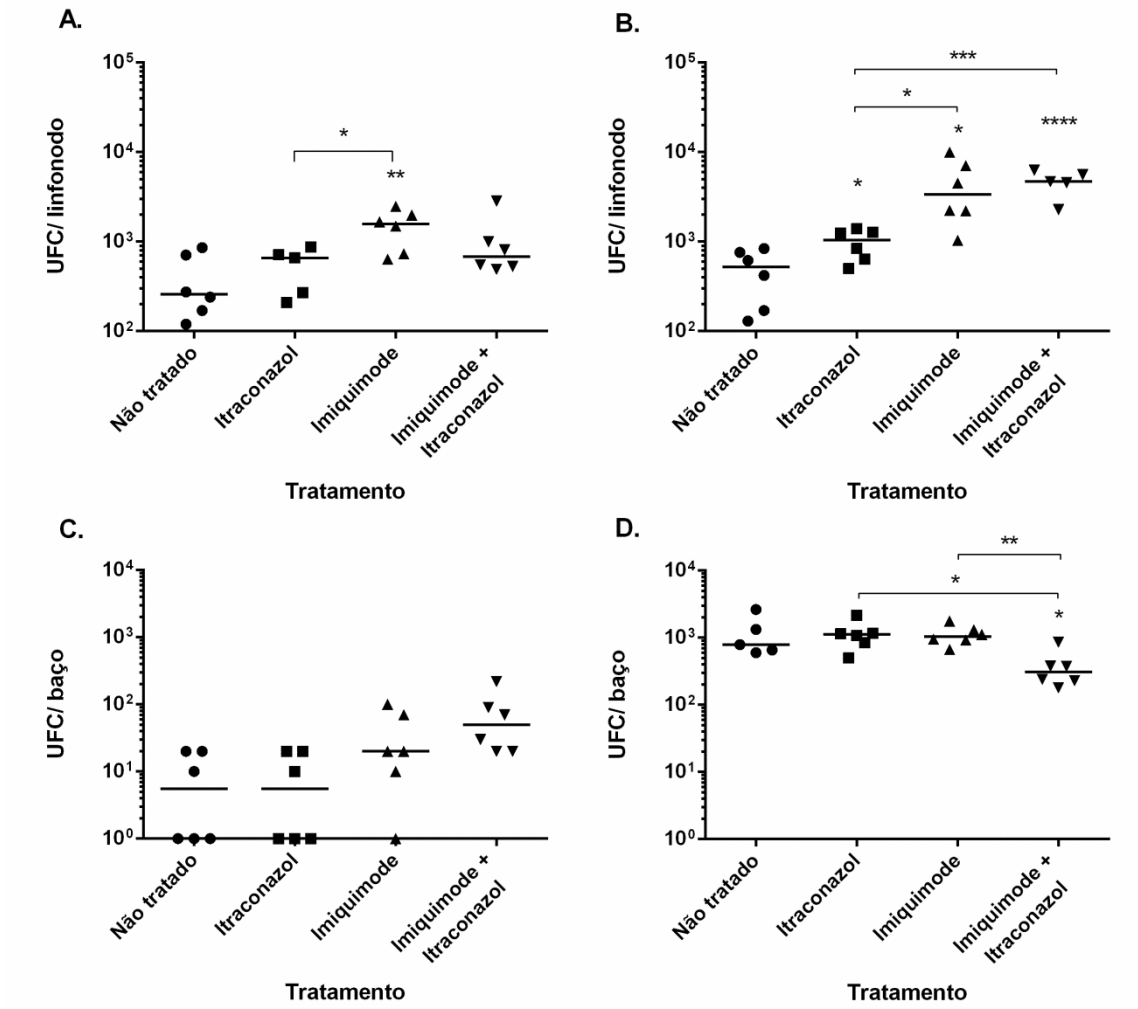


Figura 31. Carga fúngica do baço e linfonodo. Camundongos Balb/c, imunossuprimidos ou não com CY, foram inoculados pela via s.c. com 1,6 × 10^7 leveduras de *S. schenckii* em PBS e tratados diariamente conforme indicado. No dia 14 pós-infecção, os animais foram eutanasiados e o linfonodo e o baço dos camundongos imunocompetentes (**A** e **C**, respectivamente) e imunossuprimidos (**B** e **D**, respectivamente) foram removidos para determinação da carga fúngica. A significância estatística foi determinada por teste t com pós-teste de Holm-Sidak e intervalo de confiança em 95%. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de 6 animais em 2 experimentos independentes. * (p< 0,05); ** (p< 0,01); *** (p< 0,001) e **** (p< 0,0001) para comparações com o grupo não tratado em cada ponto respectivo ou conforme indicado.

O peso relativo do baço e o índice esplênico (**Figura 32**) aumentaram em todos os grupos de animais infectados quando comparados aos animais controle não tratados tanto entre os animais imunocompetentes como entre os imunossuprimidos, sendo maior nesse segundo grupo. Analisando os resultados do peso relativo do baço e do índice esplênico dos animais imunossuprimidos, observa-se que nos animais tratados com a associação a diferença em relação ao grupo não infectado foi menor que em relação aos outros grupos.

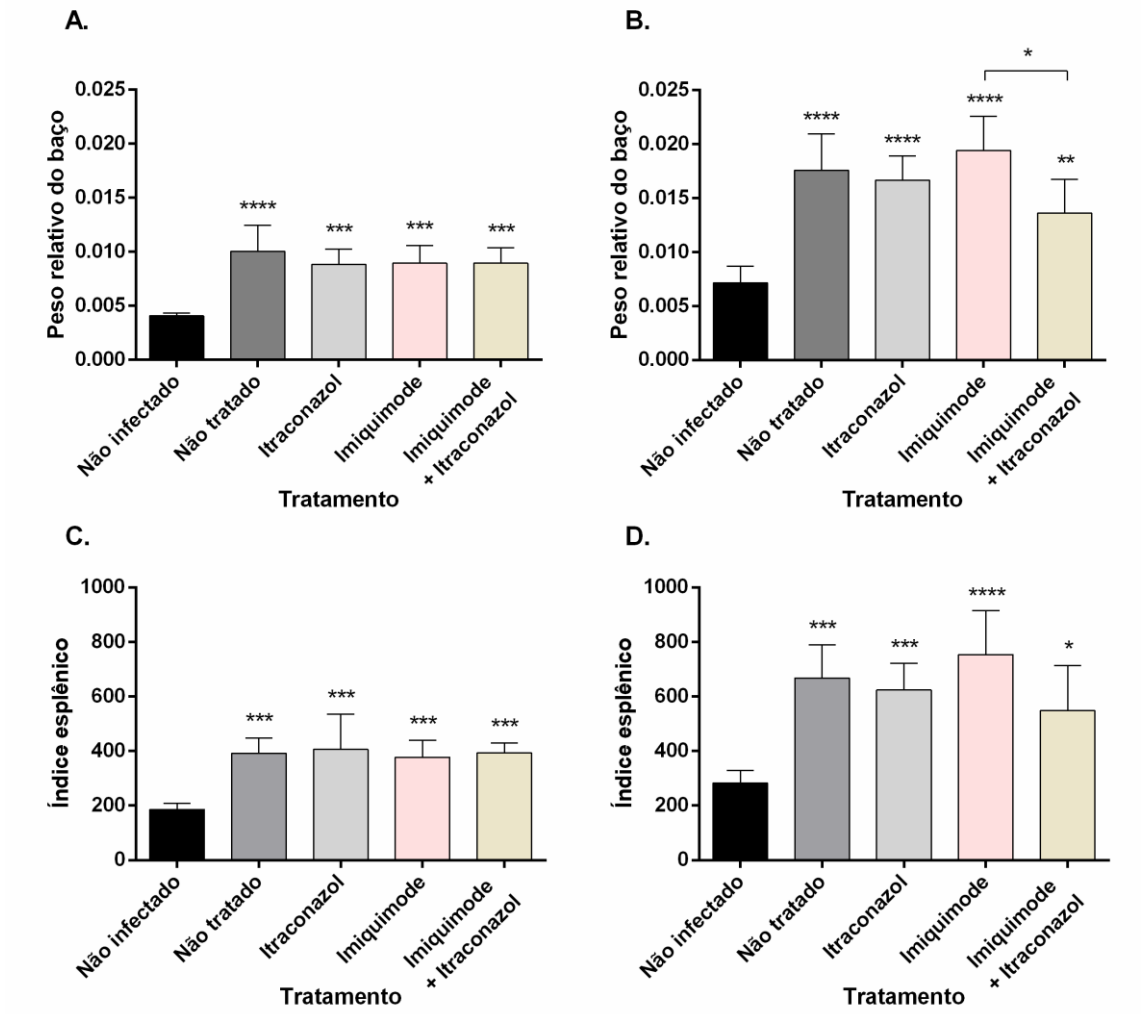


Figura 32. Peso relativo do baço e índice esplênico de animais imunocompetentes e imunossuprimidos submetidos a diferentes tratamentos. Camundongos Balb/c, imunossuprimidos ou não com CY, foram inoculados pela via s.c. com 1,6 × 10^7 leveduras de *S. schenckii* em PBS (não tratado, itraconazol, imiquimode ou imiquimode+itraconazol) ou somente com PBS estéril (não infectado) e tratados diariamente conforme indicado. No dia 14 pós-infecção, os animais foram eutanasiados e o baço foi removido para determinação de seu peso relativo (peso do baço/peso do animal) e índice esplênico (comprimento x largura x espessura) em camundongos imunocompetentes (**A** e **C**, respectivamente) ou imunossuprimidos (**B** e **D**, respectivamente). A significância estatística foi determinada por ANOVA de 1 via usando o teste de comparações múltiplas de Tukey e intervalo de confiança em 95%. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de 6 animais em 2 experimentos independentes. *($p<$ 0,05); **($p<$ 0,01); ***($p<$ 0,001) e ****($p<$ 0,0001) para comparações com o grupo não infectado em cada ponto respectivo ou conforme indicado.

A fim de investigar a resposta imune aos diferentes tratamentos, foi avaliada a liberação *ex vivo* das citocinas IL-17, IFN-γ e IL-10 em cultura de esplenócitos (**Figura 33**). Em relação à IL-17, os animais imunocompetentes tratados com itraconazol ou em associação apresentaram uma liberação reduzida desta em relação aos animais não tratados ou tratados com imiquimode; os animais tratados com imiquimode, por sua vez, apresentaram liberação de IL-17 em níveis semelhantes aos não tratados (**Figura 33A**). Já os animais imunossuprimidos, de forma geral liberaram quantidades muito baixas de IL-17 e nenhum dos tratamentos alterou significativamente a liberação desta citocina (**Figura 33B**). Nos animais imunocompetentes, a liberação de IFN-γ apresentou um perfil semelhante à de IL-17, sendo reduzida por todos os tratamentos, principalmente pelo tratamento com itraconazol. Este, por sua vez, levou à liberação de níveis apenas basais dessa citocina, semelhante ao apresentado pelos animais não infectados (**Figura 33C**). Analisando o perfil de liberação de IFN-γ apresentado pelos animais imunossuprimidos observa-se que com exceção dos animais tratados com imiquimode, os animais infectados não apresentaram liberação aumentada em relação aos não infectados (**Figura 33D**). Por último, avaliando a liberação de IL-10 apresentada pelos animais imunocompetentes, apenas o tratamento com imiquimode induziu liberação aumentada de IL-10, tanto em relação aos animais não tratados quanto aos tratados com itraconazol, mas não em relação aos tratados com a associação (**Figura 33E**). Dentre os animais imunossuprimidos, o tratamento com itraconazol induziu liberação aumentada de IL-10 em relação aos animais não tratados ou tratados com imiquimode, mas ainda em nível semelhante ao apresentado pelos animais não infectados. De modo semelhante, os animais tratados com a associação apresentaram liberação aumentada em relação aos não tratados. Interessantemente, os animais infectados não tratados apresentaram liberação reduzida em relação aos não infectados (**Figura 33F**).

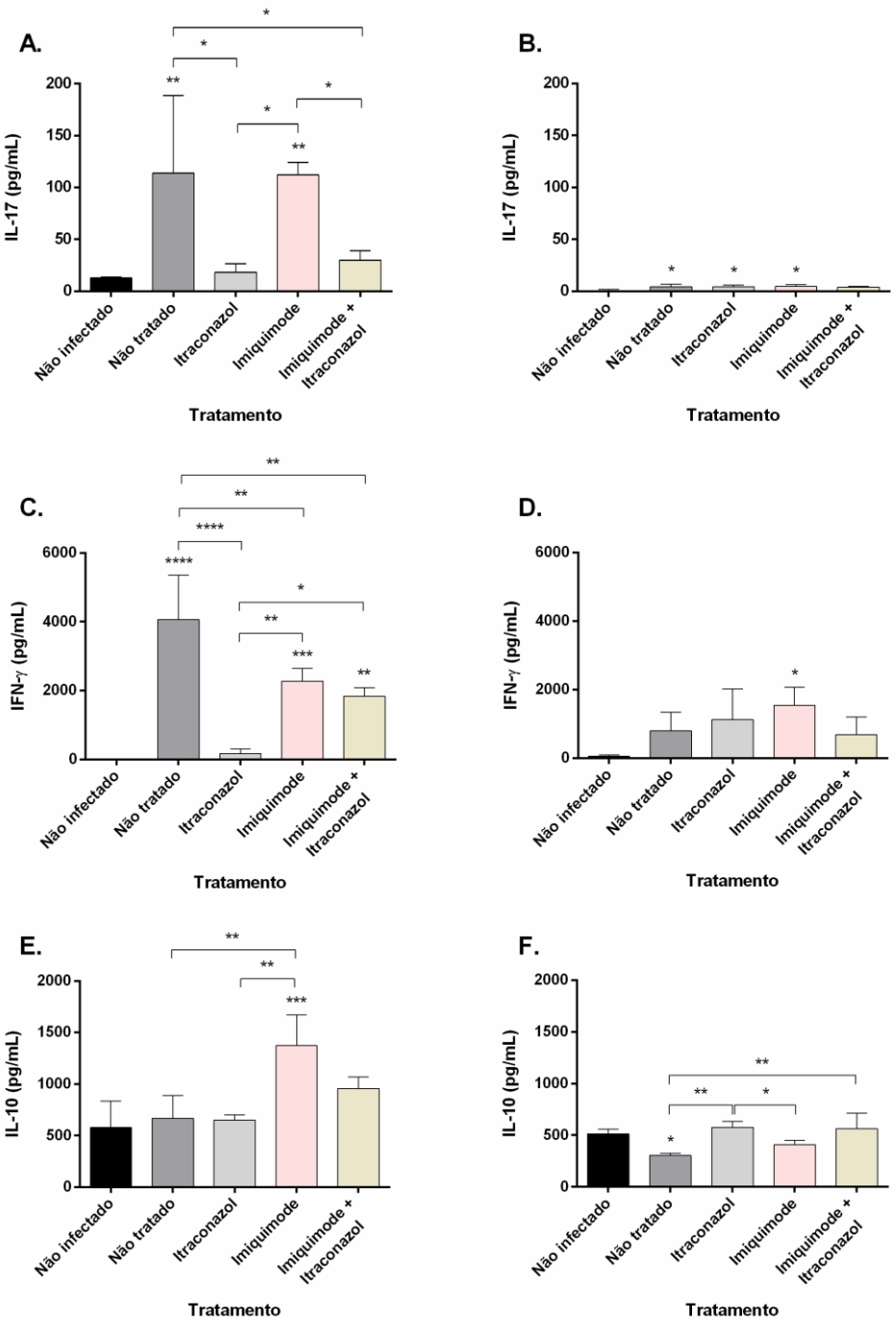


Figura 33. Liberação de citocinas *ex vivo* a partir de cultura de esplenócitos. Camundongos Balb/c, imunossuprimidos ou não com CY, foram inoculados pela via s.c. com $1{,}6 \times 10^7$ leveduras de *S. schenckii* em PBS (não tratado, itraconazol, imiquimode ou imiquimode+itraconazol) ou somente com PBS estéril (não infectado). No dia 14 pós-infecção, os animais foram eutanasiados e o baço foi removido e os esplenócitos resultantes foram cultivados por 24 horas na presença da levedura termo-inativada de *S. schenckii*. A concentração das citocinas indicadas foi determinada por ELISA no sobrenadante das culturas das células de animais imunocompetentes (**A**, **C**, **E**) ou imunossuprimidos (**B**, **D**, **F**). A significância estatística foi determinada por ANOVA de 1 via usando o teste de comparações múltiplas de Tukey e intervalo de confiança em 95%. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de 6 animais em 2 experimentos independentes. *($p < 0{,}05$); **($p < 0{,}01$); ***($p < 0{,}001$) e ****($p < 0{,}0001$) para comparações com o grupo não infectado em cada ponto respectivo ou conforme indicado.

