

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

Modulação da resposta imune por antígenos da parede celular de
Sporothrix schenckii em modelo murino de esporotricose

Lucas Souza Ferreira

Texto apresentado ao Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Campus de Araraquara, para a defesa de dissertação de mestrado, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Iracilda Zeppone Carlos

Araraquara - SP

“A fé não move montanhas. Na verdade, coloca montanhas onde não há nenhuma.”

“O homem chega à sua maturidade quando encara a vida com a mesma seriedade que uma criança encara uma brincadeira.”

Friedrich Nietzsche

“I’m not insane. My mom had me tested.”

Sheldon Cooper

Dedicatoria

Dedico o conjunto desta obra, suas partes e conseqüências, primeiramente a mim mesmo, visto ser eu aquele diretamente interessado e, conseqüentemente, beneficiado pela conclusão da mesma.

Dedico também aos meus pais, pela provisão dos recursos financeiros e sociais que auxiliaram no início e conclusão daquilo que é aqui tratado, além de indiretamente beneficiados no que tange a importância desta etapa como um passo rumo à extinção da relação de dependência financeira e desafogamento do sistema sócio-econômico familiar.

Agradecimentos

Agradeço inicialmente à professora Iracilda, dada a disponibilidade e acessibilidade com que fui recebido e acomodado como seu aluno.

Secundariamente no que tange à ordem do texto, mas de maneira alguma menos importante, agradeço à Marisa (ou seria Marilsa...) e à Dani (vulgo Danielle) por todo o apoio e suporte, tanto técnico quanto intelectual e até mesmo pessoal.

Ademais, agradeço também aos diversos colegas de função, protagonistas de ajuda mútua, dos quais não cito os nomes pelo compromisso que isso traria de não me esquecer de nenhum, aliado à falta de gratidão que seria não mencionar alguns. Ficam aqui minhas intenções de que aquele que ler este texto e, porventura sentir-se injustiçado, imagine seu nome escrito em caixa-alta, sublinhado e em negrito, citado de forma carinhosa em fonte idêntica a esta, exceção feita à utilização do branco como cor da mesma.

Índice

<i>Lista de figuras</i>	7
<i>Lista de tabelas</i>	8
<i>Abstract</i>	10
<i>Resumo</i>	11
<i>1. Introdução</i>	12
<i>2. Revisão da literatura</i>	14
2.1. O fungo <i>Sporothrix schenckii</i>	14
2.2. Antígenos de <i>S. schenckii</i>	16
2.3. Modelo experimental e resposta imune inata.....	19
2.4. Resposta imune adaptativa.....	21
<i>3. Objetivos</i>	27
<i>4. Materiais e métodos</i>	28
4.1. Delineamento experimental	28
4.2. Microorganismo e condições de cultivo	29
4.3. Morte da cultura e separação das células leveduriformes	29
4.4. Obtenção do antígeno da parede celular (PPC).....	29
4.5. Preparação do fungo <i>S. schenckii</i> termo-inativado (SSTI).....	30
4.6. Animais e grupos experimentais	30
4.7. Infecção dos animais	31

4.8. Obtenção e cultura dos macrófagos peritoneais	31
4.9. Obtenção e cultura dos esplenócitos totais e sobrenadantes	32
4.10. Avaliação da viabilidade celular dos macrófagos	33
4.11. Avaliação da viabilidade celular dos linfócitos.....	33
4.12. Determinação da produção de óxido nítrico	34
4.13. Determinação da liberação de citocinas.....	35
4.14. Análise dos resultados	36
5. Resultados.....	37
5.1. Avaliação da viabilidade celular dos macrófagos	37
5.2. Avaliação da viabilidade celular dos esplenócitos totais	39
5.3. Avaliação da produção de óxido nítrico	40
5.4. Avaliação da liberação de TNF- α	42
5.5. Avaliação da liberação de IL-10	44
5.6. Avaliação da liberação de IFN- γ	45
5.7. Avaliação da liberação de IL-4	47
5.8. Avaliação da liberação de IL-17	49
5.9. Avaliação da liberação de IL-23p19.....	51
5.10. Sumário dos resultados obtidos com as citocinas.....	51
6. Discussao.....	53
7. Conclusoes.....	60
8. Referencias.....	61

ANEXO I: TABELAS

ANEXO II: ARTIGO CIENTÍFICO

Lista de figuras

Figura 1. Viabilidade das células do exsudato peritoneal (PEC) dos camundongos Swiss infectados e controles.

Figura 2. Viabilidade dos esplenócitos totais dos camundongos Swiss infectados e controles.

Figura 3. Produção de NO pelos macrófagos peritoneais dos camundongos Swiss infectados e controles.

Figura 4. Determinação da liberação ex-vivo de TNF- α no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss infectados e controles.

Figura 5. Determinação da liberação ex-vivo de IL-10 no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss infectados e controles.

Figura 6. Determinação da liberação ex-vivo de IFN- γ no sobrenadante de cultura de esplenócitos totais de camundongos Swiss infectados e controles.

Figura 7. Determinação da liberação ex-vivo de IL-4 no sobrenadante de cultura de esplenócitos totais de camundongos Swiss infectados e controles.

Figura 8. Determinação da liberação ex-vivo de IL-17 no sobrenadante de cultura de esplenócitos totais de camundongos Swiss infectados e controles.

Figura 9. Comparação entre as citocinas liberadas em resposta ao PPC ou SSTI nos animais infectados ao longo do experimento.

Lista de tabelas

Tabela 1: Viabilidade celular das PEC dos animais infectados.

Tabela 2: Viabilidade celular das PEC dos animais controle.

Tabela 3: Viabilidade celular dos esplenócitos dos animais infectados.

Tabela 4: Viabilidade celular dos esplenócitos dos animais controle.

Tabela 5: produção de NO pelas PEC dos animais infectados.

Tabela 6: produção de NO pelas PEC dos animais controle.

Tabela 7: liberação de TNF- α pelas PEC dos animais infectados.

Tabela 8: liberação de TNF- α pelas PEC dos animais controle.

Tabela 9: liberação de IL-10 pelas PEC dos animais infectados.

Tabela 10: liberação de IL-10 pelas PEC dos animais controle.

Tabela 11: liberação de IFN- γ pelos esplenócitos dos animais infectados.

Tabela 12: liberação de IFN- γ pelos esplenócitos dos animais controle.

Tabela 13: liberação de IL-4 pelos esplenócitos dos animais infectados.

Tabela 14: liberação de IL-4 pelos esplenócitos dos animais controle.

Tabela 15: liberação de IL-17 pelos esplenócitos dos animais infectados.

Tabela 16: liberação de IL-17 pelos esplenócitos dos animais controle.

Abstract

Sporotrichosis is a micotic infection of universal distribution, which is caused by dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*. It usually happens as a lymphocutaneous disease, compromising skin, subcutaneous tissues and regional lymphatic nodules. Major constituents of *S. schenckii* cell wall are peptido-polysaccharide complexes containing rhamnose, mannose and galactose. These complexes are organized in two distinct layers in the fungus yeast cell wall, of which the inner one is called cell wall peptido-polysaccharide (PPC), being used as antigen in this study, along with the heat-killed yeast (SSTI). Antigens released by the fungus directly participate in evasion of the immune system, also serving as targets for fungus elimination by binding of antibodies or innate immune cells like macrophages. Our results showed that PPC induces inflammatory cytokines in a more pronounced way when compared to SSTI, which induced higher levels of IL-10. We also suggest that, in the animal model used, IL-10 doesn't act as a suppressor of splenocyte proliferative response, and that IL-4 play a role at the resolution phase of the infection, being not induced as a means of immunologic escape by the fungus. Also, we showed that the assayed antigens are capable of inducing IL-17 secretion in splenocyte cultures, in a fashion close to that of Th1 cytokines.

Keywords: *S. schenckii*, Heat-killed, Peptido-polysaccharide, Cytokines and Nitric Oxide.