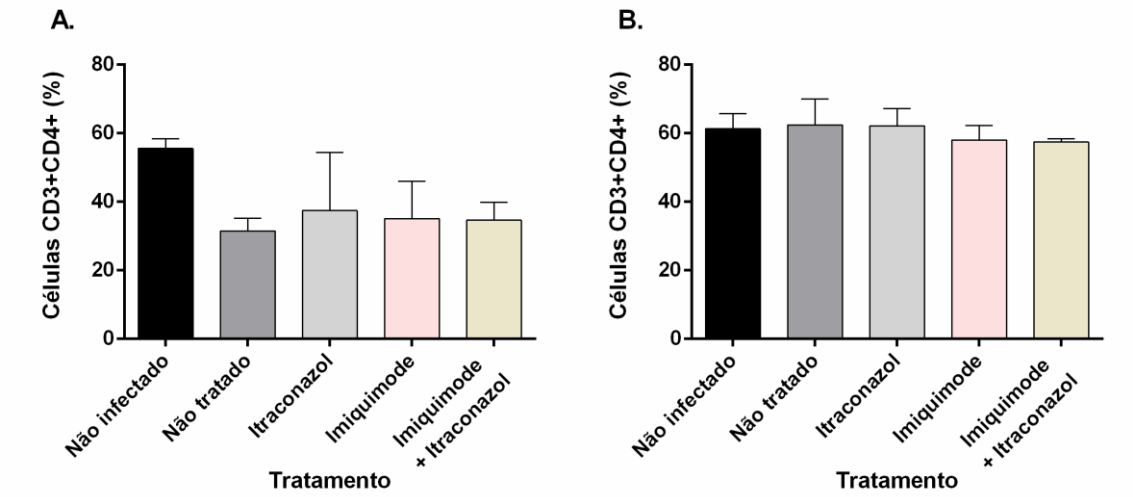


Figura 34. Avaliação da frequência de células Th no linfonodo. Camundongos Balb/c, imunossuprimidos ou não com CY, foram inoculados pela via s.c. com 1,6 × 10^7 leveduras de *S. schenckii* em PBS (não tratado, itraconazol, imiquimode ou imiquimode+itraconazol) ou somente com PBS estéril (não infectado). No dia 14 pós-infecção, os animais foram eutanasiados e as células totais do linfonodo poplíteo dos animais imunocompetentes (**A**) ou imunossuprimidos (**B**) foram marcadas conforme indicado. A significância estatística foi determinada por ANOVA de 1 via usando o teste de comparações múltiplas de Tukey e intervalo de confiança em 95%. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de 6 animais em 2 experimentos independentes.

A freqüência de diversas populações celulares foi avaliada no linfonodo poplíteo dos animais. A diferença na freqüência de linfócitos T *helper* (**Figura 34)** entre os grupos de animais imunocompetentes e imunossuprimidos não apresentou significância estatística. No entanto, de forma geral a freqüência dessas células é visivelmente maior nos animais imunossuprimidos.

Analisando as células Th RORγt+ nos animais imunocompetentes (**Figura 36A**) é possível notar que houve redução nos tratados com imiquimode ou associação em relação aos infectados não tratados. Entretanto, a frequência dessas células nos animais tratados, incluindo aqueles tratados com itraconazol, não foi significativamente maior que nos animais não infectados. Já nos imunossuprimidos, apesar de uma ligeira redução na frequência de células Th RORγt+ nos animais tratados com itraconazol ou imiquimode, não foi observada diferença significativa entre nenhum dos grupos (**Figura 36B**). Por sua vez, a frequência das células Th T-bet+ nos animais imunocompetentes foi menor em todos os grupos de animais infectados, tratados ou não, em relação aos não infectados (**Figura 36C**). Entretanto, dentre os imunossuprimidos, os animais tratados com imiquimode apresentaram maior frequência de células Th T-bet+ tanto em relação aos animais não tratados como em relação aos não infectados. Os outros grupos

de animais tratados (itraconazol e associação) apresentaram maior frequência dessas células somente quando comparados aos animais não infectados. Interessantemente, não houve diferença entre os animais não infectados e não tratados (**Figura 36D**). Por último, analisando a frequência das células Th RORγt+T-bet+ nos animais imunocompetentes, os grupos imiquimode e associação apresentaram uma freqüência menor em relação aos animais não tratados. Assim como ocorreu em relação às células Th T-bet+, a frequência das células Th RORγt+T-bet+ não aumentou em decorrência da infecção (**Figura 36E**). Nos animais imunossuprimidos, ao contrário dos imunocompetentes, a frequência de células Th RORγt+T-bet+ foi maior nos animais infectados não tratados em relação aos não infectados. Com o tratamento houve uma redução em relação ao grupo dos não tratados, atingindo níveis semelhantes àqueles dos não infectados (**Figura 36F**). A frequência de células NK também foi avaliada, porém estas células não foram encontradas em nenhum dos animais (dados não mostrados).

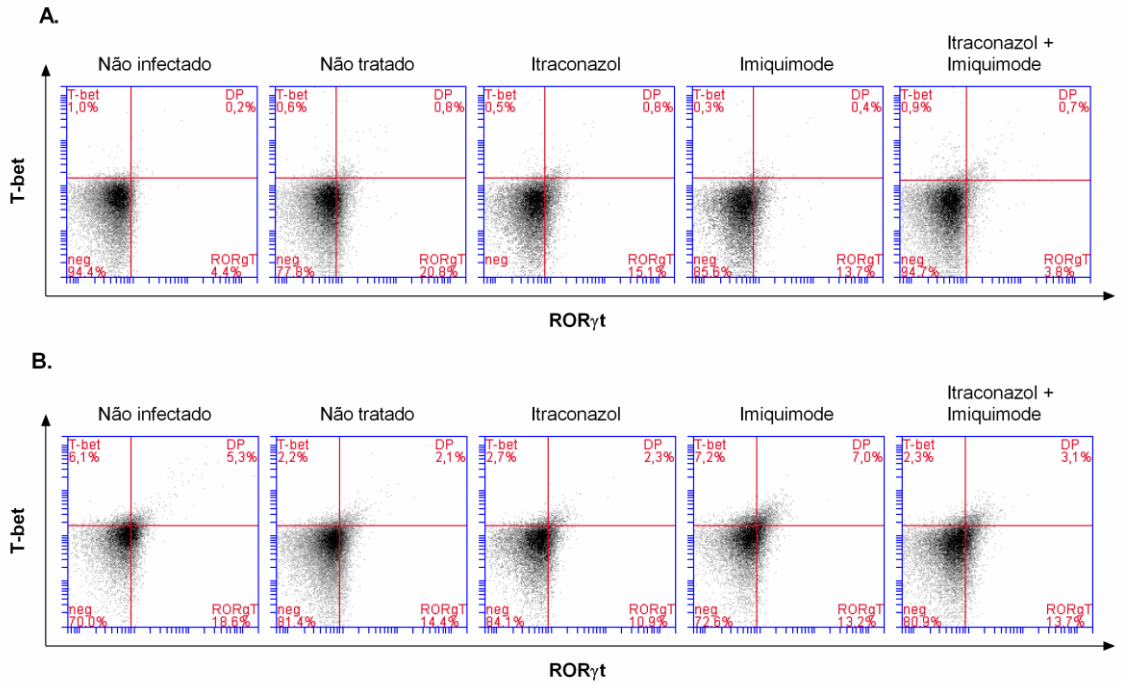


Figura 35. *Plots* representativos da estratégia de *gating* da análise de FACS de células totais do linfonodo poplíteo. Populações de linfócitos Th1 (células Th T-bet simples-positivas), Th17 (células Th RORγt simples-positivas), Th1/Th17 (células Th T-bet+RORγt+) de animais imunocompetentes (**A**) e imunossuprimidos (**B**).

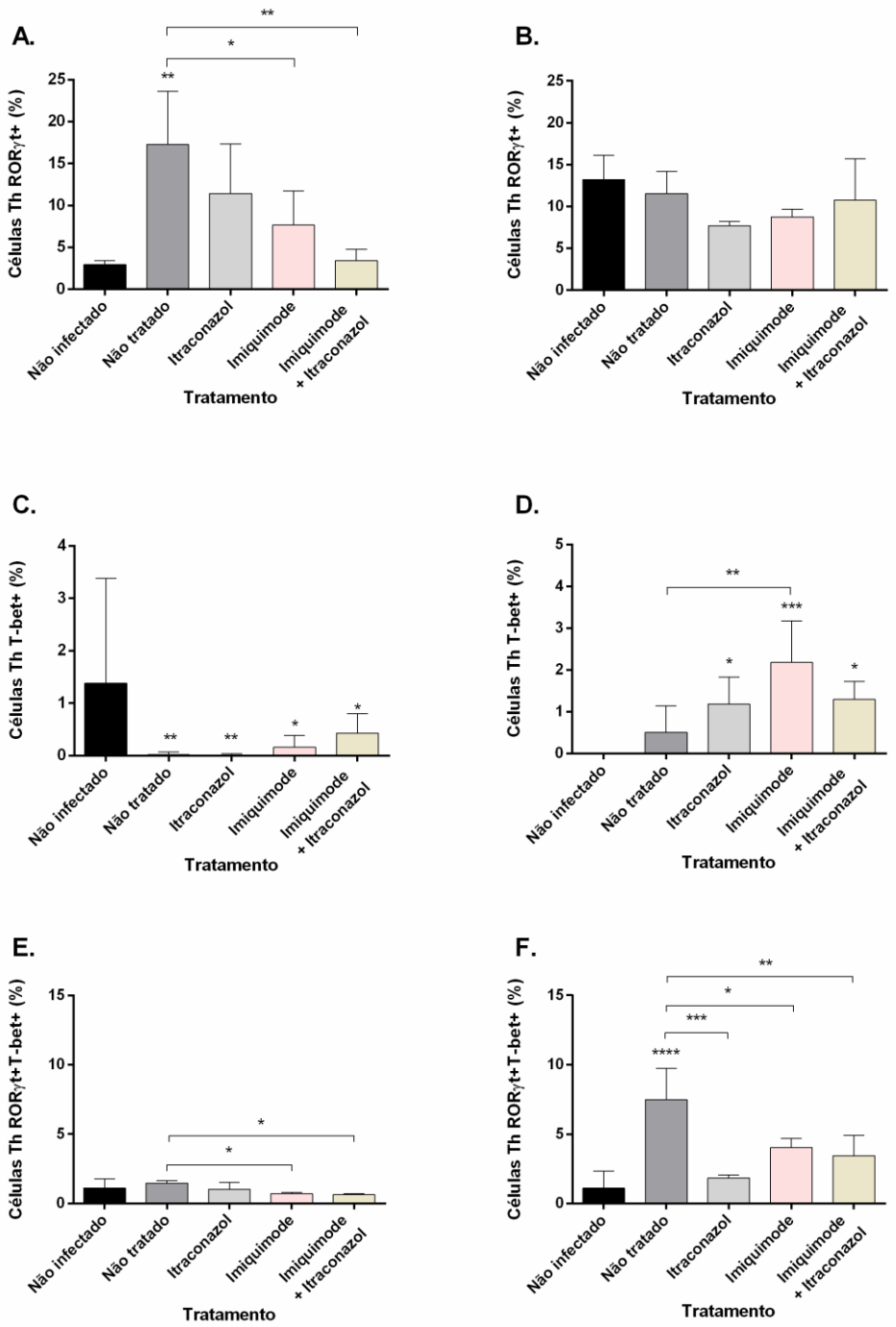


Figura 36. Avaliação da frequência de células Th expressando T-bet e RORγt no linfonodo. Camundongos Balb/c, imunossuprimidos ou não com CY, foram inoculados pela via s.c. com $1{,}6 \times 10^7$ leveduras de *S. schenckii* em PBS (não tratado, itraconazol, imiquimode ou imiquimode+itraconazol) ou somente com PBS estéril (não infectado). No dia 14 pós-infecção, os animais foram eutanasiados e as células totais do linfonodo poplíteo dos animais imunocompetentes (**A**, **C**, **E**) ou imunossuprimidos (**B**, **D**, **F**) foram marcadas conforme indicado. A significância estatística foi determinada por ANOVA de 1 via usando o teste de comparações múltiplas de Tukey e intervalo de confiança em 95%. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de 6 animais em 2 experimentos independentes. *($p<$ 0,05); **($p<$ 0,01); ***($p<$ 0,001) e ****($p<$ *0,*0001) para comparações com o grupo não infectado em cada ponto respectivo ou conforme indicado.

6. DISCUSSÃO

O *S. schenckii*, agora chamado de complexo de espécies *S. schenckii*, tem sido amplamente conhecido como o agente etiológico da esporotricose, que é uma micose subcutânea aguda ou crônica em humanos e outros mamíferos (López-Romero *et al*., 2011).

Diante das ferramentas de tratamento disponíveis atualmente para a esporotricose, há necessidade de se buscar novos métodos terapêuticos mais eficazes e que sejam menos tóxicos, com o intuito de reduzir o tempo de tratamento no caso de imunossupressão. O uso de imunomoduladores apresenta grande relevância no combate aos microrganismos patogênicos, permitindo manipular a resposta imune a fim de eliminar a infecção.

O imiquimode, que é um composto sintético da classe das imidazoquinolinas, possui propriedade imunoestimulante, além de antivirais e antitumorais (Vidal, 2006). Explorando esse efeito imunoestimulante do imiquimode, foi avaliado se este, isolado ou em associação com o itraconazol, que é o antifúngico de escolha para tratamento da esporotricose, poderia contribuir para o tratamento dessa doença em um modelo experimental.

Interessantemente, nos testes *in vitro* o imiquimode apresentou ação direta contra leveduras de *S. schenckii*. Este estudo, até onde sabemos, é o primeiro a demonstrar a ação antifúngica direta do imiquimode. Os trabalhos de Erbagci e colaboradores (2005) e de Sousa e colaboradores (2011; 2014) são os únicos que exploraram efeito antifúngico do imiquimode, mas apenas *in vivo*, obtendo-se melhora do quadro clínico. Porém, estes trabalhos não testaram a ação antifúngica direta do imiquimode *in vitro*. Com isso, podemos sugerir que a ação antifúngica pode ser pela sua estrutura química por possuir um grupamento imidazol, que é parecido com o grupamento triazol do itraconazol. Outro detalhe importante é que a CIM encontrada para o itraconazol foi muito menor que para o imiquimode. De acordo com a norma M27-A3 que se aplica às formas leveduriformes, deve-se utilizar a mesma faixa de concentração para os dois compostos, que é de 0,01 a 16µg/mL, de modo que não se leva em consideração a diferença de massa molecular entre os dois compostos. Portanto, 16µg/mL de itraconazol não é o mesmo que 16µg/mL de imiquimode em termos de número de mols em solução, pois o itraconazol apresenta uma massa molecular de

705,64g/mol e o imiquimode 240,304g/mol, sendo que do imiquimode é cerca de três vezes menor que a do itraconazol. Com isso, na solução tem muito mais moléculas de imiquimode que de itraconazol, o que então leva a pensar que a falta de ação do imiquimode em baixas concentrações não é devido à diferença de molaridade entre os compostos.

A formação de biofilme por patógenos é uma das principais causas de falha terapêutica, pois a resistência do biofilme é um fenômeno complexo e multifatorial como: produção de matriz extracelular, aumento da densidade celular, *upregulation* das bombas de efluxo e presença de células persistentes (Van Acker *et al*., 2014; Dellatin *et al*., 2014). Outro fator importante é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que ajudaria no processo de apoptose, e sabe-se que o itraconazol é capaz de produzir peróxido de hidrogênio que é capaz de lesionar a estrutura das organelas intracelulares do fungo, o que poderia justificar ter encontrado ação contra *S. schenckii* (Catalán e Montejo, 2006; Dellatin *et al*., 2014). Como demonstramos, *S. schenckii* é capaz de formar biofilme e tanto, o itraconazol como o imiquimode inibem o biofilme formado. Considerando que estes também apresentaram efeito na inibição da formação do biofilme fúngico, pode-se sugerir que o efeito antifúngico direto observado para ambos os compostos esteja relacionado. Interessantemente, quando analisamos os resultados de $PMIC_{50}$ e $SMIC_{50}$ esperava-se que a concentração necessária para desestruturar um biofilme já formado seria maior daquela para inibir a formação, porém o resultado foi o contrário, não estando dentro do esperado, já que o biofilme formado é muito mais complexo.

Após a observação desses resultados, em que não há uma melhora da ação antifúngica quando ambos os compostos são usados em associação, cogitamos que poderia estar ocorrendo alguma interação química entre eles. Levando-se em consideração a estrutura do itraconazol e do imiquimode, poderia estar ocorrendo uma reação de formação de iminas, que inicia-se com a protonação do oxigênio da carbonila para formar o intermediário íon oxônio, seguida de ataque nucleofílico do nitrogênio NH_2 do imiquimode para formar o intermediário hemiaminal protonado. Este perde uma molécula de água e, após neutralização, forma-se o produto, que teria resultado em um pico m/z 928 no espectro de massas, o qual não foi encontrado. Entretanto, isto não exclui a possibilidade de estar ocorrendo interações intermoleculares, que não são detectáveis no espectro de massas, e que podem afetar a atividade das substâncias.

Os macrófagos são umas das células centrais para a resposta imune eficaz contra patógenos e para muitas doenças fúngicas. Eles tem a capacidade de eliminar o patógeno invasor através da fagocitose. Após a fagocitose, os macrófagos ativam vias de sinalização que levam ao processamento do antígeno, ao tráfego intracelular e à apresentação às células Th, desencadeando a resposta adaptativa (Underhill e Ozinsky, 2002; Pluddemann *et al*., 2011). Quando ativadas, essas células aumentam o metabolismo, a mobilidade e a atividade fagocítica, além de secretarem enzimas, componentes do complemento, fatores de coagulação e várias citocinas (Palladino *et al*., 2003).

Ao analisarmos os resultados da determinação da ação fungicida dos macrófagos, percebemos que estes estão alinhados àqueles obtidos nos testes de ação antifúngica direta e de inibição de biofilme, nos quais apenas as maiores concentrações de imiquimode foram capazes de apresentar ação contra a levedura de *S. schenckii*. Porém, nos nossos testes mostramos que macrófagos são estimulados a partir de uma concentração de 4µg/mL de imiquimode, sendo que a literatura mostra que o macrófago é estimulado numa concentração próxima daquela capaz de estimular células dendríticas, que é 5µg/mL de imiquimode (Schön e Schön, 2007). É interessante notar que, apesar da ação imunoestimulante atribuída ao imiquimode, este se mostrou menos eficiente que o itraconazol nas condições testadas. Porém, houve um efeito antifúngico dose dependente na faixa de 4 a 0,2µg/mL de imiquimode. Este fato pode ser consequência do efeito direto e/ou pelo efeito imunoestimulante sobre o macrófago. Ao analisar os resultados em animais imunossuprimidos foi confirmada a hipótese do efeito imunoestimulante, devido a que os macrófagos derivados desses animais mostraram uma menor resistência à infecção pelo fungo após tratamento com imiquimode.

Os limites apresentados pela realização do teste *in vitro*, aliados à possibilidade de que o itraconazol esteja exercendo efeito direto sobre as leveduras fagocitadas, pode ter sido, pelo menos em parte, responsável pela diferença observada entre o itraconazol e imiquimode. Analisando a liberação de citocinas no teste de determinação da ação fungicida, a liberação de TNF-α teve uma relação inversa ao efeito indutor de atividade fungicida quando os macrófagos foram estimulados com imiquimode, sendo que quanto menor a concentração de imiquimode mais TNF-α foi liberado. Sabe-se que o imiquimode é capaz de estimular a liberação TNF-α, então é possível que um mecanismo de feedback negativo esteja envolvido nesse efeito observado em nosso

sistema, obedecendo ao mecanismo de hormese onde a resposta aumenta com a concentração do estimulante até um ponto em que começa a decair. Este tipo de resposta é típica dos compostos imunoestimulantes (Calabrese, 2015).

Interessantemente, não encontramos quantidades detectáveis de NO no sobrenadante dos macrófagos tratados com imiquimode ou itraconazol no ensaio de atividade fungicida. É possível que o próprio *S. schenckii* esteja inibindo essa liberação, já que macrófagos tratados com imiquimode na ausência da levedura de *S. schenckii* apresentaram produção de NO diretamente proporcional à concentração de imiquimode.

Outro mecanismo que poderia estar envolvido vem a ser o consumo desse mediador na tentativa de destruir o fungo, ficando pequenas quantidades liberadas nos sobrenadantes, não sendo possível a sua detecção. Essas hipóteses devem ser confirmadas em estudos posteriores. O NO é um potente mediador da inflamação e contribui para atividade citotóxica contra patógenos, com importante ação microbicida, mas a sua produção também pode ser prejudicial ao hospedeiro em altas concentrações (Carlos *et al*., 2003; Fernandes *et al*., 2008; Sassá *et al*., 2009). A produção de NO por macrófagos pode alterar o balanço entre os mecanismos de defesa do hospedeiro e a virulência do patógeno, diminuindo assim a suscetibilidade do hospedeiro à infecção (Ramasarma, 1990; Fernandes *et al*., 2008). Sabe-se que o principal efeito colateral do imiquimode, é o desenvolvimento de psoríase, isto se deve principalmente por estimular um aumento de células Th17 e a produção de ROS, que favorece a progressão da doença (Kim *et al*., 2014; Ueyama *et al*., 2014). Com isso, analisando os resultados da produção de NO nas concentrações testadas, percebe-se que com o aumento da concentração de imiquimode, aumenta a produção de NO.

O número crescente de relatos de infecção por *Sporothrix* spp. em pacientes imunocomprometidos, principalmente a população infectada pelo HIV, transforma a esporotricose em um problema emergente de saúde global concomitante com a pandemia de AIDS, o que também dificulta o tratamento (Lopez-romero, 2011). Com isso, propomos o tratamento de um imunoestimulante com um antifúngico, no caso imiquimode e itraconazol, respectivamente, no intuito de melhorar o quadro clínico desses pacientes. Para isso foi realizada a padronização de um modelo experimental de infecção pela via cutânea e também de imunossupressão utilizando a ciclofosfamida.

A ciclofosfamida é um agente citotóxico não específico que pode inibir tanto a imunidade humoral como celular, mas seu mecanismo de ação é amplo, sendo que pode

ter função antineoplásica ou imunomoduladora. Tudo isso depende da dose e do momento da administração (Huyan *et al*., 2011). A ciclofosfamida, que é um agente alquilante do tipo mostarda nitrogenada, é capaz de formar ligações interfilamentares com o DNA e necessita ser metabolizada pelas fosfamidases (enzimas microssomais hepáticas), para que seus metabólitos possam exercer o efeito alquilante celular (Almeida *et al*., 2005). Entre os efeitos causados pela ciclofosfamida, destaca-se a indução de mielossupressão, uma vez que este fármaco interfere na proliferação e diferenciação de células da medula óssea (Guest e Uetrecht, 2000, Pass *et al*., 2005). Essas alterações estão associadas a uma expressiva leucopenia e neutropenia, e aumento da suscetibilidade às infecções (Buisman *et al*., 1999; Jang *et al*., 2013). A ciclofosfamida promove a diferenciação de células Th17 humanas e murinas, *in vitro* e *in vivo*, um efeito que pode ser detectado tanto entre os linfócitos circulantes como os infiltrados no tumor. A ciclofosfamida é agora amplamente reconhecida como um agente que subverte as funções imunossupressoras das células Treg, especialmente quando utilizado em doses relativamente baixas, denominadas metronômicas (Zitvogel *et al*., 2013).

Em relação aos resultados obtidos após o tratamento com imiquimode e itraconazol, foram inesperados e assim como Borba-Santos e colaboradores (2015) e Ishida e colaboradores (2015), relataram que os resultados obtidos em testes *in vitro* foram diferentes dos encontrados *in vivo*. A carga fúngica foi maior no baço dos animais imunossuprimidos que dos imunocompetentes, mostrando que a infecção se tornou mais sistêmica nesses animais, provavelmente devido ao animal estar nessa condição. Além disso, o peso relativo do baço e o índice esplênico dos animais imunossuprimidos foram maiores quando comparado aos imunocompetentes, isso se deve principalmente a dificuldade de montar uma resposta eficiente contra a infecção fúngica, à formação de exsudato e ao aumento de celularidade, devido à presença de hematopoiese extramedular como consequência da severa insuficiência medular pela imunossupressão (Joyce *et al*., 1979; Wang *et al*., 2009).

Interessantemente, o tratamento com itraconazol não foi efetivo. O itraconazol, que é o medicamento de escolha para o tratamento da esporotricose, não funcionou no modelo que escolhemos. Da mesma maneira, Ishida e colaboradores (2014) utilizando um modelo sistêmico de infecção por *S. brasiliensis* com uma dose maior de itraconazol por via oral (75mg/kg/dia), também demonstrou que não houve redução da carga

fúngica, mesmo com 45 dias de tratamento. Em humanos, a duração do tratamento da esporotricose é de 3-6 meses e deve ser continuado durante pelo menos um período de 4 a 6 semanas após a remissão clínica para completa cura da doença, sendo que pacientes imunossuprimidos geralmente requerem terapia antifúngica por toda a vida (Mahajan, 2014).

Ao analisarmos a carga fúngica dos animais imunocompetentes, nenhum dos tratamentos foi efetivo contra a esporotricose, e o tratamento com imiquimode aumentou a carga fúngica no baço e no linfonodo, porém na pata não foi observado esse aumento. Ao contrário, nos animais imunossuprimidos, o tratamento com a associação de imiquimode e itraconazol conseguiu diminuir a carga fúngica no baço e na pata, porém não no linfonodo. É possível notar que os animais imunossuprimidos apresentaram uma melhor resposta terapêutica na associação. Nossa hipótese, é que no caso dos animais imunocompetentes, a estimulação excessiva pelo imiquimode e pela própria infecção fúngica, com a liberação de mediadores pró-inflamatórios favorece um estado de imunossupressão que propicia a proliferação do fungo (Maia *et al*., 2006; Fernandez *et al*., 2008; Carlos *et al*., 2009). Quando analisamos as populações de linfócitos Th1 e Th17 com uma forte redução, principalmente Th1, esse padrão confirma essa hipótese, ou seja, o animal imunocompetente está mostrando um estado imunossupressor que favorece a disseminação do fungo. Por outro lado, paradoxicamente os animais imunossuprimidos, mostraram uma melhor resposta Th1, contudo a resposta Th17 não foi significativamente modificada. Corroborando com as análises feitas anteriormente, nos animais imunossuprimidos infectados e tratados com imiquimode ou associação houve uma estimulação pelo composto, mas não em quantidade suficiente para causar uma redução da resposta Th1. Como descrito na literatura o imiquimode estimula uma resposta preferencialmente Th1 com liberação de citocinas pró-inflamatórias (Garland *et al*., 2007; Schön e Schön, 2007; Flutter e Nestle, 2013).

Importante salientar que o estudo de populações foi feita no linfonodo, onde houve em todos os grupos uma carga fúngica elevada, que explica o efeito antes observado. Porém, as citocinas foram avaliadas no baço, onde o padrão observado de redução das mesmas nos animais imunossuprimidos evidencia o estado de deficiência imunológica sistêmica.

Nos estudos de Sousa e colaboradores (2011 e 2014) com cromoblastomicose, o uso do imiquimode em camundongos infectados e um caso humano demonstrou a efetividade do mesmo, com diminuição da carga fúngica e resolução da doença. A infecção no modelo animal foi também subcutânea e o imiquimode passado no local na lesão uma vez por dia, durante 7 dias. Porém a cromoblastomicose é uma micose mais localizada, subcutânea e raramente atinge os vasos linfáticos ou sanguíneos.

De modo geral, este estudo evidencia de que o imiquimode associado ao itraconazol pode favorecer o efeito terapêutico antifúngico desse último, por meio da modulação da resposta imunológica do imiquimode em animais imunossuprimidos. Outros estudos serão necessários para aprofundar nos mecanismos envolvidos nessa resposta.

7. CONCLUSÕES

- O imiquimode apresenta ação antifúngica direta contra o *S. schenckii*, porém quando associado ao itraconazol a ação antifúngica não é melhorada em relação ao antifúngico sozinho.
- O imiquimode é capaz de inibir a formação e desestruturar o biofilme já formado por *S. schenckii*, ainda que, apenas em concentrações maiores quando comparado ao itraconazol, que inibiu em praticamente todas as concentrações testadas.
- O imiquimode demonstrou ser capaz de induzir a produção de NO em macrófagos peritoneais nas maiores concentrações testadas e o itraconazol não induziu em nenhumas das concentrações.
- No ensaio da determinação da atividade fungicida de macrófagos, o imiquimode estimulou a morte intracelular da levedura de *S. schenckii*.
- Na padronização do modelo de infecção utilizado, a carga fúngica se concentrou mais no linfonodo drenante e atingiu nível sistêmico, mesmo que em menor escala no baço.
- No modelo de imunossupressão com CY, houve redução da frequência de células T *helper* e citotóxicas e células B no baço e favoreceu a infecção localizada e sistêmica.
- A associação de itraconazol com imiquimode favoreceu a resposta terapêutica antifúngica nos animais imunossuprimidos.

8. REFERÊNCIAS

Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annu Rev Immunol. 1999;17:593-623.

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

Alba-Fierro CA, Pérez-Torres A, López-Romero E, Cuéllar-Cruz M, Ruiz-Baca E. Cell wall proteins of Sporothrix schenckii as immunoprotective agents. Rev Iberoam Micol. 2014; 31(1):86-89.

Alba-Fierro CA, Pérez-Torres A, Toriello C, Romo-Lozano Y, López-Romero E, Ruiz-Baca E. Molecular Components of the Sporothrix schenckii Complex that Induce Immune Response. 2016; 73(2): 292-300.

Almeida VD, Leitão A, Reina LDCB, Montanari CA, Donnici CL, Lopes MTP. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. Quim. Nova, 2005: 28(1), 118-129.

Almeida-Paes R, Frases S, Monteiro PCF, Gutierrezgalhardo MC, Zancopé-Oliveira RM, Nosanchuk JD. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical Sporothrix schenckii isolates. Microbes Infect. 2009;5:554-62.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. Nature. 1998;392: 245-52.

Barros MB, Schubach AO, Schubach TM, Wanke B, Lambert-Passos SR. An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological aspects of a series of cases. Epidemiol Infect. 2008; 136(9):1192-6.

Barros MBL, Schubach TP, Coll JO, Gremião ID, Wanke B, Schubach A. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. Rev Panam Salud Publica. 2010;27:455-60.

Barros MB, de Almeida Paes R, Schubach AO. Sporothrix schenckii and Sporotrichosis. Clin Microbiol Rev. 2011; 24(4):633-54.

Batista-Duharte, A., Pereira, S. A., Freitas, D. F. S., Fuentes, D. P., Gutierrez-Galhardo, M. C., Carlos, I. Z. Therapeutic and prophylactic tools for sporotrichosis: current strategies and future tendencies. 2015; in Sporotrichosis (pp. 147-177). Springer International Publishing.

Borba-Santos LP, Rodrigues AM, Gagini TB, Fernandes GF, Castro R, de Camargo ZP, Nucci M, Lopes-Bezerra LM, Ishida K5, Rozental S. Susceptibility of Sporothrix brasiliensis isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine. Med Mycol. 2015, 53(2):178-88.

Boumpas DT, Austin HA 3rd, Vaughn EM, Klippel JH, Steinberg AD, Yarboro CH, Balow JE: Controlled trial of pulse methylprednisolone versus two regimens of pulse cyclophosphamide in severe lupus nephritis. Lancet. 1992;340:741-5.

Brito MM, Conceição-Silva F, Morgado FN, Raibolt PS, Schubach A, Schubach TP, Schäffer GM, Borba CM. Comparison of virulence of different Sporothrix schenckii clinical isolates using experimental murine model. Med Mycol. 2007;45:721-9.

Buisman AM, Van Zwet TL, Langermans JA, Geertsma MF, Leenen PJ, van Furth R. Different effect of granulocyte colony-stimulating factor or bacterial infection on bone-marrow cells of cyclophosphamide-treated or irradiated mice. Immunology. 1999;97:601-10.

Calabrese EJ. Hormesis: principles and applications. Homeopathy. 2015;104(2):69-82.

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

Carlos IZ, Sgarbi DB, Santos GC, Placeres MC. Sporothrix schenckii lipid inhibits macrophage phagocytosis: involvement of nitric oxide and tumour necrosis factor-alpha. Scand J Immunol. 2003;57:214-20.

Carlos IZ, Sassá MF, da Graça Sgarbi DB, Placeres MC, Maia DC. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. Mycopathologia. 2009;168:1-10.

Carlos IZ, Batista-Duharte A, Sporotrichosis: An emergent disease, in: I.Z. Carlos (Ed.), Sporotrichosis. New Developments and Future Prospects, Springer International Publishing Switzerland 2015, pp. 1–23.

Carlos IZ, Ferreira LZ, Gonçalves AC. Models of experimental sporotrichosis and immune response against *Sporothrix schenckii*, in: I.Z. Carlos (Ed.), Sporotrichosis. New Developments and Future Prospects, Springer International Publishing Switzerland 2015.

Castro RA, Kubitschek-Barreira PH, Teixeira PA, Sanches GF, Teixeira MM, Quintella LP, Almeida SR, Costa RO, Camargo ZP, Felipe MS, de Souza W, Lopes-Bezerra LM. Differences in Cell Morphometry, Cell Wall Topography and Gp70 Expression Correlate with the Virulence of Sporothrix brasiliensis Clinical Isolates. PLoS One. 2013;8:e75656.

Catalán M, Montejo JC. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. Revista iberoamericana de micología. 2006; 23.1: 39-49.

Chakrabarti A, Bonifaz A, Gutierrez-Galhardo MC, Mochizuki T, Li S. Global epidemiology of sporotrichosis. Med Mycol. 2015; 53(1):3-14.