Resumo

A esporotricose é uma micose de distribuição universal cujo agente é o fungo termodimórfico *Sporothrix schenckii*. A forma mais comum da doença é a linfocutânea, que compromete pele, tecido subcutâneo e gânglios linfáticos regionais. Os principais constituintes da parede celular de *S. schenckii* são compostos peptídeo-polissacarídicos contendo ramnose, manose e galactose. Estes compostos se arranjam na parede celular de modo a formar duas subcamadas distintas na forma leveduriforme do fungo, uma das quais, a mais interna e fixa delas, é denominada como peptídeo-polissacarídeo da parede celular (PPC) e foi utilizada como antígeno neste estudo, juntamente com a levedura termo-inativada (SSTI). Os antígenos liberados pelo fungo participam diretamente do processo de escape do sistema imune e também servem como alvos para a eliminação do mesmo por anticorpos ou ligação a receptores presentes em células da imunidade inata, como os macrófagos. Nossos resultados mostraram que o PPC induz citocinas de padrão inflamatório de forma mais pronunciada que o SSTI, que por sua vez induziu maior liberação de IL-10. Sugerimos também que no modelo experimental utilizado a IL-10 não atua provocando supressão da resposta proliferativa dos esplenócitos, e que a IL-4 atua apenas na fase de resolução da infecção, não sendo induzida como forma de escape imunológico pelo fungo. Também mostramos que os antígenos testados são capazes de induzir a liberação de IL-17 em culturas de esplenócitos, num perfil semelhante àquela das citocinas Th1.

Palavras-chave: *S. schenckii*, Termo-inativado, Peptídeo-polissacarídeo, Citocinas e Óxido Nítrico.

1. Introdução

Esporotricose é caracterizada pela evolução subaguda e crônica de lesões nodulares cutâneas e subcutâneas. É comumente causada pela inoculação traumática do fungo *Sporothrix schenckii* no tecido subcutâneo através de ferimentos envolvendo o solo, pela inalação de esporos pelo trato respiratório superior, ou como uma zoonose a partir de arranhões causados por gatos ou tatus (RAMOS-e-SILVA et al., 2007). Recentemente foi reportada sua ocorrência epidêmica no Rio de Janeiro, Brasil, envolvendo a transmissão por gatos infectados (SCHUBACH et al., 2008). Clinicamente é classificada nas formas linfocutânea, cutânea fixa, multifocal ou disseminada e, mais raramente, extracutânea. Vários componentes da superfície celular de *S. schenckii* foram caracterizados e implicados em sua patogenicidade, compostos por proteinases extracelulares, ergosterol peróxido, seu exoantígeno e, mais recentemente, a melanina (LANGFELDER et al., 2003; TABORDA et al., 2008) e adesinas com capacidade de ligação à fibronectina (TEIXEIRA et al., 2009). A resposta imune contra a infecção envolve células do sistema imune inato e adaptativo, com destaque para a função primordial dos macrófagos no reconhecimento e eliminação do fungo, junto com a participação de diversos mediadores como o NO, H₂O₂ e citocinas Th1 e Th2 (CARLOS et al., 2009). No entanto, *S. schenckii* é capaz de evadir esta resposta por vários mecanismos, escapando da fagocitose e modulando a resposta de citocinas. Estudos anteriores sugeriram como alguns dos componentes da parede celular deste fungo promovem seu escape da resposta imune do hospedeiro e coordenam o desenvolvimento de uma resposta Th1 ou Th2 (CARLOS et al., 1999; 2003; FERNANDES et al., 2000; MAIA et al., 2006; UENOTSUCHI et al., 2006). Neste estudo buscamos estender nossa compreensão destes

mecanismos pelo emprego de dois antígenos distintos daqueles testados até agora: o fungo íntegro termo-inativado e seu peptídeo-polissacarídeo da parede celular.

2. *Revisao da literatura*

2.1. *O fungo Sporothrix schenckii*

O *Sporothrix schenckii* é um fungo dimórfico, pertencente à classe dos Hyphomycetes, presente na natureza na forma de micélio, constituído de hifas septadas, hialinas, com conídios lateralmente na hifa ou em grupos no final dos conidióforos. É o agente etiológico da esporotricose, uma doença micótica de distribuição mundial, sendo mais comum nas regiões de clima temperado e tropical. Seu habitat natural é composto de plantas, arbustos, solo e materiais sob condições ambientais adequadas de temperatura e umidade (MORRIS-JONES, 2002; RAMOS-e-SILVA et al., 2007).

O fungo *S. schenckii*, quando se desenvolve a 37°C, *in vitro* ou em tecidos, cresce na forma de levedura, em muitos casos redondas, ovais ou em forma de charuto, e se reproduz por brotamento (GORI et al., 1997; DE ARAUJO et al., 2001; MORRIS-JONES, 2002). A 25°C cresce na forma de bolor, constituído de hifas hialinas, septadas e apresentando conídios unicelulares, hialinos que se desenvolvem ao longo das hifas e produzidos em arranjo de rosetas (MENDES-GIANINNI & MELHEM, 2001).

A doença afeta pessoas de qualquer idade, sexo ou raça e não precisa de fatores predisponentes para se desenvolver, porém é mais comum em homens adultos, devido a sua exposição ocupacional e recreacional. A infecção é adquirida através da implantação cutânea, em geral através de pequenos traumas com materiais contaminados com matéria orgânica do solo. Assim, as pessoas mais suscetíveis são aquelas ligadas a ocupações tais como fazendeiros, jardineiros, floristas, horticultores, mineradores e outros profissionais em contato com o solo e

plantas (NEYRA et al., 2005; RAMOS-e-SILVA et al., 2007). Mais raramente, o fungo pode ser inalado, aspirado ou ingerido, produzindo infecção sistêmica em indivíduos suscetíveis (LOPES et al., 1992).

A localização mais freqüente da esporotricose é em tecidos cutâneos e subcutâneos, podendo se limitar ao local de inoculação do fungo ou se espalhar pelo sistema linfático regional. No início da infecção, as lesões aparecem como uma pápula que gradativamente aumenta tornando-se nodular e freqüentemente ulcera (KAUFFMAN, 1999; LYON et al., 2003). Mesmo em face da regularidade na virulência do agente etiológico a doença apresenta ampla variedade de manifestações clínicas, dependendo do estado imunológico do hospedeiro (MORRIS-JONES, 2002; LOPES-BEZERRA et al., 2006). Em um estudo realizado por da Rosa et al. (2005), com a avaliação de 304 casos de esporotricose confirmados por cultura, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre o número de pacientes com a forma cutânea fixa e aqueles com a forma linfática. Em anos anteriores foram reportados vários casos de esporotricose devida à transmissão zoonótica por gatos no Rio de Janeiro. Dados compilados de 1998 a 2004 mostram que, neste período, 759 pessoas foram diagnosticadas com esporotricose no Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas. Destes, 83,4% reportaram contato com gatos portando esporotricose, e 55,8% dos mesmos também reportaram mordidas e arranhões de gatos (SCHUBACH et al., 2008). Recentemente, Mahajan et al. (2010) reportaram três casos mais raros de esporotricose envolvendo (1) o desenvolvimento da doença sobre um carcinoma de células basais nódulo-ulcerativo com sete anos de duração; (2) Esporotricose cutâneo-sistêmica disseminada, osteoarticular e possivelmente pleural; e (3) múltiplas lesões nodulares e pruríticas ao redor do tornozelo de uma paciente com duração de 2 anos.

As formas mais graves da esporotricose têm sido associadas a pacientes imunocomprometidos, como aqueles infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), tornando a esporotricose uma infecção emergente no que concerne ao aumento de sua gravidade (GORI et al., 1997; AL-TAWFIQ & WOOL 1998; DE ARAÚJO et al., 2001; NASCIMENTO et al.; 2005). Este ano foram reportados dois casos de pacientes com HIV que desenvolveram meningite por *S. schenckii*, associada com síndrome inflamatória da reconstituição imune (GALHARDO et al., 2010).

2.2. Antígenos de *S. schenckii*

Em *S. schenckii*, a forma leveduriforme possui uma fina camada de um composto peptídico-polissacarídico na superfície celular. Esta camada pode ser parcialmente liberada no meio de cultura por atrito, compreendendo uma série de produtos conjuntamente chamados de exoantígenos, os quais podem estar relacionados à resposta imune gerada durante a infecção (CARLOS et al., 2009). Ainda, estes antígenos da superfície celular do fungo *S. schenckii*, presentes tanto na fase micelial quanto na leveduriforme, podem levar à formação de resposta imune do tipo celular e induzir a produção de anticorpos (CASTILLO et al., 1990).

Poucos componentes protéicos ou glicoprotéicos foram, até o momento, identificados na parede celular deste fungo. A fração glicoprotéica, contendo 33,5% de ramnose, 57% de manose e 14,2% de proteína é chamada de peptídeo-ramnomanana, foi isolada da parede celular do *S. schenckii* na fase leveduriforme. A ramnose desempenha um papel importante na reação de hipersensibilidade do tipo imediata, enquanto que a porção peptídica está envolvida nas reações tardias (SHIMONAKA et al., 1975). O glicoconjugado contendo ramnose e manose foi detectado em uma fração isolada do filtrado de cultura de *S. schenckii* e se mostrou capaz de inibir a adesão

do fungo a proteínas da matriz extracelular, sugerindo a presença de adesinas na superfície deste patógeno. Posteriormente foi demonstrado que estas adesinas, colocalizadas com a glicoproteína de 70kDa (gp70) de *S. schenckii*, podem se ligar à fibronectina e que a capacidade de ligação está correlacionada com a virulência da cepa (TEIXEIRA et al., 2009). Além de ramnose e manose, polissacarídeos contendo galactose estão também sendo identificados na superfície deste fungo, sugerindo a presença de galactomanana (LOPES-BEZERRA et al., 2006).

Atualmente, a atenção tem sido voltada aos componentes do fungo que possam estar envolvidos no reconhecimento e na indução da resposta imune. Os mecanismos de virulência do fungo são pouco conhecidos, mas sugere-se que a termotolerância, as enzimas extracelulares e polissacarídeos estejam envolvidos. Algumas enzimas extracelulares como as fosfatases ácidas, produzidas pelo fungo, parecem desempenhar papel importante na interação das células leveduriformes de *S. schenckii* com os macrófagos (HOGAN et al., 1996; NASCIMENTO et al., 2005).

A virulência dos conídios do fungo está relacionada à composição de carboidratos da parede celular. Verificou-se que os conídios cultivados por um menor período de tempo foram mais virulentos e que em sua superfície havia maior proporção de ramnomanana em relação à manose (FERNANDES et al., 2000). O ergosterol isolado da membrana de formas leveduriformes do *S. schenckii* também pode estar relacionado à virulência deste fungo patogênico, como um mecanismo de evasão das espécies reativas do oxigênio durante a fagocitose através da formação ergosterol peróxido (SGARBI et al., 1997). Os determinantes antigênicos polissacarídeos bem caracterizados são as cadeias laterais contendo ramnose das ramnomananas de leveduras e micélios. Esses antígenos foram usados em testes de imunodifusão e imunoeletoforese (LOPES-BEZERRA et al., 2006), tendo sido observadas reações cruzadas

com vários tipos de *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* K₄₇ e 60 espécies de *Ceratocystis*.

Moléculas de ácido siálico também foram encontradas na superfície de *S. schenckii* e podem apresentar um papel na patogenicidade deste fungo, uma vez que as formas saprófitas não infectantes têm menos resíduos de ácido siálico em sua superfície que as formas infectantes. Corroborando este achado, a remoção enzimática dos resíduos de ácido siálico das formas infectantes de *S. schenckii* as tornam mais suscetíveis à fagocitose (ALVIANO et al., 1999).

A produção de melanina ou de produtos relacionados à melanina pelo fungo parece também estar relacionada à sua infectividade. Vários fungos dimórficos e patogênicos produzem melanina, como o *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitides*, *Coccidioides posadasii* e também *S. schenckii* (TABORDA et al., 2008). As cepas de *S. schenckii* produtoras de melanina mostraram-se menos suscetíveis à ação de intermediários de nitrogênio e oxigênio e à fagocitose do que as cepas não produtoras (ROMERO-MARTINEZ et al., 2000; MORRIS-JONES et al., 2003). Recentemente, Madrid et al. (2010) demonstraram que isolados pigmentados de *S. schenckii* possuem maior capacidade de invasão tecidual, promovendo a formação de granulomas multifocais, enquanto os isolados albinos induziram resposta inflamatória melhorada, ficando restringidos ao centro do granuloma (MADRID et al., 2010).

O peptídeo-ramnomanana, isolado da forma leveduriforme do fungo, foi testado em um modelo animal de doença sistêmica onde se verificou uma depressão na resposta imune entre a 4^a e 6^a semana de infecção nos animais estudados. Esse componente fúngico demonstrou atividade mitogênica quando testado em linfócitos normais, podendo estar envolvido na indução da

resposta imune contra o fungo (CARLOS et al., 1999). Ainda, tanto a galactomanana quanto a ramnomanana purificadas da superfície celular do *S. schenckii* são capazes de inibir a fagocitose das células leveduriformes pelos macrófagos peritoneais *in vitro* (LOPES-BEZERRA et al., 2006), demonstrando a participação destes componentes no reconhecimento do fungo por estas células.

Muito pouco é conhecido sobre as interações moleculares do *S. schenckii* com a superfície das células do hospedeiro. Estudos demonstraram que o fungo é capaz de se prender a várias proteínas da matriz extracelular como a fibronectina, laminina e colágeno do tipo II (FIGUEIREDO et al., 2004).

2.3. Modelo experimental e resposta imune inata

A infecção experimental pode ser facilmente induzida em camundongos pela injeção intraperitoneal ou intratesticular de células leveduriformes. Dentro de 10 dias desenvolve-se peritonite ou orquite grave. A doença pode se disseminar produzindo lesões destrutivas nos ossos e outros órgãos, levando à morte, geralmente dentro de três a quatro semanas (RESTREPO-GUTIERREZ et al., 1993).

Um modelo de esporotricose disseminada em murinos foi desenvolvido em nosso laboratório (CARLOS et al., 1992), onde a reação de hipersensibilidade tardia (*in vivo*) e o teste de transformação linfocitária (*in vitro*) mostraram depressão da resposta imune celular dos animais entre a 4^a e a 6^a semanas de infecção, acompanhada de aumento na multiplicação fúngica no fígado e baço dos camundongos infectados. Essa depressão na imunidade freqüentemente indica um agravamento da infecção, com maior comprometimento do hospedeiro (CARLOS et al., 1992, CARLOS et al., 1999). Esta deficiência na imunidade celular em camundongos com

infecção sistêmica pelo *S. schenckii* pode ser devida, em parte, à geração anormal de interleucina-1 (IL-1) e TNF- α pelos macrófagos ativados, prejudicando assim a amplificação da resposta imune (CARLOS et al., 1994). Ainda, a infectividade do *S. schenckii* pode também estar relacionada à via de entrada e à profundidade de inoculação (TACHIBANA et al., 1998).

O sistema imune é capaz de gerar um grande número de células e moléculas que podem eliminar uma variedade aparentemente ilimitada de agentes invasores. Essas células e moléculas atuam em conjunto proporcionando uma rede dinâmica primorosamente adaptável (GOLDSBY et al., 2000). Entre elas destacam-se neutrófilos, macrófagos, monócitos com papel essencial na atividade fagocítica e apresentadora de antígeno. (HUFFNAGLE et al., 2003; McCORMACK et al., 2003; ROMANI, 2004).

A resposta celular induzida na infecção gerada pelo *S. schenckii* envolve células como neutrófilos, monócitos e células T, possivelmente importantes em limitar a extensão da infecção causada pelo *S. schenckii* (SHIRAIISHI et al., 1992; CARLOS et al., 2009), já que a esporotricose é mais severa e usualmente disseminada em pacientes com AIDS e camundongos suscetíveis. Também, a interação entre as células apresentadoras de antígenos com os patógenos de natureza fúngica é fundamental, assim como o tipo celular envolvido e o perfil de produção de citocinas, para determinar o tipo de resposta imune (BALLOY et al., 2005; CHARALAMPOS et al., 2005, MAIA et al., 2006).