Chang S, Hersh AM, Naughton G, Mullins K, Fung MA, Sharon VR. Disseminated cutaneous sporotrichosis. Dermatol Online J. 2013;19:20401.

Charoenvit Y, Taylor RL. Experimental sporotrichosis in Syrian hamsters. Infect Immun. 1979;23:366-72.

Chaturvedi V, Ramani R, Andes D, Diekema DJ, Pfaller MA, Ghannoum MA, Knapp C, Lockhart SR, Ostrosky-Zeichner L, Walsh TJ, Marchillo K, Messer S, Welshenbaugh AR, Bastulli C, Iqbal N, Paetznick VL, Rodriguez J, Sein T. Multilaboratory testing of two-drug combinations of antifungals against Candida albicans, Candida glabrata, and Candida parapsilosis. Antimicrob Agents Chemother, 2011, v. 55, n. 4, p. 1543-8.

Cruz-Chamorro L, Puertollano MA, Puertollano E, Alvarez de Cienfuegos G, de Pablo MA. Examination of host immune resistance against Listeria monocytogenes infection in cyclophosphamide-treated mice after dietary lipid administration. Clin Nutr. 2007;26:631-9.

Cruz LCH. Complexo Sporothrix schenckii. Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. Vet e Zootec. 2013;20:08-28.

Cunha-Azevedo EP, Silva JR, Martins OP, Siqueira-Moura MP, Bocca AL, Felipe MSS, Tedesco AC, Azevedo RB. In Vitro Antifungal Activity and Toxicity of Itraconazole in DMSA-PLGA Nanoparticles. Journal of Nanoscience and Nanotechnology. 2011: 11; 2308–2314.

De Araujo T, Marques AC, Kerdel F. Sporotrichosis. Int J Dermatol. 2001;40:737-42.

de Lima Barros MB, Schubach TM, Galhardo MC, de Oliviera Schubach A, Monteiro PC, Reis RS, Zancopé-Oliveira RM, dos Santos Lazéra M, Cuzzi-Maya T, Blanco TC, Marzochi KB, Wanke B, do Valle AC. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001;96:777-9.

Delattin N, Cammue BP, Thevissen K. Reactive oxygen species-inducing antifungal agents and their activity against fungal biofilms. Future Med Chem. 2014; 6(1):77-90.

Erbagci Z1, Tuncel AA, Erkilic S, Zer Y. Successful treatment of antifungal- and cryotherapy-resistant subcutaneous hyalohyphomycosis in an immunocompetent case with topical 5% imiquimod cream. Mycopathologia. 2005;159(4):521-6.

Fanning S, Mitchell AP. Fungal biofilms. PLoS Pathog. 2012; 8(4):e1002585.

Fernandes KS, Mathews HL, Lopes Bezerra LM. Differences in virulence of Sporothrix schenckii conidia related to culture conditions and cell-wall components. J Med Microbiol. 1999; 48:195-203.

Fernandes KS, Neto EH, Brito MM, Silva JS, Cunha FQ, Barja-Fidalgo C. Detrimental role of endogenous nitric oxide in host defence against *Sporothrix schenckii*. Immunology. 2008;123(4):469-79.

Fernandes GF, dos Santos PO, Rodrigues AM, Sasaki AA, Burger E, de Camargo ZP. Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolates compared with S. globosa and S. brasiliensis species. Virulence. 2013; 4:241-9.

Ferreira LS, Gonçalves AC, Portuondo DL, Maia DC, Placeres MC, 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.

Flutter B, Nestle FO. TLRs to cytokines: mechanistic insights from the imiquimod mouse model of psoriasis Eur J Immunol. 2013, 43(12):3138-46..

Freitas DF, de Siqueira Hoagland B, Do Valle AC, Fraga BB, de Barros MB, de Oliveira Schubach A, de Almeida-Paes R, Cuzzi T, Rosalino CM, Zancope´-Oliveira RM, Gutierrez-Galhardo MC. Sporotrichosis in HIV-infected patients: report of 21 cases of endemic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. Med Mycol. 2011;50:170-8.

Garland SM. Imiquimod. Current Opinion in Infectious Diseases. 2003: 16:85–89.

Gaspari AA. Mechanism of action and other potential roles of an immune response modifier. Cutis. 2007; 79(4 Suppl):36-45.

Gonçalves AC, Maia DC, Ferreira LS, Monnazzi LG, Alegranci P, 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. 2014; 179(1-2):21-30.

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

Grocott RG. A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. Am J Clin Pathol. 1955; 25:975-9.

Guest L, Uetrecht J. Drugs toxic to the bone marrow that target stromal cells Immunopharmacol. 2000; 46:103-12.

Guterres KA, Matos CB, Osório LG, Schuch ID, Cleff MB. The Use of (1–3) b-Glucan Along with Itraconazole Against Canine Refractory Sporotrichosis. Mycopathologia. 2014: 177:217–221.

Gutierrez-Galhardo MC, Freitas DFS, do Valle ACF. Clinical Forms of Human Sporotrichosis and Host Immunocompetence, in: I.Z. Carlos (Ed.), Sporotrichosis. New Developments and Future Prospects, Springer International Publishing Switzerland 2015, pp. 73.

Huyan XH, Lin YP, Gao T, Chen RY, Fan YM. Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice. Int Immunopharmacol. 2011;11(9):1293-7.

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;190:624-31.

Ishida K, de Castro RA, Borba Dos Santos LP, Quintella LP, Lopes-Bezerra LM, Rozental S. Amphotericin B, alone or followed by itraconazole therapy, is effective in the control of experimental disseminated sporotrichosis by Sporothrix brasiliensis. Med Mycol. 2015, 53(1):34-41

Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. Annu Rev Immunol. 2002;20:197-216.

Jang SE, Joh EH, Lee HY, Ahn YT, Lee JH, Huh CS, Han MJ, Kim DH. Lactobacillus plantarum HY7712 ameliorates cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. J Microbiol Biotechnol. 2013;23:414-21.

Jensen HE. Animal Models in Mycology. In: *Handbook Of Laboratory Animal Science*, chapter 8, 2nd ed, CRC Press LLC, 2003, p. 125-152.

Joyce RA, Hartmann O, Chervenick PA. Splenic granulopoiesis in mice following administration of cyclophosphamide. Cancer Res. 1979;39(1):215-8.

Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. Subsets of human dendritic cell precursors express different Toll-like receptors and respond to different microbial antigens. J Exp Med. 2001;194:863-9.

Kanakry CG, O'Donnell PV, Furlong T, de Lima MJ, Wei W, Medeot M, Mielcarek M, Champlin RE, Jones RJ, Thall PF, Andersson BS, Luznik L. Multi-institutional study of post-transplantation cyclophosphamide as single-agent graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic bone marrow transplantation using myeloablative busulfan and fludarabine conditioning. J Clin Oncol. 2014;32:3497-505.

Kajiwara H, Saito M, Ohga S, Uenotsuchi T, Yoshida S. Impaired host defense against Sporothrix schenckii in mice with chronic granulomatous disease. Infect. Immun. 2004, 72:5073–5079.

Kong X, Xiao T, Lin J, Wang Y, Chen HD. Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of Sporothrix schenckii infection. Clin Microbiol Infect. 2006;12:1077-81.

Korn, T.; Oukka, M.; Kuchroo, V.; Bettelli, E. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. Semin Immunol. 2007, 19(6): 362-371.

Korn,T.; Bettelli, E.; Oukka, M. IL-17 and Th17 cells. Annu. Re Immunol. 2009, 27: 485–517.

Krom BP, Cohen JB, McElhaney-Feser G, Busscher HJ, van der Mei HC, CihlarRL.Conditions for optimal Candida biofilm development in microtiter plates. Methods Mol Biol. 2009;499:55-62.

Lopes-Bezerra LM, Schubach A, Costa RO. Sporothrix schenckii and sporotrichosis. An Acad Bras Cienc. 2006;78:293-308.

López-Romero E, Reyes-Montes Mdel R, Pérez-Torres A, Ruiz-Baca E, Villagómez-Castro JC, Mora-Montes HM, Flores-Carreón A, Toriello C. Sporothrix schenckii complex and sporotrichosis, an emerging health problem. Future Microbiol. 2011;6:85-102.

Lyon GM, Zurita S, Casquero J, Holgado W, Guevara J, Brandt ME, Douglas S, Shutt K, Warnock DW, Hajjeh RA; Sporotrichosis in Peru Investigation Team. Population-based surveillance and a case-control study of risk factors for endemic lymphocutaneous sporotrichosis in Peru. Clin Infect Dis. 2003;36:34-9.

Mahajan VK. Sporotrichosis: an overview and therapeutic options. Dermatol Res Pract. 2014.

Maia DC, Sassá MF, Placeres MC, Carlos IZ. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by Sporothrix schenckii. Mycopathologia. 2006,161:11-9.

Maia DC, Gonçalves AC, Ferreira LS, Manente FA, Portuondo DL, Vellosa JC, Polesi MC, Batista-Duharte A, Carlos IZ. *Response of Cytokines and Hydrogen Peroxide to Sporothrix schenckii* Exoantigen in Systemic Experimental Infection. Mycopathologia. 2016 Apr;181(3-4):207-15.

Marimon R, Gené J, Cano J, Trilles L, Dos Santos Lazéra M, Guarro J. Molecular phylogeny of Sporothrix schenckii. J Clin Microbiol. 2006; 44(9):3251-3256.

Marimon R, Cano J, Gene J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. Sporothrix brasiliensis, S. globosa, and S. mexicana, three new Sporothrix species of clinical interest. J Clin Microbiol 2007; 45:3198-206.

Ministério da Saúde. Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro. Gerência de Doenças transmitidas por vetores e zoonoses. Boletim epidemiológico 012/2014. Situação epidemiológica da esporotricose 2013/2014. Rio de Janeiro, 23 de dezembro de 2014.

Ministério da Saúde. Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro. Gerência de Doenças transmitidas por vetores e zoonoses. Boletim epidemiológico 007/2016.

Situação epidemiológica da esporotricose 2015/2016. Rio de Janeiro, 11 de outubro de 2016.

Mlambo G, Sigola LB. Rifampicin and dexamethasone have similar effects on macrophage phagocytosis of zymosan, but differ in their effects on nitrite and TNF-α production. Int Immunopharmacol. 2003; 3:513–522.

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

Nascimento RC, Espíndola NM, Castro RA, Teixeira PA, Loureiro y Penha CV, Lopes-Bezerra LM, Almeida SR. Passive immunization with monoclonal antibody against a 70-kDa putative adhesin of Sporothrix schenckii induces protection in murine sporotrichosis. Eur J Immunol. 2008;38:3080-3089.

Negrini TC, Ferreira LS, Alegranci P, Arthur RA, Sundfeld PP, Maia DC, Spolidorio LC, Carlos IZ. Role of TLR-2 and fungal surface antigens on innate immune response against Sporothrix schenckii. Immunol Invest. 2013;42:36-48.

Negrini TC, Ferreira LS, 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.

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

Oliveira MM, Almeida-Paes R, Gutierrez-Galhardo MC, Zancope-Oliveira RM. Molecular identification of the *Sporothrix schenckii* complex. Rev Iberoam Micol. 2014;31(1):2-6.

Palladino MA, Bahjat FR, Theodorakis EA. Anti TNF-a therapies: the next generation. Nat Rev Drug Disc, 2003; 2:736-746

Pass GJ, Carrie D, Boylan M, Lorimore S, Wright E, Houston B, Henderson CJ, Wolf CR. Role of hepatic cytochrome p450s in the pharmacokinetics and toxicity of cyclophosphamide: Studies with the hepatic cytochrome p450 reductase null mouse. Cancer Res. 2005; 65:4211-7.

Pluddemann A, Mukhopadhyay S, Gordon S. Innate immunity to intracellular pathogens: macrophage receptors and responses to microbial entry. Immunol Rev 2011; 240: 11-24

Pillai, Shiv; Abbas, Abul K.; Lichtman, Andrew HH. Imunologia celular e molecular. Elsevier Brasil, 2015.

Ramos-e-Silva M, Vasconcelos C, Carneiro S, Cestari T. Sporotrichosis. Clin Dermatol. 2007;25:181-7.

Ramos-e-Silva M, Lima CM, Schechtman RC, Trope BM, Carneiro S. Systemic mycoses in immunodepressed patients (AIDS). Clin Dermatol. 2012;30:616-27.

Ren Z, He C, Fan Y, Guo L, Si H, Wang Y, Shi Z, Zhang H. Immuno-enhancement effects of ethanol extract from Cyrtomium macrophyllum (Makino) Tagawa on cyclophosphamide-induced immunosuppression in BALB/c mice. J Ethnopharmacol. 2014 8;155:769-75.

Rocha MM, Dassin T, Lira R, Lima EL, Severo LC, Londero AT. Sporotrichosis in patient with AIDS: report of a case and review. Rev Iberoam Micol 2001; 18:133-6.

Rochette F, Engelen M, Vanden Bossche H. Antifungal agents of use in animal health-practical applications. J Vet Pharmacol Ther. 2003,26:31-53.

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.

Romagnoli G, Nisini R, Chiani P, Mariotti S, Teloni R, Cassone A, Torosantucci A. The interaction of human dendritic cells with yeast and germ-tube forms of Candida albicans leads to efficient fungal processing, dendritic cell maturation, and acquisition of a Th1 response-promoting function. J Leukoc Biol. 2004;75:117-26.

Ramasarma T. H_2O_2 has a role in cellular regulation. Indian J Biochem Biophys 1990; 27:269-74

Rop O, Mlcek J, Jurikova T. Beta-glucans in higher fungi and their health effects. Nutr Rev. 2009; 67(11):624-31.

Sassá MF, Ferreira LS, Ribeiro LC, Carlos IZ. Immune response against Sporothrix schenckii in TLR-4-deficient mice. Mycopathologia. 2012;174:21-30.

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

Satterwhite TK, Kageler WV, Conkoin RH, Portnoy BL, Dupont HL. Disseminated sporotrichosis. J Am Med Assoc. 1978;240:771-2.

Schubach A, Barros MB, Wanke B. Epidemic sporotrichosis. Curr Opin Infect Dis. 2008;21:129-33.

Schechtman RC. Sporotrichosis: Part I. Skinmed. 2010;8:216-20.

Schön MP, Schön M. Imiquimod: mode of action. Br J Dermatol. 2007;157 Suppl 2:8-13.

Sousa MG, Belda Jr W, Spina R, Lota PR, Valente NS, Brown GD, Criado PR, Benard G. Topical Application of Imiquimod as a Treatment for Chromoblastomycosis. Clinical Infectious Diseases. 2014;58(12):1734–7.

Sousa MG, Reid DM, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Ruland J, Langhorne J, Yamasaki S, Taylor PR, Almeida SR, Brown GD. Restoration of pattern recognition receptor costimulation to treat chromoblastomycosis, a chronic fungal infection of the skin. Cell Host Microbe. 2011;9:436-43.

Stanley MA. Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential. Clin Exp Dermatol. 2002; 27(7):571-7.

Teixeira PA, de Castro RA, Nascimento RC, Tronchin G, Torres AP, Lazéra M, de Almeida SR, Bouchara JP, Loureiro y Penha CV, Lopes-Bezerra LM. Cell surface expression of adhesins for fibronectin correlates with virulence in Sporothrix schenckii. Microbiology. 2009;155:3730-8.

Téllez MD, Batista-Duharte A, Portuondo D, Quinello C, Bonne-Hernández R, Carlos IZ. *Sporothrix schenck*ii complex biology: environment and fungal pathogenicity. Microbiology. 2014;160(Pt 11):2352-65.

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

Van Acker H, Van Dijck P, Coenye T. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. Trends Microbiol. 2014; (6):326-33.

Van Cutsem J. Oral and parenteral treatment with itraconazole in various superficial and systemic experimental fungal infections. Comparisons with other antifungals and combination therapy. Br J Clin Pract Suppl. 1990,71:32-40.

Vidal D. Topical imiquimod: mechanism of action and clinical applications. Mini Rev Med Chem. 2006;6(5):499-503.

Wang Y, Meng Q, Qiao H, Jiang H, Sun X. Role of the spleen in cyclophosphamide-induced hematosuppression and extramedullary hematopoiesis in mice. Arch Med Res. 2009;40(4):249-55.

Wang H, Wang M, Chen J, Tang Y, Dou J, Yu J, Xi T, Zhou C. A polysaccharide from Strongylocentrotus nudus eggs protects against myelosuppression and immunosuppression in cyclophosphamide-treated mice. Int Immunopharmacol. 2011;11:1946-53.

Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. Immunity. 2006;24(6):677-88.

Weaver CT, Murphy KM. The central role of the Th17 lineage in regulating the inflammatory/autoimmune axis. Semin Immunol. 2007 ;19(6):351-2.

Wiseman AC. Immunosuppressive Medications. Clin J Am Soc Nephrol. 2016; 11(2):332-43.

Yamaguchi H. Opportunistic fungal infections. In: Animal Models in Medical Mycology, Miyaji, M., Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1987, p. 101.