Os macrófagos são células essenciais para o reconhecimento e eliminação do *S. schenckii*. Uma vez ativados, se caracterizam por um rápido aumento no metabolismo, motilidade e atividade fagocítica, podendo desempenhar funções paralelas além da fagocitose. Essas células também secretam mais de cem produtos, dentre eles, enzimas, componentes do complemento,

fatores de coagulação e citocinas (ABBAS et al., 2007). A eliminação de microrganismos por macrófagos depende da fagocitose e também da liberação de compostos intermediários do oxigênio e nitrogênio. Diante disto, o componente lipídico da parede celular de *S. schenckii* desempenha um papel importante na patogênese da esporotricose, sendo capaz de inibir o processo fagocítico do fungo e induzir elevada liberação de óxido nítrico (NO) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em culturas de macrófagos (CARLOS et al., 2003).

Um dos RNIs mais estudados é o NO, sendo produzido por células do sistema imune como as células dendríticas, células NK, mastócitos e macrófagos (BOGDAN, 2001). Essa pequena e versátil molécula é formada através da oxidação do átomo de nitrogênio do aminoácido L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) e, logo em seguida, se transforma em nitrito (NO₂⁻) (MYERS et al., 2003). No sistema imune o NO interfere em vários processos como o de diferenciação, proliferação e apoptose de células imunológicas, na produção de citocinas e outros mediadores solúveis além da síntese de componentes da matriz extracelular (MARSHALL & STAMLER, 2000; BOGDAN et al., 2001).

Os efeitos citotóxicos do NO são importantes para a defesa inata do hospedeiro em relação a inúmeros patógenos, incluindo fungos, bactérias, parasitas e protozoários (GREEN et al., 2000). Estudos previamente realizados por nós demonstraram que o NO, juntamente com as espécies reativas do oxigênio (H₂O₂), contribui para a atividade citotóxica dos macrófagos durante a infecção pelo fungo *S. schenckii* (CARLOS et al., 2003). Esta sensibilidade ao NO é inversamente proporcional à virulência do *S. schenckii*, com cepas mais virulentas sendo menos suscetíveis ao NO que as menos virulentas (FERNANDES et al., 2000).

2.4. Resposta imune adaptativa

A resposta efetiva contra organismos fúngicos requer a contribuição coordenada da imunidade inata e adaptativa. A imunidade inata consiste de um mecanismo protetor desenvolvido inicialmente e que coordena a ativação das células da imunidade adaptativa por meio da apresentação de antígenos e produção de diversos mediadores como NO e as citocinas (GREEN et al., 2000; CHARALANPOS & ROILIDES, 2005).

O sistema imune adaptativo, sob estimulação do sistema inato, desempenha um papel crucial na resposta imune, com participação imprescindível das células B e T. Estas últimas compreendem os tipos citotóxico (células Tc) e “helper” (células Th), as quais, por sua vez, podem sofrer diferenciação para diversos fenótipos com ações efetoras ou de memória. Os diferentes fenótipos de Th são o resultado da ativação das células T “naive” face a diferentes estímulos (NOBEN-TRAUTH, 2000). Os clones Th se diferenciam em quatro categorias distintas, na dependência das citocinas produzidas. As células Th1 produzem IFN- γ , IL-2, TNF- α , e são eficientes na eliminação de patógenos intracelulares, via ativação de macrófagos. As células Th2 liberam IL-4, IL5, IL-6, IL-10, que ativam a imunidade humoral e são secretadas de maneira acentuada na presença de antígenos persistentes (RENGARAJAN et al., 2000). As células Treg, descobertas posteriormente, produzem elevados níveis de fator de crescimento transformante beta (TGF- β), uma citocina imunossupressora que também pode inibir a secreção de células Th1, com quantidades variáveis de IL-4 e IL-10 (WANG et al., 2003). Já as células Th17, que produzem caracteristicamente IL-17 e têm a IL-23 como provável fator de crescimento e diferenciação, atuam como pró-inflamatórias e regulam negativamente as outras subpopulações de células Th (McGEACHY & CUA, 2008).

Uma gama de citocinas está envolvida na resposta imune contra patógenos fúngicos, entre elas, IL-1, IL-6, IL-10 e TNF- α . Algumas citocinas como a IL-12 e IL-10 apresentam importante papel no desenvolvimento das células Th e na resposta inata (MENCACCI et al., 2000; HUFFNAGLE et al., 2003; ROMANI, 2004). Após o estímulo, monócitos/macrófagos começam a secretar IL-1 e IL-12, principalmente. A IL-12 ativa linfócitos Th1 que voltam a secretar IL-2, fator de necrose tumoral- β (TNF- β) e IFN- γ (KOVALOVSKY et al., 2000).

Estudos prévios de nosso grupo têm demonstrado envolvimento do NO e de citocinas Th1/Th2 na infecção sistêmica utilizando o exoantígeno de *S. schenckii*. Foram encontrados altos níveis de iNOS (óxido nítrico sintase induzível) e NO na fase aguda (entre a 4^a e 7^a semanas), se correlacionando com uma maior suscetibilidade do hospedeiro e liberação suprimida de algumas citocinas de padrão de Th1. Já na determinação do IFN- γ e IL-12 o perfil apresentado pelas citocinas estava de acordo com a detecção tanto de NO como de iNOS, mostrando a presença da resposta imune celular ao longo de todo o processo infeccioso. Em contrapartida, houve elevação da produção de citocinas Th2 a partir da 5^a semana, sugerindo a participação da resposta imune humoral em fase avançada da esporotricose (MAIA et al., 2006).

Estudos prévios em modelo murino têm sugerido que a imunidade adaptativa contra o antígeno do *S. schenckii* seja a chave do mecanismo de defesa imunológica do hospedeiro para o controle da infecção (FERNANDES et al., 2000; MAIA et al., 2006; UENOTSUCHI et al., 2006). Outros estudos revelam que a resposta do hospedeiro contra a esporotricose parece ser regida pelo perfil local de citocinas, no qual se observou a predominância de resposta tipo Th1 (MUGURUMA et al., 1995). Além disso, tem sido demonstrado que isolados obtidos a partir de casos clínicos são mais patogênicos do que os isolados do meio ambiente (NOBRE et al., 2005)

indicando que sucessivas passagens do fungo em animais podem aumentar a sua virulência, originando linhagens mais agressivas de *S. schenckii* que podem contribuir para a supressão da resposta imune (BARROS et al., 2003).

Embora algumas citocinas apresentem características marcantes de um perfil Th1 ou Th2, muitas delas, apresentam efeitos pleiotrópicos dependentes de sua dose e tempo de secreção para o desenvolvimento da resposta imune (ROMANI, 2004; CHARALANPOS & ROILIDES, 2005). Isso evidencia a importância do delicado balanço entre as citocinas Th1 e Th2 para o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva. Tal balanço é mantido, em parte, pela atuação das células Treg, importantes reguladoras da resposta imune indesejada *in vivo* durante uma patologia severa. São responsáveis pela produção de TGF- β , uma das moléculas chave para a tolerância periférica, com propriedades imunossupressoras (CARRIER et al., 2007).

O mecanismo pelo qual o TGF- β suprime a resposta imune *in vitro* é pouco conhecido. Recentes estudos demonstram múltiplos, algumas vezes contraditórios, efeitos imunomodulatórios de isoformas do TGF- β em vários tecidos e células alvo. As propriedades imunorregulatórias do TGF- β incluem inibição da proliferação de células T e B, afetando ambas as células CD4⁺ e CD8⁺, tanto em roedores como em humanos. O TGF- β inibe *in vivo* as células T e a adesão de neutrófilos a células endoteliais, o que limita a migração e o recrutamento de células inflamatórias ao órgão alvo. Tem-se demonstrado a secreção de TGF- β por uma variedade de células incluindo os macrófagos, células NK, células LAK, células B e as células T CD4⁺ e CD8⁺ (MILLER et al., 1992).

Outra subpopulação de células T CD4⁺ recentemente descoberta são as células Th17, dotadas de funções efetoras distintas das células Th1, Th2 e Treg. A linhagem Th17 foi nomeada

a partir da sua capacidade de produzir caracteristicamente IL-17A, embora produzam também IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26, GM-CSF e, potencialmente, TNF e IL-6 (KORN et al., 2009; ROMAGNANI et al., 2009). Em murinos as células Th17 surgem a partir de um precursor em comum com células Treg Foxp3+ em resposta à estimulação por TGF- β em combinação com IL-6 e, possivelmente, IL-1 β . A IL-21 produzida pelas próprias células Th17 age como um fator de amplificação, enquanto a IL-23 tem sido reportada como responsável pela manutenção e amplificação de células Th17 já diferenciadas (ROMAGNANI et al., 2009; VAN DE VEERDONK et al., 2009A), funcionando, talvez, como fator de sobrevivência desta linhagem (McGEACHY & CUA, 2008). Duas subunidades formam o heterodímero da IL-23, uma delas exclusivamente presente neste citocina (p19) e a outra compartilhada com a IL-12 (p40) (KORN et al., 2009).

A função primária das células Th17 parece ser a eliminação de patógenos com os quais as células Th1 e Th2 não conseguem lidar adequadamente. São potentes indutoras de inflamação tecidual e têm sido implicadas na patogênese de muitas doenças auto-imunes e condições inflamatórias (KORN et al., 2009). Patógenos tão distintos como bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, *Mycobacterium tuberculosis* e fungos como *Pneumocystis carinii* e *Candida albicans* podem todos desencadear uma forte resposta Th17, a tornando importante para a defesa do hospedeiro contra muitos microorganismos, mas preferencialmente contra infecções fúngicas (BEADLING & SLIFKA, 2006). Neste tipo de infecção, as células Th17 provocam, em murinos, uma resposta inflamatória caracterizada não apenas pela presença de células mononucleares, mas também de neutrófilos (ROMAGNANI et al., 2009). Foi recentemente demonstrado que a manana de *C. albicans*, através da ativação do receptor de manose de macrófagos (MMR) e dependente de células apresentadoras de antígeno, foi capaz de induzir a produção de IL-17 na

ausência de estímulos de mitógenos (VAN DE VEERDONK et al., 2009B). Deste modo, sabendo que a parede celular de *S. schenckii* é largamente composta de mananas como as ramnomanas e galactomananas, decidimos investigar a possibilidade da IL-17 estar envolvida também em nosso modelo.

Diante do exposto, trabalhos que busquem avaliar o papel dos antígenos extraídos da parede celular e presentes na própria levedura (inativada) sobre a resposta imune contra *S. schenckii* poderão elucidar melhor os mecanismos através dos quais o fungo escapa do sistema imune e estabelece a infecção, nortando pesquisas futuras mais específicas e auxiliando na terapêutica da doença.

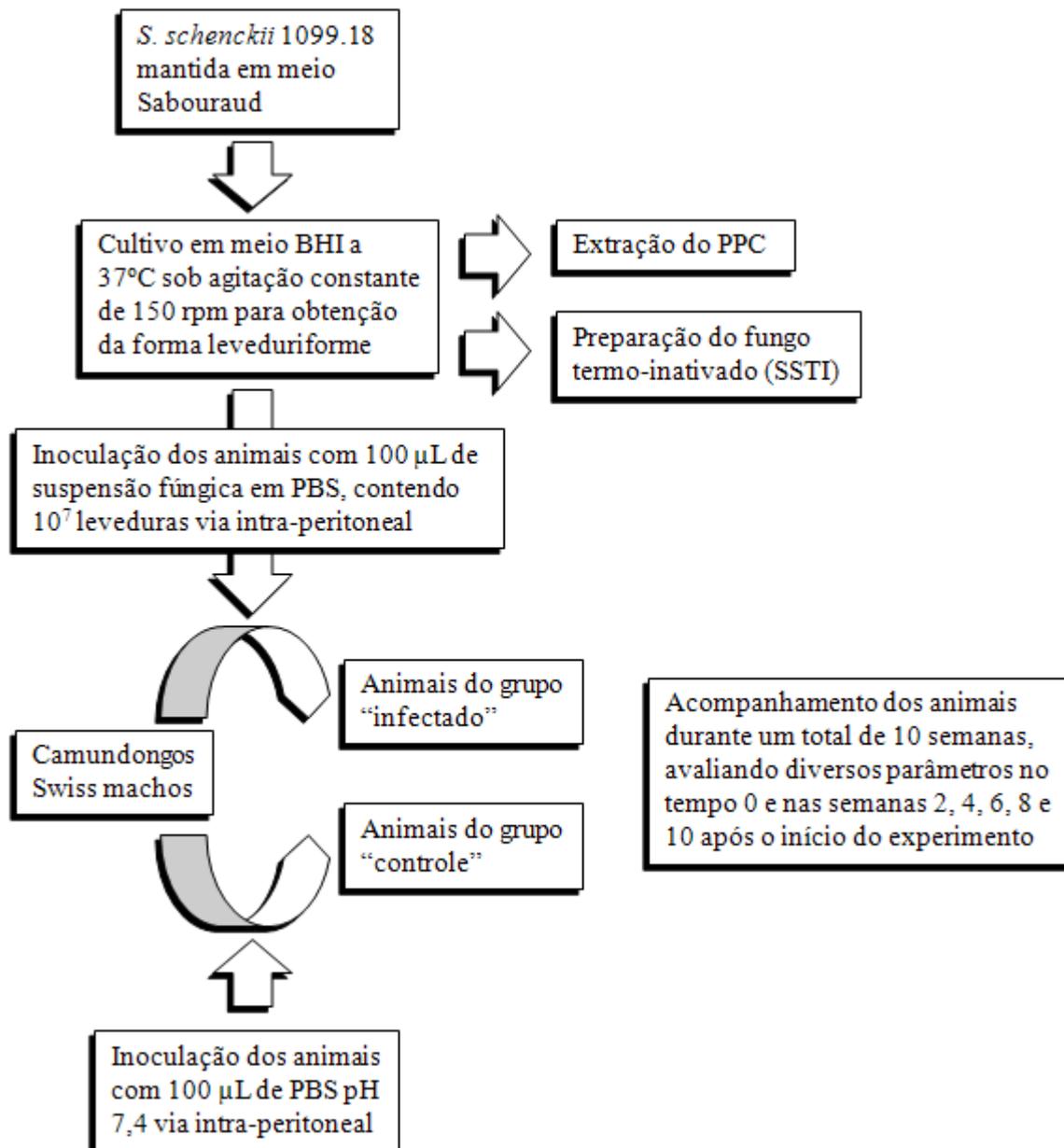
3. *Objetivos*

O presente projeto tem por objetivo avaliar a resposta imune em modelo experimental previamente estabelecido em nosso laboratório com o fungo *S. schenckii* (CARLOS et al., 1992; 1994; 1999) utilizando outras preparações antigênicas (peptídeo-polissacarídeo da parede celular – PPC e o fungo *S. schenckii* termo-inativado - SSTI) a fim de estabelecer o papel destes diferentes antígenos na indução e modulação da resposta imune. Individualmente, os objetivos são os que seguem:

- ❖ Verificar o papel destes antígenos na produção de NO, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10 pelos macrófagos ou esplenócitos;
- ❖ Verificar a participação dos antígenos propostos no desencadeamento de resposta imune Th17 durante o curso da infecção, através da avaliação da produção das citocinas IL-17 e IL-23;
- ❖ Verificar possíveis diferenças entre o PPC e o SSTI no que concerne sua capacidade de induzir a liberação dos diferentes mediadores supracitados.

4. *Materiais e metodos*

4.1. *Delineamento experimental*



4.2. Microorganismo e condições de cultivo

Foi utilizada a amostra de *S. schenckii* cepa 1099.18, isolada de um caso humano de esporotricose (da seção de Micologia do Departamento de Dermatologia da Columbia University, New York, NY, USA), cedida pela Dra. Celuta Sales Alviano do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil e atualmente disponível do acervo do laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara. A forma leveduriforme foi cultivada em meio BHI (Difco) líquido a 37°C sob agitação constante de 150 rpm.