Zitvogel L, Galluzzi L, Smyth MJ, Kroemer G. Mechanism of action of conventional and targeted anticancer therapies: reinstating immunosurveillance. Immunity, 2013: 39(1), 74-88.

Capítulo 2

Gmail **Francine Manente <famanente@gmail.com>**

Fwd: Submission Confirmation for

1 mensagem

Iracilda Carlos <carlosiz@fcfar.unesp.br> 23 de janeiro de 2017 13:26
Para: Francine Manente <famanente@gmail.com>

—— Mensagem encaminhada ——
De: "Toxicology Letters" <eesserver@eesmail.elsevier.com>
Para: carlosiz@fcfar.unesp.br, iracildazeppone@gmail.com
Enviadas: Segunda-feira, 23 de janeiro de 2017 14:25:51
Assunto: Submission Confirmation for

Dear Dr. Iracilda Zeppone Carlos,

Your submission entitled "Experimental sporotrichosis in the cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice model" has been received by Toxicology Letters

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

Your username is: carlosiz@fcfar.unesp.br
If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/toxlet/automail_query.asp.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Toxicology Letters
–
Prof. Dr. Iracilda Zeppone Carlos
School of Pharmaceutical Science of Araraquara
Paulista State University Júlio Mesquita Filho, UNESP
CEP:14800-903
phone 55 16 3301-5712

Elsevier Editorial System(tm) for Toxicology Letters

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Experimental sporotrichosis in the cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice model

Article Type: Full Length Article

Keywords: Sporothrix schenckii, host resistance models, immunosuppression, cyclophosphamide

Corresponding Author: Dr. Iracilda Zeppone Carlos,

Corresponding Author's Institution: UNESP

First Author: Francine A Manente, MSc

Order of Authors: Francine A Manente, MSc; Camila C Faria, PhD; Lucas S Ferreira, PhD; Cleverton R Andrade, PhD; Juliana Jellmayer, MSc; Deivys L Portuondo, PhD; Alexander Batista-Duharte, PhD; Iracilda Zeppone Carlos

Abstract: This report describes a model of host resistance for the opportunistic fungi Sporothrix schenckii in immunosuppressed mice with cyclophosphamide (CY) to be used in studies of immunotoxicology and immunopharmacology. Two doses of CY were administered intraperitoneally, 200 mg/kg and a booster of 150 mg/kg at 9-day intervals. Three days after the first dose of CY the animals were infected subcutaneously with 1.8 x 108 yeast/mL (S. schenckii ATCC 16345). At 7 and 14 days post infection the animals were euthanized and analyzed the fungal load by unit forming colony count in the spleen and popliteal lymph nodes. The relative weight of thymus and spleen, splenic index, the frequency of T and B cells in spleen by flow cytometry, the hind paw inflammation index and cytokine (IL-17, IL-10 and IFN-γ) profile were measured. Histopathological studies of spleen and hind paw were also assessed. The immunosuppression status was confirmed at the evaluated days by reduction of relative weight of thymus, reduction of the splenic white pulp, the population of B and T lymphocytes and the cytokine profile in the treated mice with CY in comparison with non-treated groups, associated to higher fungal load in hind paw and spleen in the infected mice. The described model reveals an increasing susceptibility and severity of the infection associated to immunosuppression. This model can serve as reference for studies of Sporothrix schenckii host resistance in pharmaceutical and toxicological studies.

Highlights

- Immunosuppressed mice by cyclophosphamide exhibited higher fungal load in footpad.
- The hind paw inflammation was lower in immunosuppressed and infected mice.
- Immunosuppression favoured the systemic fungal dissemination.

*Manuscript
Click here to view linked References

Experimental sporotrichosis in the cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice model

Francine A. Manente[a]‡; Camila C. G. de Faria[a]‡; Lucas S. Ferreira[a]; Cleverton R. de Andrade[b], Juliana Jellmayer[a]; Deivys L. Portuondo[a]; Alexander Batista-Duharte[a]; Iracilda Z. Carlos[a]*

[a]Faculty of Pharmaceutical Sciences. Universidade Estadual Paulista Julio Mesquita Filho, UNESP, Araraquara, Brazil

[b]Dentistry College. Universidade Estadual Paulista Julio Mesquita Filho, UNESP, Araraquara, Brazil

‡These authors contributed equally to this work. FAM and CCGF are considered first authors on this work.

***Corresponding Author**

Department of Biosciences and Biotechnology Applied to Pharmacy, Araraquara's School of Pharmaceutical Sciences, Universidade Estadual Paulista-UNESP, Júlio Mesquita Filho, Rod. Araraquara-Jaú - Km 1 Postal Code: 14801-902 Araraquara, SP, Brazil.

Tel.: +55 16 3301 5713; Fax: +55 16 3332 0880; Fone: (16) 3301 5713

E-Mail: carlosiz@fcfar.unesp.br (I.Z. Carlos).

Abstract

This report describes a model of host resistance for the opportunistic fungi *Sporothrix schenckii* in immunosuppressed mice with cyclophosphamide (CY) to be used in studies of immunotoxicology and immunopharmacology. Two doses of CY were administered intraperitoneally, 200 mg/kg and a booster of 150 mg/kg at 9-day intervals. Three days after the first dose of CY the animals were infected subcutaneously with 1.8 x 10^8 yeast/mL (*S. schenckii* ATCC 16345). At 7 and 14 days post infection the animals were euthanized and analyzed the fungal load by unit forming colony count in the spleen and popliteal lymph nodes. The relative weight of thymus and spleen, splenic index, the frequency of T and B cells in spleen by flow cytometry, the hind paw inflammation index and cytokine (IL-17, IL-10 and IFN-γ) profile were measured. Histopathological studies of spleen and hind paw were also

assessed. The immunosuppression status was confirmed at the evaluated days by reduction of relative weight of thymus, reduction of the splenic white pulp, the population of B and T lymphocytes and the cytokine profile in the treated mice with CY in comparison with non-treated groups, associated to higher fungal load in hind paw and spleen in the infected mice. The described model reveals an increasing susceptibility and severity of the infection associated to immunosuppression. This model can serve as reference for studies of *Sporothrix schenckii* host resistance in pharmaceutical and toxicological studies.

Key words: *Sporothrix schenckii*, host resistance models, immunosuppression, cyclophosphamide

1. Introduction

Despite the existence of sophisticated molecular and genetic techniques to identify defects in resistance pathways at the molecular and message level, the host resistance assays using opportunist microorganisms remain the gold standard against which changes at the molecular or cellular level of immune function can be judged. This is due to resistance to infection, regardless of the actual pathogen, involves multiple pathways of effectors' function to neutralize or eliminate pathogens (Luebke 2007). Isolated or multiple tests, are even insufficient to evaluate the consequences of the immunosuppression for the risk of specific infections in several cases. Thus, host resistance assays are the best measure of a toxicant's effect on the overall ability to mount an effective immune response and protect the host from infectious disease (Burleson and Burleson, 2008)

Sporotrichosis is a chronic fungal infection caused by different species of *Sporothrix schenckii* complex that most frequently affects cutaneous and subcutaneous tissues and adjacent lymphatics (Barros et al. 2011). Sporotrichosis has been described on five continents, with a higher prevalence in tropical and subtropical regions (Carlos and Batista-Duharte, 2015, Chakrabarti et al. 2015). Infection generally occurs following traumatic inoculation with soil, plants and organic matter contaminated with the fungus causing cutaneous and subcutaneous infection, leading to plaque formation as warts and lesions papules. Both manifestations can progress to ulcerative lesions. The main clinical manifestations of sporotrichosis are the lymphocutaneous forms, but the number of systemic and visceral cases has increased, particularly in immunocompromised patients (Barros et al. 2011). Zoonotic transmission has been increasing significantly, with a recent report of an epidemic outbreak with zoonotic transmission by infected cats in Brazil (Gremião et al. 2015).

Disseminated *S schenckii* infection usually occurs in the context of cellular immunodeficiency associated with alcoholism, diabetes, sarcoidosis, tuberculosis, organ transplantation, malignancy, use of immunosuppressive agents, or AIDS (Yamaguchi 1987, Lyon et al. 2003, Lopes-Bezerra et al. 2006, Rocha et al. 2001; Freitas et al. 2011, Ramos-e-Silva et al. 2012, Chang et al. 2013). Nowadays the influence of the environmental factors in the development of sporotrichosis associated to immunosuppression by xenobiotics is being studied (Tellez et al. 2014, Batista-Duharte, 2015). Thus, having a host resistance models using *S. schenckii* as opportunistic fungi in immunosuppressed mice, will be a contribution for studies of sporotrichosis immunopathogenesis, the search of new prophylactic or therapeutic tools and evaluating the effects of xenobiotics in the susceptibility of sporotrichosis.

Cyclophosphamide (CY) is an alkylating agent that can inhibit both the humoral and cellular immune responses. It is widely used as cytotoxic drug in the anticancer therapy and as immunosuppressive drug in autoimmune diseases and organ transplants, including prophylaxis of graft-versus-host disease (GVHD) after myeloablative allogeneic bone marrow transplantation (Boumpas et al. 1992, Kanakry et al. 2014, Wiseman 2015). CY and Methotrexate (MTX) are the more frequently reported antineoplastic drugs associated to sporotrichosis administrated in combined therapy joint to other immunosuppressive drug (Stalkup et al. 2002, Gottlieb et al. 2003, Wroblewska et al. 2005, Yamaguchi et al. 2012, Mahajam et al. 2015). In 1981, the susceptibility to sporotrichosis in a murine model of cyclophosphamide immunosuppression was described (Hachisuka and Sasai, 1981). However not further description of *S. schenckii* as host resistance model in immunosuppressed mice using quantitative immunological biomarkers were made.

This study aimed to develop a murine model of host resistance to *S. schenckii sensu stricto* in immunosuppressed mice with CY as a tool for future studies of immunotoxicity and immunopharmacology in sporotrichosis.

2. Materials and Methods

2. 1 Animals

Male Balb/c mice, 5-7 week old at the time of inoculation, were purchased from "Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório" (CEMIB), Universidade de Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brazil. Animals were housed in individually ventilated cages in an ambient with controlled temperature and

12-h light/dark cycles. Water and food were offered *ad libitum*. All procedures were approved by the Institutional Ethics Committee (Protocol CEP/FCF/CAR no. 04/2014) and were in accordance with the National Institutes of Health Animal Care Guidelines.

2. 2 Microorganism and culture conditions

S schenckii, ATCC 16345 isolated from a case of human lung infection (Baltimore, MD), was kindly provided by Department of Microbiology, Materials laboratory references the Oswaldo Cruz Foundation, National Institute of Quality Control in Health, Rio de Janeiro, Brazil. Currently this isolated sustained in the Department of Clinical Analysis, Araraquara's School of Pharmaceutical Sciences, Universidade Estadual Paulista-UNESP, Júlio Mesquita Filho, in the filamentous phase amid Mycosel^{TM} at room temperature (± 25°C). The yeast form is obtained in BHI (Brain Heart Infusion, Difco) at 37°C under constant stirring of 150 rpm / min for 5 days.

2. 3 Preparation of the heat-killed (HKss**) *S. schenckii* yeast**

HKss cells were prepared from the same 5-day-old culture of the fungus in brain-heart infusion broth used for animal infection in each respective experiment (Ferreira et al. 2015). Yeast cells were separated from the supernatant by centrifugation at 200×g for 5 min at room temperature, washed twice with 8mL of sterile PBS, pH 7.4 (hereafter, PBS), and then ressuspended and adjusted to 2.5×108 yeast cells/mL in PBS. After that, three to four 1.5mL aliquots of this suspension were transferred to disposable sterile 15mL conical tubes, incubated for 1 h in a 60 ˚C water bath and then stored at 2–8 ◦C until use. A working suspension was obtained by making a 1/10 dilution of the stock suspension in RPMI complete medium (defined as the base RPMI- 1640 medium containing 20μM of 2β-mercaptoethanol, 100 U/mL of penicillin and streptomycin, 2mM of l-glutamine and 5% fetal calf serum). As a control for the efficiency of the heat-killing process, 100μL aliquots from each tube were inoculated on Mycosel agar plates and checked for CFU growth before use.

2. 4 Infection standardization

This kinetic study was performed to determinate the time when occurs the pick of the infection and the reduction of infection until the virtual fungal clearance. A yeast suspension was prepared in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 and each mouse was inoculated

subcutaneously into the left hind footpad with 1,6 x 10^7 yeast cells in 0.02 mL of sterile PBS, as described by Brito and colleagues (2007), with some modifications. Group of five animals were euthanized at the 0, 3, 7, 9, 11, 14, 21, 28 and 60 days after infection to determine of fungal load in spleen and lymph nodes by counting of colony forming units (CFU) and the relative spleen weight (spleen weight divided by body weight). Additionally, a test of survival for 60 days was conducted.

2.5 Immunosuppression model

Immunosuppression of animals was induced with cyclophosphamide (CY). Animals received an initial dose of 200mg/kg CY intraperitoneally in PBS, with maintenance doses of 150mg/kg at 9 days, as described by Huyan and colleagues (2011), with some adaptations fixed in previous studies for immunosuppression optimization. Mice were infected 3 days after the first administration of CY (Czink et al., 1992). Control animals received only PBS, by the subcutaneous and intraperitoneal routes. The mice were euthanized on days 7 and 14 after infection (according to the previous results) for the analysis of immunosuppression. Spleens were aseptically removed; splenic length, width and thickness were measured and used to calculate the splenic index, and weighted to evaluate the organ-to-body weight ratios (relative spleen weight). After that, the spleens were divided into two parts, one for histological analysis, the other for determine the number of CFU and to analyze the frequency of helper and cytotoxic T and B cells by flow cytometry. The thymus was also removed; weighed and the relative weight was measured. In addition, there was a survival test with immunocompromised and infected mice. The animals were maintained as previously described immunosuppressed and monitored for 60 days.

2.6 Preparation of total splenocytes

A previously described, weighted spleen piece was macerated in 2mL of sterile PBS, and passed through a 100µm cell strainer into a Petri dish. For red cell lysis, the resulting suspension was added with 6mL of a 0.17 M ammonium chloride solution and then incubated on ice for 5 min. The splenocytes were then separated from the supernatant by centrifugation at 300×g for 5 min at 4°C, washed once with 3mL of RPMI complete medium and then ressuspended in 1mL of the same medium. Cell concentration was determined by microscopy

using the Trypan blue exclusion test and then the splenocytes were adjusted to 5×10^6 cells/mL in RPMI complete medium.

2. 7 Flow cytometry of lymphocyte subpopulations

To analyze the lymphocytes subpopulations, spleen cells were placed in a tube and subjected to 5-min erythrocyte lysis using NH_4Cl. After centrifugation and washing with PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA) (Sigma), 1 x 10^6 of cells were stained with monoclonal antibodies anti-mouse: fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD3, allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD4, peridinin–chlorophyll–protein–cyanine 5.5 (PerCP Cy5.5)-conjugated anti-CD8 and phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD19 for analysis of frequency of this cells on spleen.

2. 8 Measurement of the ex vivo release of cytokines

Cytokines IL-17, IL-10 e IFN-γ were measured in the cell culture supernatant by ELISA (eBioscience) according to the manufacturer's instructions. Splenocytes, obtained as described above, were cultured for 24 h at 37◦C and 5% CO2 on flat bottom 48-well tissue culture plates in the presence of HKss, at a splenocyte-to-yeast ratio of 1:5. Final concentrations were 2.5×10^6 splenocytes/mL and 1.25×10^7 yeast cells/mL. Concanavalin A (0.25μg/mL in RPMI complete medium) and RPMI alone were used as positive and negative controls, respectively.

2. 9 Fungal load in the spleen and popliteal lymph node

The fungal load in the spleen and popliteal lymph node of the animals was determined by counting the number of CFU recovered such organs after maceration as described above. For this, aliquots of the organs were diluted appropriately and plated on agar Mycosel™, incubated at 37°C and checked after 3 and 7 days for the count of CFU/g of organ.

2. 10 Hind paw inflammation index

The swelling of hind paws were measured once a week, by measuring the thickness of the hind paws from a lateral view using a digital caliper (Mitutoyo, Japan). The swelling

index was calculated for hind paws by the mean difference between the injected and the contra lateral paws.

2. 11 Spleen and footpads histopathology

After euthanasia, the spleen and footpads of the mice were removed aseptically and immediately submerged in 4% formaldehyde for histological analysis. Hematoxylin-eosin (H&E) stain was used to evaluate the decrease in the cellularity of the spleen white pulp in mice treated or not with CY and the Grocott-Gomori methenamine-silver nitrate stain was used to observe the presence of the fungi in the tissue. Analysis was made by optical microscopy (NIKON Eclipse TS100) and photos were captured by VD480 OPTMEDICAL software.

2. 12 Statistical analysis

Statistical analysis was performed in GraphPad Prism ver. 6.01, by using one- or two-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey or Sidak's multiple comparisons test, respectively, as indicated. Confidence interval was set at 95% for all tests. Groups of 3 or 4 animals were used in each experiment.

3. Results

3.1 Infection standardization

During the 60 days of the study, no mice mortality was recorded. As shown in Fig. 1 **A**, the days indicated, mice were euthanized, and both spleens and lymph nodes were removed for the evaluation of systemic fungal load. The, spleens were previously weighted.

The results show that local infection observed by the CFU in popliteal lymph node reached the peak on the 7th day post-infection and regressed gradually until the almost fungal clearance by most animals when completed 60 days post-infection. Moreover, the infection becomes systemic since the first three days post-infection with CFU in spleen.

Notably, the relative spleen weight increased at the beginning of the infection and, with the passage of days, it decreased along with the fungal load (Fig. 1 B). The first point of the graph represents the baseline relative weight, measured in control mice.

With this result were selected the 7th and the 14th days for fungal load and immunological evaluation in the further studies.

3.2. Relative weights and splenic index

The relative weight of spleen had a significant increase in immunosuppressed and infected mice when compared to all other groups both at 7th and 14th days. Moreover, relative weight of the spleen in mice both treated with CY and infected separately was higher than the control group treated with PBS. In this way, the body weight of the immunosupressed mice had reduced during the experiment (Fig. 2A). On the other hand, the relative weight of thymus just showed significant increase in immunosuppressed infected and non-infected mice when compared to the other groups (Fig. 2B).

The higher spleen index was observed in the group immunosuppressed and infected mice. However, interestingly both groups only immunosuppressed or only infected, also elevated their splenic index when compared to the control group on the studied days (Fig.3).

3.3. Flow cytometry of lymphocyte subpopulations from spleen

The populations of lymphocytes in spleen of the animals were defined as helper ($CD3^+CD4^+$) T cells, cytotoxic ($CD3^+CD8^+$) T cells and B ($CD19^+$) cells. Fig. 4 shows the results expressed as the mean ± SD of the frequencies (%) of cell populations obtained from each group on days indicated. Statistical analysis showed that the frequency of helper and cytotoxic T cells as well as B cells in the spleen of mice receiving CY infected or not, was significantly lower than control animals or infected without CY. This significant difference existed in both the 7 day and on the 14th day post-infection. Furthermore, it is possible to observe the maintenance of reduced frequency of T and B lymphocytes in the spleen of the animals to the 14th day post-infection certainly due to the booster dose. Interestingly, in this model a reduction in both subpopulations of T cells was observed at 7th and 14th days in non-treated and infected group but B cells were elevated at 7th day in comparison with the control group without both infection and treatment.

3.3. Cytokine production

When the group infected was compared with the group treated with CY and infected (CY+ fungi) it was possible observed a reduction in the production of all cytokines. However, the anti-inflammatory cytokine IL-10, was the least affected with the immunosuppressive therapy and the infection (Fig. 5).

3.4. Fungal load in spleen and local lymph node

The fungal load in spleen was similar between both groups infected (previously immunosuppressed or not), but at 14 day was observed a CFU reduction in the non-immunosuppressed group, while the immunosuppressed group still maintained high concentrations fungal colonization in the organ. In contrast, in the local lymph node there were not observed changes in the fungal load at 7^{th} and 14^{th} days in the same group, but the immunosuppressed mice showed higher fungal colonization (Fig. 6).

3.5. Histological analysis of spleen and footpad

The Fig. 7 depict histological sections from spleens of the animals immunosuppressed or not, 7^{th} and 14^{th} days, after infection with *S. schenckii* or not. The spleens of mice receiving only PBS presents its natural morphology in both the 7th and the 14th day post-infection, with obvious germinal centers and the normal relation of cellularity of white pulp (WP) containing lymphocytes and immune cells and red pulp (RP). Already in the spleen of immunosuppressed mice (infected and non-infected), it is possible to observe a marginal zone disorganization and absence of germinal centers, with decreased cellularity of white pulp. On the 7th day post-infection this characteristic seems to be more evident. At 7^{th} day, an infiltration of the red pulp with myeloid cells, as sign of extramedullary hematopoiesis (EMH), was observed in the immunosuppressed group. The myeloid cells infiltration was minor in the infected and immunosuppressed group and had very reduced at 14^{th} day of the study, being only observed in the peripherical areas of the red pulp.

The spleens of mice receiving only PBS presents its natural morphology in both the 7th and the 14th day post-infection, with germinal centers and the relation normal of cellularity of white pulp and red pulp. Already in the spleen of immunosuppressed mice it is possible to observe a marginal zone disorganization and absence of germinal centers, with decreased cellularity of white pulp. On the 7th day post-infection this characteristic seem to be more evident.

The spleen of infected animals presented only natural morphology, with the presence of germinal centers. But the spleen of immunocompromised and infected animals has morphology similar to the spleen of immunosuppressed animals and uninfected, with differences between the 7th and 14th days post-infection. On the 7th day, the germinal centers appear to try to retake its natural structure, organized due to the presence of the fungus. However, on day 14, with already reduced fungal load, it is seen again decreased cellularity of the white pulp of the spleen and an absence of germinal centers.

3.6. Hind paw inflammation index and fungal infiltration

As depict the Fig. 8, infected and immunocompetent mice exhibited the highest inflammation index. Despite the hind paw inflammation index in the CY+fungi group, was lower than the infected group, the fungal colonization in the immunosupressed group was higher.

Discussion

For the achievement of an efficient host defense against pathogenic fungi an adequate function of innate and adaptive immune response are necessary (Underhill and Pearlman 2015). In the case of sporotrichosis, the causal agent is considered opportunistic and the host immune response determines the clinical forms of this disease (Gutierrez-Galhardo et al 2015). Different studies performed of our group using murine models of *S. schenckii* infection, evidenced the role of the innate and adaptative immune response in controlling the fungus in different moments of the infectious process. (Maia et al. 2006, 2015, Negrini et al. 2013; Sassá et al. 2009, 2012; Verdan et al. 2013; Alegranci et al. 2013; Gonçalves et al. 2015; Ferreira et al. 2015). At present, there is great interest in developing therapeutic and prophylactic alternatives based in immunomodulation for the control of this disease (de Almeida et al. 2015, Portuondo et al, 2016; Batista-Duharte et al. 2016, Manente et al. 2016, Oliveira et al. 2017). In this context, the development of a *S. schenckii* host resistance model in immunosuppressed mice would be extremely useful and necessary for conducting successful studies of experimental infections of this opportunistic fungus, including immunotoxicological and immunopharmacological assessment.

Immunosuppressive drugs have often been used to obtain a state of immunodeficiency in mice (Czink et al. 1992, Wang et al. 2011, Salva et al. 2014; Ren et al. 2014). In our study, mice were immunosuppressed using CY owing to the wide use of this drug as an immunosupressor in different animal models for fungal diseases (Czink et al. 1992,

Hachisuka and Sasai, 1981). Thus, a reasonable selection of CY dose, time and frequency of administration are critical for the successful establishment of CY-induced immunosuppression animal models, resulting in effective inhibition of immune function and survival of the animals at long-term (Huyan et al. 2011). Among the effects caused by cyclophosphamide highlights the induction of myelosuppression, since this drug interferes in the proliferation and differentiation of bone marrow cells (Guest e Uetrecht 2000, Pass et al. 2005). These changes are associated with a marked leukopenia and neutropenia and increased susceptibility to infections (Jang et al. 2013; Buisman et al. 1999).

To optimize our experimental model of infection with *S. schenckii*, mice were inoculated subcutaneously with 20μL of a suspension of 8×10^8/mL of yeast. After that they were euthanized in different intervals for monitoring the fungal load in the draining lymph node (in this case, the popliteal lymph node in the left rear paw) and in the spleen, to evaluate the evolution from local to infection systemic infection. Also, the relative spleen weight was evaluated. The results of the infection kinetics showed that both local and systemic infection reached its peak by day 7 post-infection and regressed gradually. Even at 60^{th} days post-infection all mice survived, in spite of the high fungal dose used. We decided to evaluate in the following studies on days 7^{th} and 14^{th}, coinciding with the maximal fungal load and around half of the decreasing phase.

The protocol of immunosuppression adopted was based on the data reported by Huyan and colleagues (2011), which showed that high doses of CY (150-200 mg/kg) are able to decrease the frequency of T helper cells (CD3+CD4+) and cytotoxic (CD3+CD8+) and B cells (CD19+), inhibiting the innate immunity and adaptive animal. Still, the authors show that on the 10th day post-CY, the percentage of T and B lymphocytes begins to gradually increase, but less than half the percentage basal and only return to normal levels in 30-60 days. In addition, Salva and colleagues (2014) have reported that a single dose CY (150 mg/kg) induced a significant decrease in the number of blood leukocytes at day 1 post-CY decreasing until the 3rd day. On day 3 there was an increase in the number of leukocytes, which achieved normal values after 8 days. Between days 9 and 11 post-CY, these values were higher than normal, returning to baseline after 12 days. From these data, we decided to administer a booster for the maintenance of immunosuppression animals.

The day of infection adopted was based on work reported by Czink and colleagues (1992), which described that mice were infected with *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Plasmodium berghei* 3 days after administration of the first dose of CY.

In our study, we observed a significant decrease in lymphocyte populations in the spleen of immunosuppressed animals, both on the 7th day as the 14th post-infection. The maintenance of the reduced frequency of T and B lymphocytes in the spleen of these animals to the 14th day, demonstrates the need and efficiency of the booster dose. Interestingly, infected mice without CY treatment exhibited a significant reduction in the T cells populations, while the B cells were elevated in comparison with the control group. In this way, there are evidences that *S. schenckii* is able to induce transitory T-cell unresponsiveness associated to endogenous nitric oxide (Fernandes et al. 2008). This transitory immunosuppression seems to be a mechanism for immune evasion and different mechanisms still insufficient studied can be involved.

The reduced count in T cells matched with the relative weight of the thymus showing the immunosuppression status. On the other hand, is possible that the fungal load influenced the relative weight of the spleen since immunosuppressed mice had significant higher relative weight of the spleen associated to the colonization of the fungi in this organ.

Concordant effects were observed in the spleen histological analysis, where the mice receiving only PBS presents its natural morphology, on the 7th and the 14th day post-infection, with germinal centers and the normal relation of cellularity of white pulp and red pulp. In the spleen of immunosuppressed mice there was a disorganization of the marginal zone with the absence of germinal centers, and consequent decreased cellularity of white pulp. Interestingly it as observed areas of extramedular granulopoiesis within the red pulp, as expression of the severe medular insufficiency due to the immunosupression (Joyce et al. 1979, Wang et al. 2009). However, in infected mice treated with CY a reduction of areas with splenic granulopoiesis was observed, possibly owing to the migration of granulocytes toward the other areas of fungal infiltration. At 14^{th} days there was still a marked reduction of the white pulp in the immunosuppressed mice.

The immunosuppression induced by CY favored the fungal load in local lymph nodes and in spleen. In the site of fungal inoculation was observed a mild reduction of the inflammatory response associated to a higher fungal colonization compared with the immunocompetent mice. This reduction of the local inflammation was also associated to a reduction in the cytokine production, mainly IFNγ and IL-17 in the immunosuppressed mice. This reduction in the cytokine production can be due to the reduction in the T cells populations and inhibition of protein synthesis caused by a high dose cyclophosphamide. Contrarily, in low dose CY exhibit immunostimulatory activities (Sistigu et al. 2011).

In summary, these experimental results support the clinical reports of cases of sporotrichosis in patients under long lasting treatment with this CY (Yamaguchi et al. 2012). The described murine model reveals an increasing susceptibility and severity of the fungal infection associated to immunosuppression by CY, so it can serve as reference in immunotoxicological evaluation using *S. schenckii* for host resistance assays and in immunopharmacology studies evaluating drug candidates and vaccines for prevention and treatment of sporotrichosis in immunosuppressed host.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

Financial support was provided by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo; Grants #: 2015/04023-0 and 2014/00914-5) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Fig 1. A) Kinetics infection. UFC spleen and popliteal lymph node of infected mice subcutaneously with *S. schenckii*. B) Relative spleen weight (spleen weight/animal weight) of infected mice subcutaneously with *S. schenckii*.

Fig 2. Relative (A) spleen and (B) thymus weight (organ weight ÷ animal weight) immunosuppressed mice (or not), 7 and 14 days after infection with *S. schenckii* (or not). The data represent the mean ± DP of 4 animals. *$p<0.05$; **$p<0.01$; ***$p<0.001$; ****$p<0.001$. All groups showed significantly greater difference when compared to the PBS group at each point corresponding unless otherwise indicated. Relative thymus weight was significantly reduced in mice receiving CY infected or not, especially in the 14 day post-infection with a significant difference between these groups.

Fig 3. Splenic index (length × width × thickness) immunosuppressed mice (or not), 7 and 14 days after infection with *S. schenckii* (or not). The data represent the mean ± DP of 4 animals. *$p<0.05$; **$p<0.01$; ***$p<0.001$; ****$p<0.001$. All groups showed significantly greater

difference when compared to the PBS group at each point corresponding unless otherwise indicated.

Fig 4. Frequency (%) of $CD3^+CD4^+$ and $CD3^+CD8^+$ T lymphocytes and B lymphocytes $CD19^+$ in spleen samples of immunosuppressed mice (or not), 7 and 14 days after infection with *S. schenckii* (or not). The graphs represent the mean values of each group by day examined. *$p<0.05$; **$p<0.01$; ***$p<0.001$; ****$p<0.001$. All groups showed significantly greater difference when compared to the PBS group (spleen).

Fig 5. Measurements of IFN γ, IL-17 and IL-10 in spleen samples of immunosuppressed mice (or not), at 7th days after infection with *S. schenckii* (or not). The graphs represent the mean values of each group by day examined. *$p<0.05$; **$p<0.01$; ***$p<0.001$; ****$p<0.001$. All groups showed significantly greater difference when compared to the PBS group (spleen).

Fig. 6. CFU obtained from (A) spleen and (B) popliteal lymph node of infected and immunosuppressed or only infected mice, 7 and 14 days after infection footpad with *S. schenckii*. The data represent the mean of each group*$p<0.05$; **$p<0.01$. Non-infected mice groups were also studied but fungal growth was not observed in them (data not shown).

Fig 7. Histology of spleen at 7th and 14th days after infection. PBS: spleen of mice which received PBS by the intraperitoneal and subcutaneous. CY: spleen of mice which received doses of cyclophosphamide intraperitoneally and subcutaneously PBS. Fungi: mice which received PBS by the intraperitoneal route and suspending yeast *S. schenckii* 8×10^8 / mL subcutaneously. CY + Fungi: mice which received doses of cyclophosphamide intraperitoneally and suspending yeast *S. schenckii* 8×10^8 / mL subcutaneously. WP: White pulp; RP: Red pulp; EMH: Extramedular hematopoiesis.

Fig 8. Hind paw inflammation (A) and fungal infiltration index (B) in control (PBS), immunosuppressed with CY (CY), infected (Fungi) or infected and immunosuppressed mice (CY+Fungi). C) Representative images of the hind paw inflammation and microscopic fields of fungal (*Sporothrix schencki*) infiltration (Gomori-Grocott methenamine silver stain) (100x)

References

Alegranci P, de Abreu Ribeiro LC, Ferreira LS, Negrini Tde C, Maia DC, Tansini A, Gonçalves AC, Placeres MC, Carlos IZ. (2013) The predominance of alternatively activated macrophages following challenge with cell wall peptide-polysaccharide after prior infection with *Sporothrix schenckii*. Mycopathologia.;176(1-2):57-65.

Barros MB, de Almeida Paes R, Schubach AO (2011). *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. Clin Microbiol Rev;24:633-54.

Batista-Duharte A, Martínez DT, da Graça Sgarbi DB, Carlos IZ. Environmental Conditions and Fungal Pathogenicity. in: I.Z. Carlos (Ed.), Sporotrichosis. New Developments and Future Prospects, Springer International 2015.

Batista-Duharte A, Lastre M, Romeu B, Portuondo DL, Téllez-Martínez D, Manente FA, Pérez O, Carlos IZ (2016). Antifungal and immunomodulatory activity of a novel cochleate for amphotericin B delivery against Sporothrix schenckii. Int Immunopharmacol;40:277-287.

Boumpas DT, Austin HA 3rd, Vaughn EM, Klippel JH, Steinberg AD, Yarboro CH, Balow JE (1992) Controlled trial of pulse methylprednisolone versus two regimens of pulse cyclophosphamide in severe lupus nephritis. Lancet;340:741-5.

Brito MM, Conceição-Silva F, Morgado FN, Raibolt PS, Schubach A, Schubach TP, Schäffer GM, Borba CM. (2007) Comparison of virulence of different *Sporothrix schenckii* clinical isolates using experimental murine model. Med Mycol;45:721-9.

Buisman AM, Van Zwet TL, Langermans JA, Geertsma MF, Leenen PJ, van Furth R. (1999) Different effect of granulocyte colony-stimulating factor or bacterial infection on bone-marrow cells of cyclophosphamide-treated or irradiated mice. Immunology.;97:601-10.