4.3. Morte da cultura e separação das células leveduriformes

O fungo, cultivado como descrito acima, foi submetido à radiação ultravioleta (UV) por uma hora. Essa suspensão celular foi mantida por 24 h a 37°C e em seguida novamente submetida à radiação UV por mais uma hora. Em seguida foi acrescentado timerosal (1/5000), sendo a suspensão celular mantida sob agitação de 150 rpm por 48 h a 37°C . Após esse período foi realizado teste de esterilidade em ágar Sabouraud. A suspensão celular foi centrifugada (700 xg por 5 min) para separação da massa de células leveduriformes.

4.4. Obtenção do antígeno da parede celular (PPC)

Foi utilizado o método de Loureiro y Penha e Lopez-Bezerra, 2000, com modificações. A massa de células mortas isoladas por centrifugação, como descrito anteriormente, foi lavada (700 xg por 5 min) 3 vezes com PBS pH 7,4 estéril antes da extração da parede celular. Após as lavagens, a massa de células foi ressuspensa em PBS pH 7,4 estéril, autoclavada por 90 min a 120°C e, em seguida, mantida sob agitação de 150 rpm a 37°C “overnight”. Após, a suspensão

celular foi submetida a centrifugação (700 xg por 5 min) para separação do sobrenadante contendo o peptídeo-polissacarídeo da parede celular (PPC). O sobrenadante foi então dialisado contra PBS pH 7,4 por 72 h com 3 trocas da solução de diálise por dia e, após, concentrado em polietilenoglicol. O concentrado obtido foi precipitado com excesso de etanol absoluto e separado do sobrenadante por centrifugação a 2650 xg por 10 min a 4°C. Este procedimento foi repetido mais 2 vezes e o precipitado solubilizado em PBS pH 7,4 estéril, dialisado novamente como descrito e então concentrado em polietilenoglicol, aliquoteado e estocado a -20°C. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Lowry et al (LOWRY et al, 1951), fornecendo o valor final de 16,6537 mg/mL.

4.5. Preparação do fungo *S. schenckii* termo-inativado (SSTI)

Foi utilizado o método de Baronetti et al, 2009. *S. schenckii* termo-inativado foi preparado pela incubação da cultura em BHI por 1 h a 60°C, seguida de 3 lavagens em PBS pH 7,4 estéril. O Fungo foi ressuscitado e ajustado à concentração de $2,5 \times 10^7$ leveduras/mL em RPMI-1640C e estocado “overnight” para utilização no dia do experimento seguinte. Uma alíquota foi separada e inoculada em Agar Sabouraud como controle de viabilidade da amostra.

4.6. Animais e grupos experimentais

Foram utilizados camundongos Swiss (SPF), machos, obtidos do Biotério Central da UNICAMP. Estes animais foram mantidos em gaiolas, em condições ambientais estáveis (23°C e 56% de umidade relativa do ar) e ciclos claro/escuro de 12 h. Água e ração (PURINA) foram oferecidas *ad libitum*. Os grupos de estudo consistiram de animais infectados e não infectados com *S. schenckii* durante todo o período dos experimentos.

4.7. Infecção dos animais

Todo o grupo de animais foi infectado de uma única vez com suspensão do fungo *S. schenckii* em PBS pH 7,4 estéril, contendo 10^7 células leveduriformes, do seguinte modo: uma alíquota do caldo BHI da cultura do fungo foi centrifugada a 700 xg por 5 min (Centrífuga Fanem, Ind. Bras.) e o sedimento obtido foi ressuscitado em 1 ml de PBS para contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Germany); a suspensão foi ajustada para a concentração de 10^8 células/mL e cada animal foi inoculado intraperitonealmente (i.p.) com 100 μ L desta suspensão.

4.8. Obtenção e cultura dos macrófagos peritoneais

Os animais infectados e controle foram inoculados com 3 mL de tioglicolato de sódio a 3% (Difco Lab. LTDA) três dias antes de serem eutanasiados em câmara de CO₂. A pele da região abdominal foi retirada assepticamente em câmara de fluxo laminar classe 100 (Veco) e o peritônio exposto. Foram então inoculados 5 mL de PBS pH 7,4 estéril gelado na cavidade abdominal, aplicando-se leve massagem para estimular a liberação das células. O líquido resultante foi colhido com auxílio de agulha e seringa, transferido para tubo cônico estéril de 15 mL (Corning, Inc.) e centrifugado a 700 xg por 5 min (Centrífuga Fanem, Ind. Bras.). O sedimento celular foi lavado 3 vezes com 3 mL de PBS, sendo ressuscitado após a última lavagem em 1 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma) contendo 2 β -mercaptoetanol a 2×10^{-5} M, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 U/ml, L-glutamina 2 mM e 5% de soro fetal bovino (Cutilab), sendo o meio assim composto designado de RPMI-1640 completo (RPMI-1640C) para a contagem de células em câmara de Neubauer (Boeco, Germany). A concentração de células foi ajustada para 5×10^6 células/mL em RPMI-1640C para a realização dos testes propostos.

As células foram então cultivadas em placas de cultura de tecidos (Corning, Inc.) em volume de 100 µL por cavidade na proporção de 1:1 com o antígeno PPC (50 µg/mL) ou o fungo *S. schenckii* termo-inativado - SSTI (50 µg/mL), LPS (10 µg/mL) como controle positivo ou apenas com o meio RPMI-1640C como controle negativo e incubadas a 37°C por 24 h em estufa com tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific). Após essa incubação os sobrenadantes obtidos das placas foram centrifugados a 4°C durante 10 min a 14000 rpm, aliqüotados e estocados em freezer a -80°C até o momento da dosagem das citocinas.

4.9. Obtenção e cultura dos esplenócitos totais e sobrenadantes

Os animais infectados e controle foram eutanasiados e tiveram o peritônio exposto conforme descrito acima. Em seguida o peritônio foi aberto para a extração do baço, que foi posteriormente fragmentado com auxílio de pinça anatômica em placa de Petri estéril (Corning, Inc.) contendo 2 mL de RPMI-1640C, gelado, para a liberação das células. O conteúdo da placa foi aspirado com agulha e seringa para obtenção de uma suspensão celular homogênea e então transferido para tubo cônico estéril (Corning, Inc.) de 15 mL. Essa suspensão celular foi lavada em PBS pH 7,4 estéril 3 vezes a 700 xg por 5 min a 4°C. Após a última lavagem as células foram ressuspendidas em 1 mL de meio RPMI-1640C e contadas em câmara de Neubauer (Boeco, Germany) pela técnica de exclusão com Azul de Trypan a 0.04%. As suspensões celulares foram então ajustadas para a concentração de 5×10^6 células/mL.

As suspensões celulares ajustadas para 5×10^6 células/mL obtidas acima foram distribuídas em placas de cultura de tecidos (Corning, Inc.) na proporção de 1:1 com o antígeno PPC (50 µg/mL) ou o fungo *S. schenckii* termo-inativado - SSTI (50 µg/mL), Concanavalina A (0,5 µg/mL) como controle positivo ou apenas com o meio RPMI-1640C como controle negativo e

incubadas a 37°C por 24 h em estufa com tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific). Após, os sobrenadantes obtidos das placas foram centrifugados a 4°C durante 10 min a 14000 rpm, aliquotados e estocados em freezer a -80°C até o momento da dosagem das citocinas.

4.10. Avaliação da viabilidade celular dos macrófagos

Adaptado de Mossman, 1983. Em placa de cultura de tecidos de 96 cavidades de fundo plano (Corning, Inc.) foram distribuídas, 100 µL por cavidade, as suspensões de células do exsudato peritoneal de animais infectados e controle, ajustadas à concentração de 5x10⁶ células/mL em meio de cultura RPMI-1640C e em presença de 100 µL de antígeno (PPC ou SSTI a 50 µg/mL), de LPS (10 µg/mL) ou somente meio de cultura RPMI-1640C, em duplicata. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C em estufa com tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific). Após esta incubação, 50 µL dos sobrenadantes foram separados para posterior dosagem de NO, sendo o restante descartado e as células aderentes tratadas com 100 µL de uma solução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio) (Across Organics) a 5 mg/mL em PBS e diluída em RPMI-1640C na proporção de 1:5, resultando numa solução com concentração final de 1 mg/mL. A placa foi então incubada por mais 3 h nas mesmas condições anteriores. Após, os sobrenadantes foram descartados e as células aderentes tratadas com 100 µL de isopropanol (Mallinckrodt Chemical) para solubilizar os cristais de formazana formados. A leitura da absorvância foi feita em espectrofotômetro UV/visível para microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems) em 540 nm com filtro de referência de 620 nm.

4.11. Avaliação da viabilidade celular dos linfócitos

Adaptado de Mossman, 1983. Em placa de cultura de tecidos de 96 cavidades de fundo plano (Corning, Inc.) foram distribuídas, 100 µL por cavidade, as suspensões de células do baço

de animais infectados e controle, ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL em meio de cultura RPMI-1640C e em presença de 100 μ L de antígeno (PPC ou SSTI a 50 μ g/mL), de ConA (0,5 μ g/mL) ou somente meio de cultura RPMI-1640C, em duplicata. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C em estufa com tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific). Após, foi acrescido 20 μ L de uma solução de MTT a 5 mg/mL em RPMI-1640C por cavidade. A placa foi então incubada por mais 3 h nas mesmas condições anteriores. Ao término desta incubação as placas foram centrifugadas a 800 xg por 10 min a 10°C em centrífuga refrigerada (Hettich, Inc.), os sobrenadantes descartados com auxílio de micropipeta, e foram então adicionados 100 μ L de isopropanol (Mallinckrodt Chemical) para solubilizar os cristais de formazana. A leitura da absorvância foi feita em espectrofotômetro UV/visível para microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems) em 540 nm com filtro de referência de 620 nm.

4.12. Determinação da produção de óxido nítrico

O NO foi quantificado espectrofotometricamente pelo acúmulo de nitrito no sobrenadante da cultura de células através da reação de diazotização com o reagente de Griess, composto de 1 g de sulfanilamida (Merck), 0,1 g de dicloro N(1-naftil)etilenodiamina (Merck), 2,5 mL de ácido ortofosfórico (Mallinckrodt Chemical) e água deionizada q.s.p 100 mL (GREEN et al. 1982). Aliquotas de 50 μ L dos sobrenadantes das culturas de células do exsudato peritoneal usadas na determinação da viabilidade foram transferidas para nova placa de cultura de 96 cavidades de fundo plano (Corning, Inc.), acrescidas de igual volume de reagente de Griess e então incubadas por 10 min em temperatura ambiente ao abrigo da luz. A leitura da absorvância foi feita em espectrofotômetro UV/visível para microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems) em 540 nm. As concentrações de NO liberado nos sobrenadantes das culturas celulares foram calculadas a partir

de curva padrão, previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio, e os valores foram expressos em μmols de nitrito/ 5×10^5 células.

4.13. Determinação da liberação de citocinas

As citocinas IFN- γ , IL-4, IL-17 e IL-23 foram quantificadas no sobrenadante das culturas de esplenócitos totais, enquanto TNF- α e IL-10 foram quantificadas no sobrenadante das culturas de células do exsudato peritoneal, pelo teste imunoenzimático ELISA. Foram utilizados kits da BD Biosciences Pharmingen e de acordo com as instruções dos fabricantes.

As placas de 96 orifícios (Corning Inc.) foram adsorvidas com anticorpo de captura, monoclonal, obtidos de rato, anti-citocina de camundongo, na concentração adequada para cada citocina em PBS pH 7,0 (100 μl por cavidade) e incubadas “overnight” à 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (PBS pH 7,0 contendo 0,05% de Tween-20) e bloqueadas com 200 μL /cavidade de PBS pH 7,0 contendo 10% de SFB (dilúente de ensaio) à temperatura ambiente por 60 min. Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem e em seguida adicionados de 100 μL por cavidade do padrão de citocinas ou dos sobrenadantes das culturas de células a serem testados. As placas foram então incubadas à temperatura ambiente por 120 min e lavadas 3 vezes com tampão de lavagem. Em seguida, foram adicionados 100 μL por cavidade de anticorpo monoclonal de cabra (anticorpo anti-citocina de camundongo) marcado com biotina e diluído à concentração adequada de cada citocina em dilúente de ensaio. As placas foram incubadas por mais 120 min à temperatura ambiente e posteriormente lavadas mais 3 vezes com tampão de lavagem, sendo então adicionadas de 100 μL por cavidade do conjugado peroxidase-estreptavidina (diluído à concentração adequada de cada citocina em dilúente de ensaio) e incubadas novamente à

temperatura ambiente por 30 min. Após este período, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem e em seguida adicionadas de 100 μ L do substrato [10 mM de tampão citrato-fosfato, contendo 0,4 mM de tetrametilbenzidina (Sigma) e 1,2 mM de H_2O_2 (Mallinckrodt Chemical)] a cada cavidade. A reação foi interrompida com 50 μ L de H_2SO_4 2N a cada cavidade e a absorvância foi lida em 450 nm com filtro de referência em 570nm em espectrofotômetro UV/visível para microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems). As concentrações de cada citocina foram quantificadas através de curva padrão previamente estabelecida com quantidades conhecidas de cada citocina. Os resultados foram expressos em pg/mL.

4.14. Análise dos resultados

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

5. Resultados

5.1. Avaliação da viabilidade celular dos macrófagos

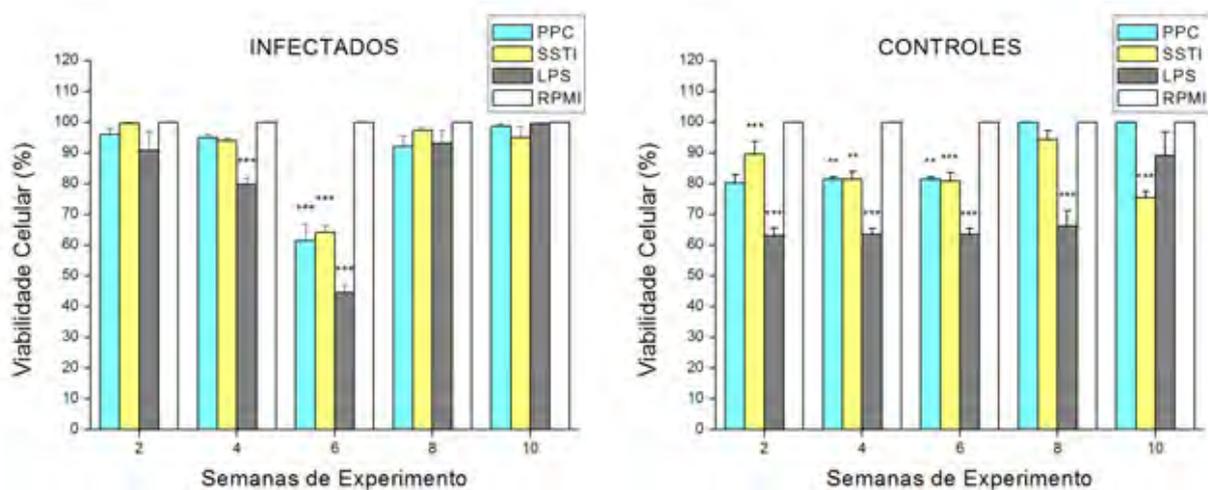


Figura 1. Viabilidade das células do exsudato peritoneal (PEC) dos camundongos Swiss infectados e controles: macrófagos do exsudato peritoneal de animais infectados e controle foram cultivados em presença de PPC (peptídeo-polissacarídeo da parede celular), SSTI (*S. schenckii* morto pelo calor), LPS (lipopolissacarídeo bacteriano) ou meio RPMI-1640C (RPMI-1640 completo) como controle negativo. Resultados expressos em percentual (%) como média \pm desvio padrão de 4 animais em duplicata. *** ($p < 0,001$) e ** ($P < 0,01$) estão detalhadas no texto. Valores acima de 100% foram considerados como sendo 100% para motivo da construção dos gráficos.