Burleson GR, Burleson FG (2007). Influenza virus host resistance model. Methods. ;41(1):31-7.

Burleson GR, Burleson FG (2008). Testing human biologicals in animal host resistance models. J Immunotoxicol;5:23-31.

Carlos I.Z., Batista-Duharte A., Sporotrichosis: An emergent disease, in: I.Z. Carlos (Ed.), Sporotrichosis. New Developments and Future Prospects, Springer International 2015.

Chakrabarti A, Bonifaz A, Gutierrez-Galhardo MC, Mochizuki T, Li S. (2015) Global epidemiology of sporotrichosis. Med Mycol.;53:3-14.

Chang S, Hersh AM, Naughton G, Mullins K, Fung MA, Sharon VR. (2013) Disseminated cutaneous sporotrichosis. Dermatol Online J.;19:20401.

Czink I, Koncz Á, Molnár S, Hernádi S, Hernádi F. (1992) Neutropenia induced by cyclophosphamide. Mouse model. Pharmacological Research.;25:296-7.

de Almeida JR, Kaihami GH, Jannuzzi GP, de Almeida SR. (2015) Therapeutic vaccine using a monoclonal antibody against a 70-kDa glycoprotein in mice infected with highly virulent Sporothrix schenckii and Sporothrix brasiliensis. Med Mycol;53(1):42-50.

Fernandes KS, Neto EH, Brito MM, Silva JS, Cunha FQ, Barja-Fidalgo C. (2008) Detrimental role of endogenous nitric oxide in host defence against *Sporothrix schenckii*. Immunology.;123(4):469-79.

Ferreira LS, Gonçalves AC, Portuondo DL, Maia DC, Placeres MC, Batista-Duharte A, Carlos IZ. (2015) Optimal clearance of *Sporothrix schenckii* requires an intact Th17 response in a mouse model of systemic infection. Immunobiology.;220:985-92.

Freitas DF, de Siqueira Hoagland B, Do Valle AC, Fraga BB, de Barros MB, de Oliveira Schubach A, de Almeida-Paes R, Cuzzi T, Rosalino CM, Zancope-Oliveira RM, Gutierrez-Galhardo MC. (2011) Sporotrichosis in HIV-infected patients: report of 21 cases of endemic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. Med Mycol;50:170-8.

Gonçalves AC, Maia DC, Ferreira LS, Monnazzi LG, Alegranci P, Placeres MC, Batista-Duharte A, Carlos IZ. Involvement of major components from *Sporothrix schenckii* cell wall in the caspase1 activation, nitric oxide and cytokines production

Gottlieb GS, Lesser CF, Holmes KK, Wald A. (2003) Disseminated sporotrichosis associated with treatment with immunosuppressants and tum or necrosis factor-alpha antagonists. Clin Infect Dis;37(6):838-40.

Gremião ID, Menezes RC, Schubach TM, Figueiredo AB, Cavalcanti MC, Pereira SA. (2015) Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. Med Mycol.;53:15-21.

Guest L, Uetrecht J. (2000) Drugs toxic to the bone marrow that target stromal cells Immunopharmacol;46:103-12.

Gutierrez-Galhardo, M.C; Freitas, D.F.S; do Valle, A.C.F; Francesconi, A.C. Clinical forms of human sporotrichosis and host immunocompetence. In: Carlos IZ ed. Sporotrichosis. New developments and future prospects. ISBN 978-3-319-11911-3. Springer International Publishing Switzerland. pp:73-82.

Hachisuka H, Sasai Y. (1981) Development of experimental sporotrichosis in normal and modified animals. Mycopathologia.;76:79-82.

Huyan XH1, Lin YP, Gao T, Chen RY, Fan YM. (2011) Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice. Int Immunopharmacol;11:1293-7.

Jang SE, Joh EH, Lee HY, Ahn YT, Lee JH, Huh CS, Han MJ, Kim DH. (2013) Lactobacillus plantarum HY7712 ameliorates cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. J Microbiol Biotechnol;23:414-21.

Joyce RA, Hartmann O, Chervenick PA. (1979) Splenic granulopoiesis in mice following administration of cyclophosphamide. Cancer Res. ;39(1):215-8.

Kanakry CG, O'Donnell PV, Furlong T, de Lima MJ, Wei W, Medeot M, Mielcarek M, Champlin RE, Jones RJ, Thall PF, Andersson BS, Luznik L. (2014) Multi-institutional study of post-transplantation cyclophosphamide as single-agent graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic bone marrow transplantation using myeloablative busulfan and fludarabine conditioning. J Clin Oncol.;32:3497-505.

Lopes-Bezerra LM, Schubach A, Costa RO. (2006) *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. An Acad Bras Cienc.;78:293-308.

Luebke RW. (2007) Nematodes as host resistance models for detection of immunotoxicity. Methods. ;41:38-47.

Lyon GM, Zurita S, Casquero J, Holgado W, Guevara J, Brandt ME, Douglas S, Shutt K, Warnock DW, Hajjeh RA; (2003) Sporotrichosis in Peru Investigation Team. Population-based surveillance and a case-control study of risk factors for endemic lymphocutaneous sporotrichosis in Peru. Clin Infect Dis;36:34-9.

Mahajan VK, Mehta KS, Chauhan PS, Gupta M, Sharma R, Rawat R. (2015) Fixed cutaneous sporotrichosis treated with topical amphotericin B in an immune suppressed patient. Med Mycol Case Rep.;7:23-5.

Maia DC, Sassá MF, Placeres MC, Carlos IZ. (2006) Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. Mycopathologia.;161:11-9.

Maia DCG, Gonçalves AM, Ferreira LS, Manente FA, Portuondo DL, Vellosa JCR, Polesi MC, Batista-Duharte A, Carlos IZ. (2016) Response of cytokines and hydrogen peroxide to *Sporothrix schenckii* exoantigen in systemic experimental infection. Mycopathologia.;181(3-4):207-15.

Manente, F. A., Ferreira, L. S., Quinello, C., de Faria, C., Gonçalves, A. C., Loesh, M. L. & Carlos, I. Z. (2016). Assessment of imiquimode, alone or in association with itraconazol, as an alternative for sporotrichosis therapy. Cytokine, 87, 87-88.

Negrini T de C, Ferreira LS, Alegranci P, Arthur RA, Sundfeld PP, Maia DC, Spolidorio LC, Carlos IZ. (2013) Role of TLR-2 and fungal surface antigens on innate immune response against *Sporothrix schenckii*. Immunol Invest.;42:36-48.

Oliveira AH, de Oliveira GG, Carnevale Neto F, Portuondo DF, Batista-Duharte A, Carlos IZ. (2017) Anti-inflammatory activity of Vismia guianensis (Aubl.) Pers. extracts and antifungal activity against *Sporothrix schenckii*. J Ethnopharmacol.;195:266-274.

Pass GJ, Carrie D, Boylan M, Lorimore S, Wright E, Houston B, Henderson CJ, Wolf CR. (2005) Role of hepatic cytochrome p450s in the pharmacokinetics and toxicity of cyclophosphamide: Studies with the hepatic cytochrome p450 reductase null mouse. Cancer Res.;65:4211-7.

Portuondo DL, Batista-Duharte A, Ferreira LS, Martínez DT, Polesi MC, Duarte RA, de Paula E Silva AC, Marcos CM, Almeida AM, Carlos IZ. (2016) A cell wall protein-based vaccine candidate induce protective immune response against *Sporothrix schenckii* infection. Immunobiology.;221(2):300-9.

Ramos-e-Silva M, Lima CM, Schechtman RC, Trope BM, Carneiro S. (2012) Systemic mycoses in immunodepressed patients (AIDS). Clin Dermatol.;30:616-27.

Ren Z, He C, Fan Y, Guo L, Si H, Wang Y, Shi Z, Zhang H. (2014) Immuno-enhancement effects of ethanol extract from Cyrtomium macrophyllum (Makino) Tagawa on cyclophosphamide-induced immunosuppression in BALB/c mice. J Ethnopharmacol.;155:769-75.

Rocha MM, Dassin T, Lira R, Lima EL, Severo LC, Londero AT. (2001) Sporotrichosis in patient with AIDS: report of a case and review. Rev Iberoam Micol;18:133-6.

Salva S, Marranzino G, Villena J, Agüero G, Alvarez S. (2014) Probiotic Lactobacillus strains protect against myelosuppression and immunosuppression in cyclophosphamide-treated mice. Int Immunopharmacol.;22:209-21.

Sassá MF, Ferreira LS, de Abreu Ribeiro LC, Carlos IZ. (2012) Immune Response Against *Sporothrix schenckii* in TLR-4-Deficient Mice. Mycopathologia.;174:21-30.

Sassá MF, Saturi AE, Souza LF, Ribeiro LC, Sgarbi DB, Carlos IZ. (2009) Response of macrophage Toll-like receptor 4 to a *Sporothrix schenckii* lipid extract during experimental sporotrichosis. Immunology.;128:301-9.

Sistigu A1, Viaud S, Chaput N, Bracci L, Proietti E, Zitvogel L. (2011) Immunomodulatory effects of cyclophosphamide and implementations for vaccine design. Semin Immunopathol. ;33(4):369-83.

Stalkup JR1, Bell K, Rosen T. (2002) Disseminated cutaneous sporotrichosis treated with itraconazole. Cutis. ;69(5):371-4.

Téllez MD, Batista-Duharte A, Portuondo D, Quinello C, Bonne-Hernández R, Carlos IZ. (2014) *Sporothrix schenckii* complex biology: environment and fungal pathogenicity. Microbiology.;160:2352-65.

Underhill DM, Pearlman E. (2015) Immune Interactions with Pathogenic and Commensal Fungi: A Two-Way Street. Immunity.;43(5):845-58.

Verdan FF, Faleiros JC, Ferreira LS, Monnazzi LG, Maia DC, Tansine A, Placeres MC, Carlos IZ, Santos-Junior RR. (2012) Dendritic cell are able to differentially recognize *Sporothrix schenckii* antigens and promote Th1/Th17 response in vitro. Immunobiology. ;217:788-94.

Wang H, Wang M, Chen J, Tang Y, Dou J, Yu J, Xi T, Zhou C. (2011) A polysaccharide from Strongylocentrotus nudus eggs protects against myelosuppression and immunosuppression in cyclophosphamide-treated mice. Int Immunopharmacol.;11:1946-53.

Wang Y, Meng Q, Qiao H, Jiang H, Sun X. (2009) Role of the spleen in cyclophosphamide-induced hematosuppression and extramedullary hematopoiesis in mice. Arch Med Res. ;40(4):249-55.

Wiseman AC. (2016) Immunosuppressive Medications. Clin J Am Soc Nephrol. ;11(2):332-43.

Wroblewska M, Swoboda-Kopec E, Kawecki D, Sawicka-Grzelak A, Stelmach E, Luczak M. (2005) Infection by a dimorphic fungus Sporothrix schenckii in an immunocompromised patient. Infection. ;33(4):289-91.

Yamaguchi H. Opportunistic fungal infections. In: Animal Models in Medical Mycology, Miyaji, M., Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1987, p. 101.

Yamaguchi T, Ito S, Takano Y, Umeda N, Goto M, Horikoshi M, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Sumida T. (2012) A case of disseminated sporotrichosis treated with prednisolone, immunosuppressants, and to cilizumab under the diagnosis of rheumatoid arthritis. Intern Med. ;51(15):2035-9.

Figure 1

Click here to download high resolution image

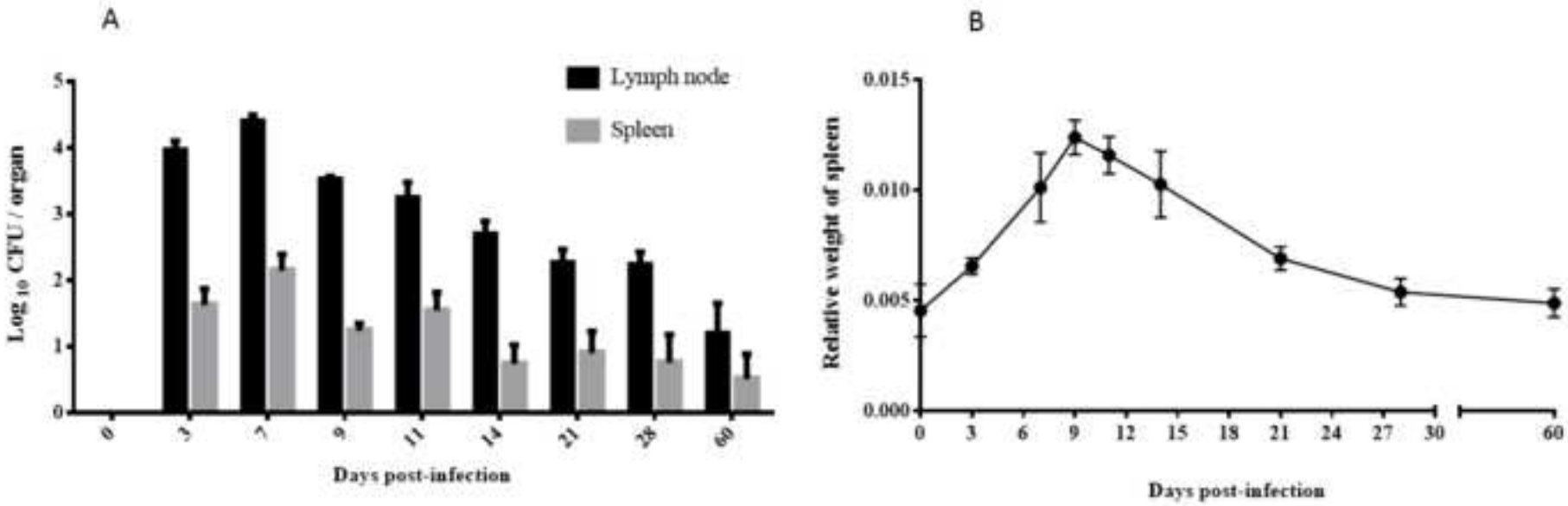


Fig 1

Figure 2

Click here to download high resolution image

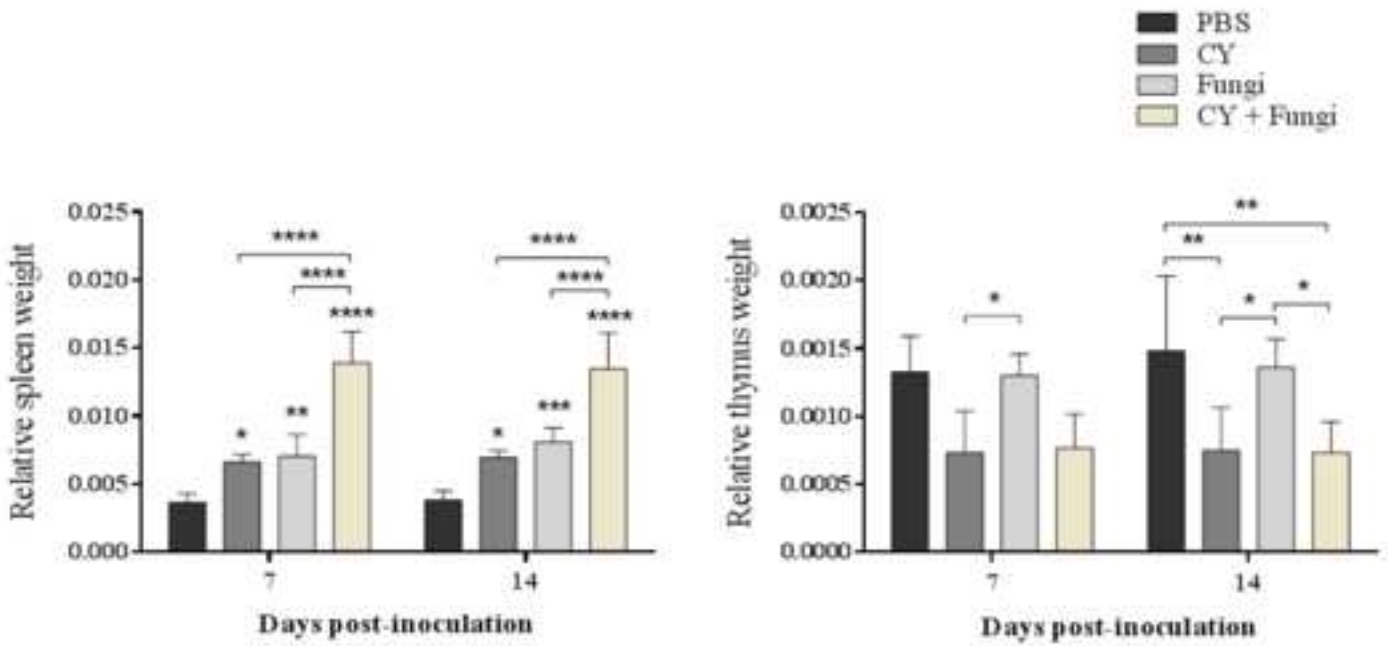


Fig 2.

Figure 3
Click here to download high resolution image

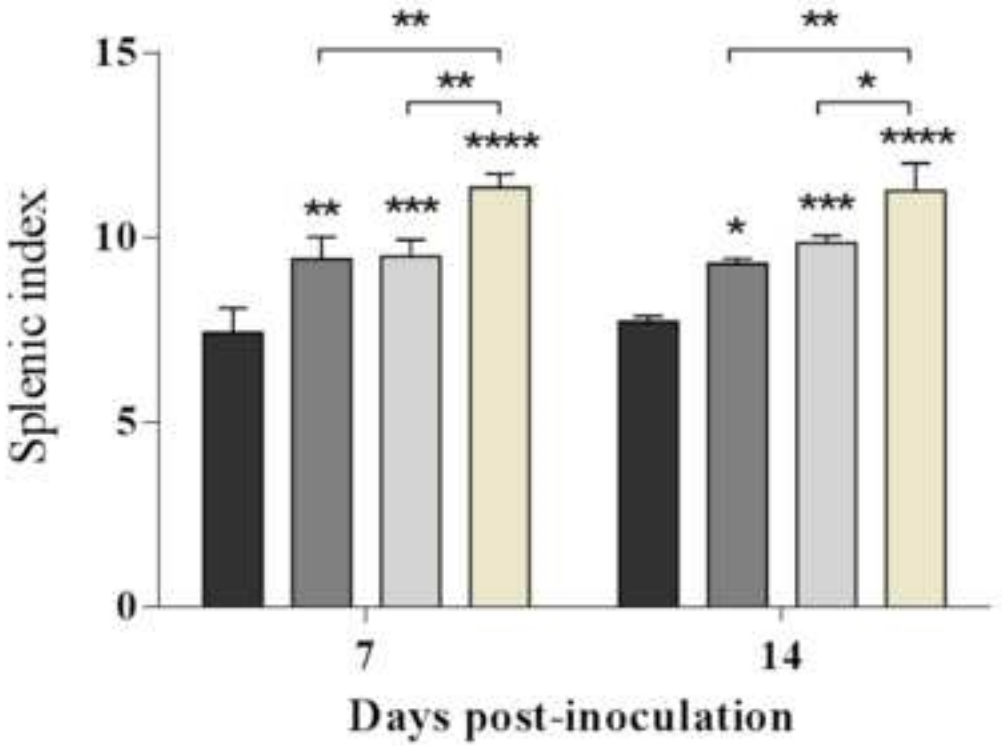


Fig 3.

Figure 4

Click here to download high resolution image

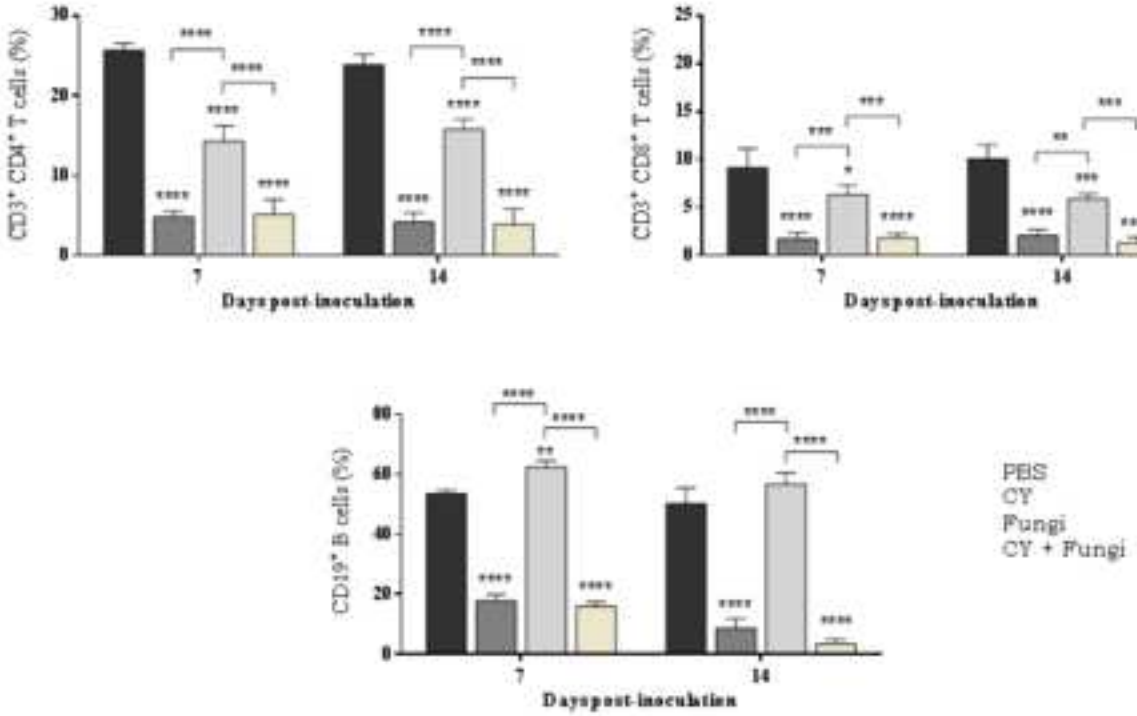


Fig 4

Figure 5

Click here to download high resolution image

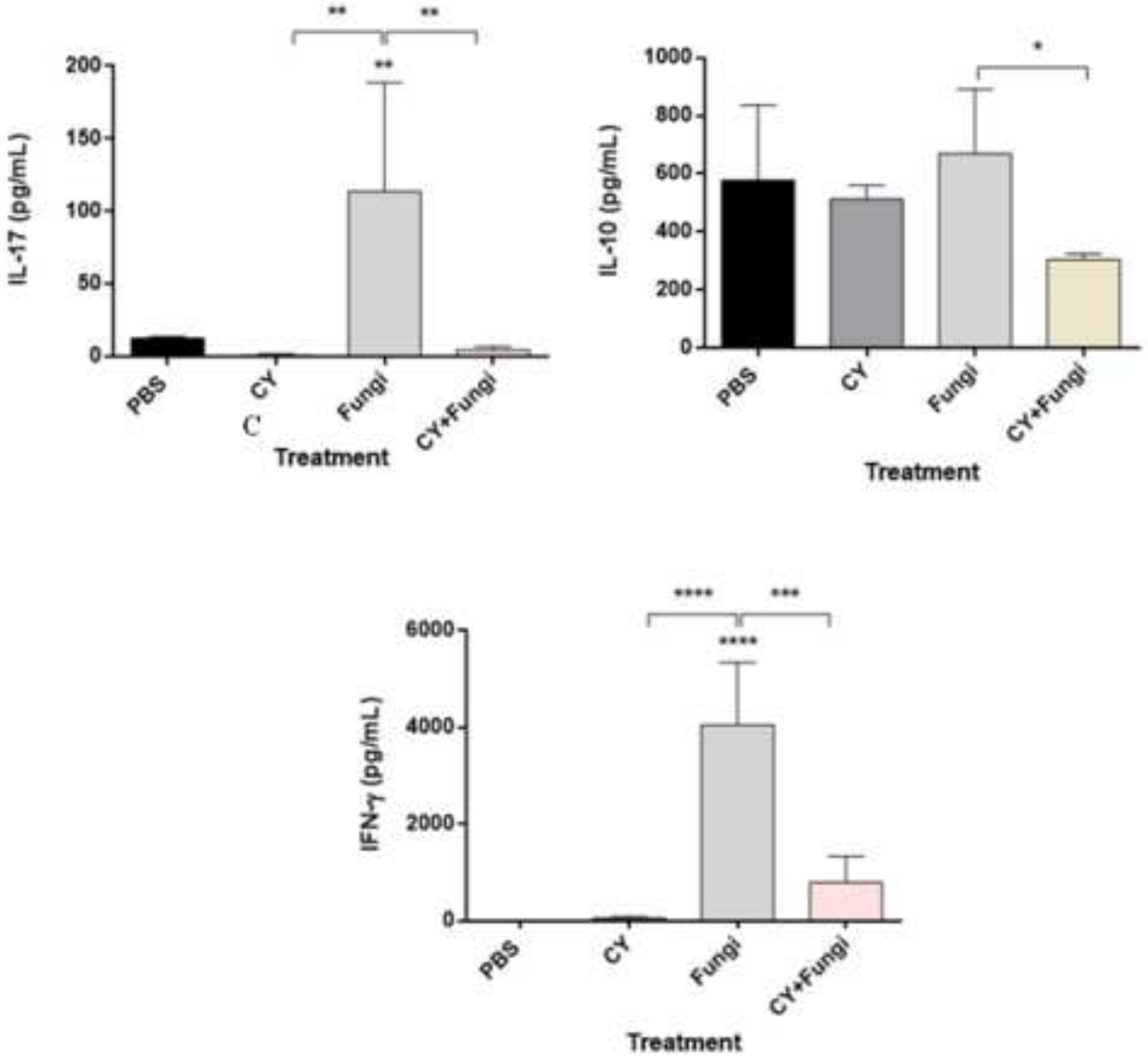


Fig 5

Figure 6

Click here to download high resolution image

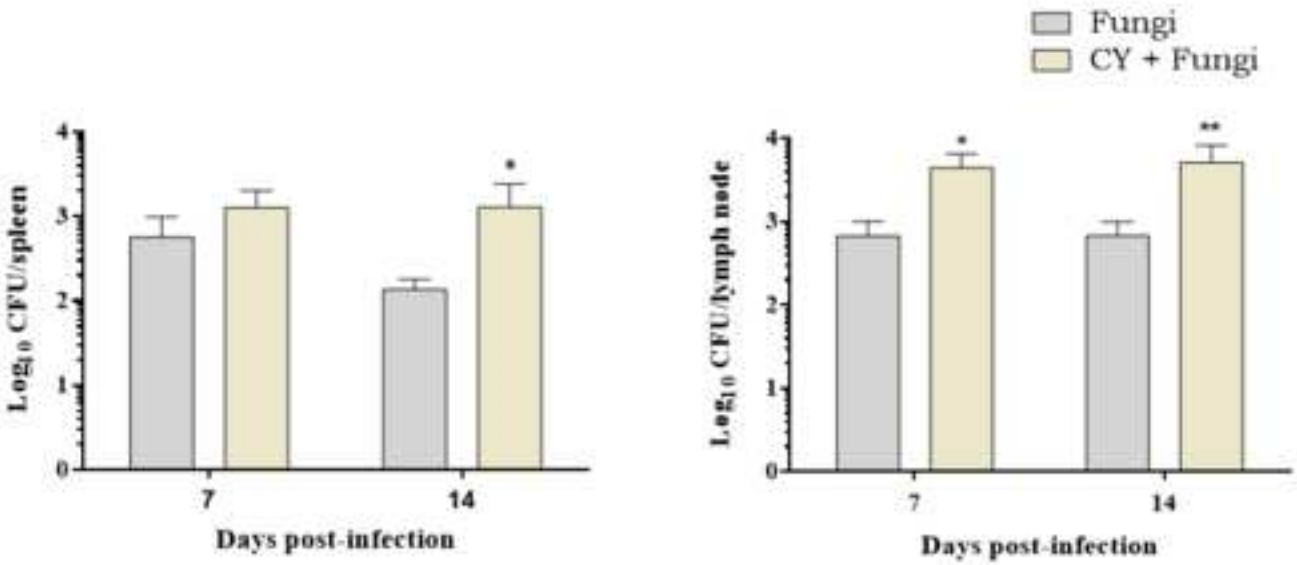


Fig 6.

Figure 7

Click here to download high resolution image

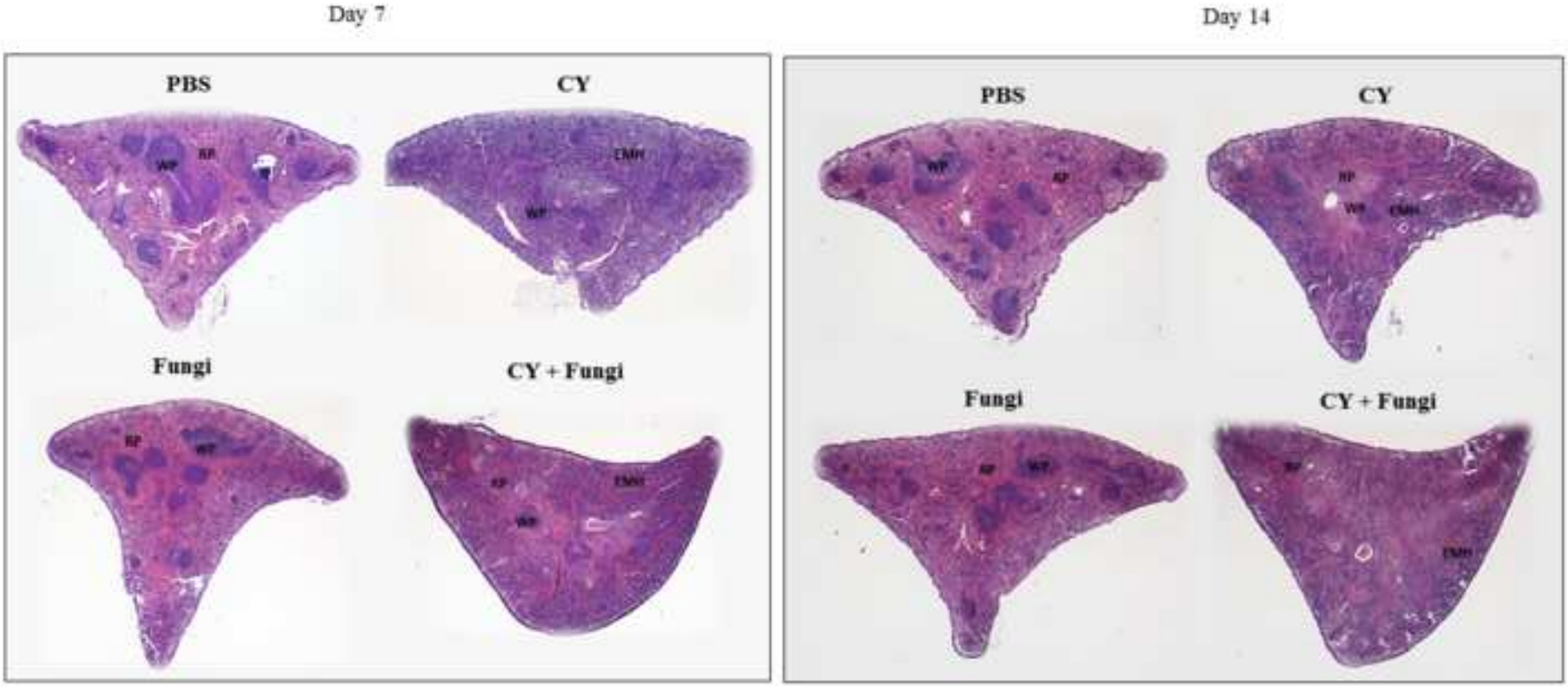
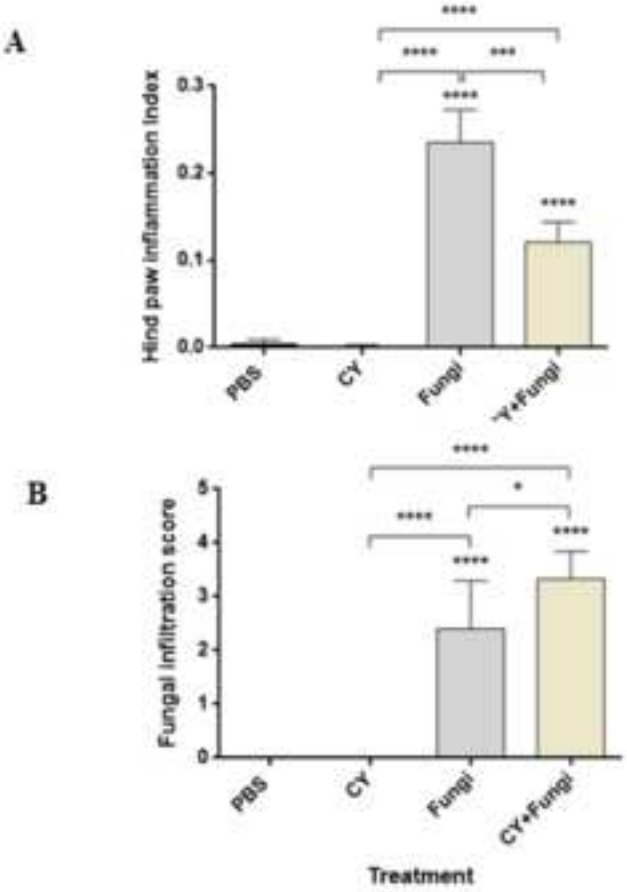


Fig 7

Figure 8

Click here to download high resolution image



Fungal units (100x magnification bright-field microscope)	Score
Absent	0
Very scarce (< 5)	1
Moderate (5 to 10)	2
Intense + (> 10 isolate)	3
Intense ++ (> 10 agrupated)	4