Quando cultivadas em presença de PPC, as células do exsudato peritoneal (PEC) dos animais não-infectados (controle) apresentaram queda de viabilidade, em comparação ao controle negativo, durante a 2^a ($p < 0,001$), 4^a ($p < 0,01$) e 6^a ($p < 0,01$) semanas após o início do experimento. Em presença de SSTI a viabilidade celular sofreu queda na 4^a ($p < 0,01$), 6^a ($p < 0,001$) e 10^a ($p < 0,001$) semanas. Com LPS a viabilidade foi reduzida na 2^a ($p < 0,001$), 4^a ($p < 0,001$), 6^a ($p < 0,001$) e 8^a ($p < 0,001$) semanas, sempre em relação ao controle negativo (RPMI-1640C).

Nos animais infectados houve queda na viabilidade durante a 4^a semana pós-infecção, quando as células foram cultivadas em presença de LPS ($p < 0,001$), e durante a 6^a semana quando

cultivadas com PPC ($p < 0,001$), SSTI ($p < 0,001$) ou LPS ($p < 0,001$). Acreditamos que este fenômeno se deva à estimulação excessiva das PEC ainda *in vivo*, uma vez que o referido período é reconhecidamente grave na evolução da doença no modelo animal utilizado (CARLOS et al., 1992).

5.2. Avaliação da viabilidade celular dos esplenócitos totais

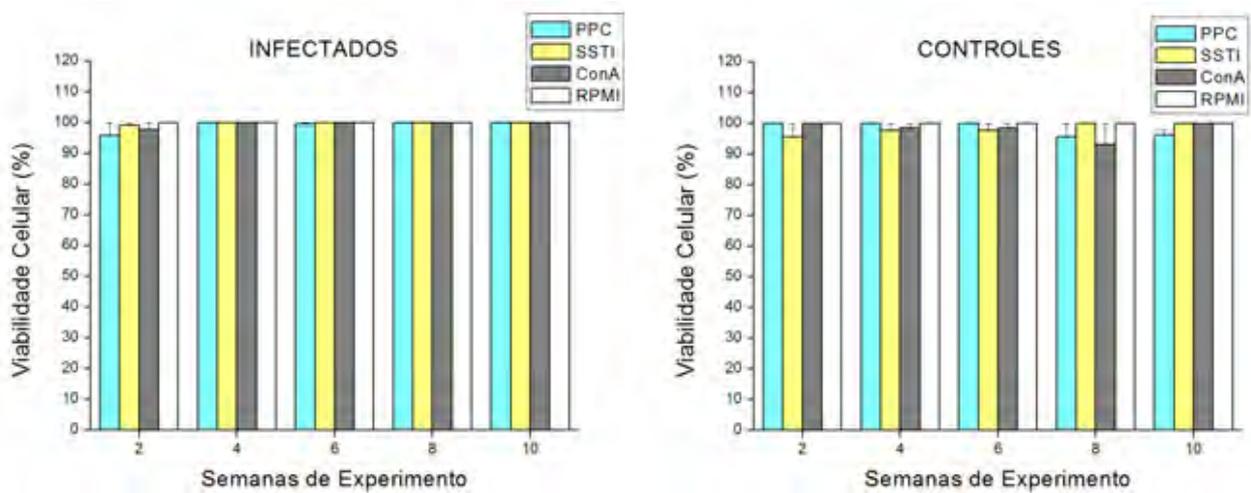


Figura 2. Viabilidade dos esplenócitos totais dos camundongos Swiss infectados e controles: esplenócitos obtidos pela maceração do baço de animais infectados e controle foram cultivados em presença de PPC (peptídeo-polissacarídeo da parede celular), SSTI (*S. schenckii* morto pelo calor), ConA (concanavalina A) ou meio RPMI-1640C (RPMI-1640 completo) como controle negativo. Resultados expressos em percentual (%) como média \pm desvio padrão de 4 animais em duplicata. Valores acima de 100% foram considerados como sendo 100% para motivo da construção dos gráficos.

Tanto nos animais do grupo controle quanto naqueles do grupo infectado não foi observada qualquer redução significativa da viabilidade celular quando os esplenócitos foram cultivados em presença de PPC, SSTI, ConA ou RPMI-1640C como controle negativo. Isto indica que, nas concentrações utilizadas, nenhum dos compostos apresentou toxicidade para as células testadas.

5.3. Avaliação da produção de óxido nítrico

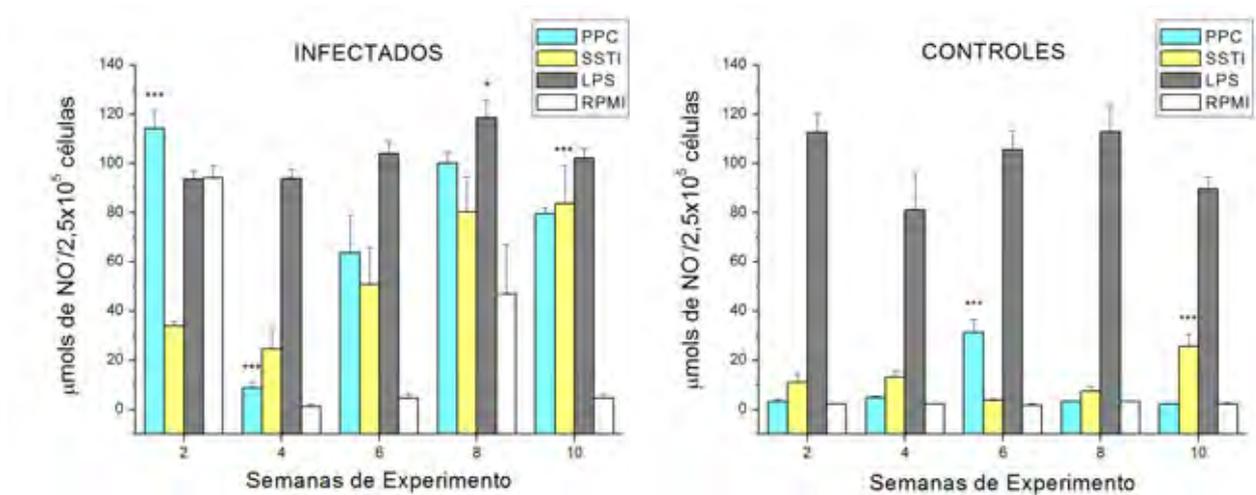


Figura 3. Produção de NO pelos macrófagos peritoneais dos camundongos Swiss infectados e controles: macrófagos do exsudato peritoneal de animais infectados e controle foram cultivados em presença de PPC (peptídeo-polissacarídeo da parede celular), SSTI (*S. schenckii* morto pelo calor), LPS (lipopolissacarídeo bacteriano) ou meio RPMI-1640C (RPMI-1640 completo) como controle negativo. Concentrações de nitrito obtidas através de reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio (NaNO_2). Os resultados são expressos em μmols de nitrito/ 5×10^5 células, como média \pm desvio padrão de 4 animais em duplicata. *** ($p < 0,001$) e * ($P < 0,05$) estão detalhadas no texto.

A avaliação da liberação de óxido nítrico nos animais controle mostrou que, na maior parte do período experimental, não houve elevação significativa na liberação de NO quando as células foram cultivadas com PPC ou SSTI, exceto por dois resultados não esperados na 6^a e 10^a semanas após o início do experimento.

Nos animais infectados, o cultivo das PEC com PPC na 2ª semana pós-infecção resultou em produção de NO significativamente maior que aquela obtida com SSTI no mesmo período ($p < 0,001$), seguida de queda na 4ª semana ($p < 0,001$ em relação à semana anterior) e nova elevação na 6ª ($p < 0,001$ em relação à semana anterior) até atingir um pico de concentração na 8ª semana que permaneceu até o final do período experimental. Cultivadas com SSTI, as PEC apresentaram elevação significativa da produção de NO a partir da 4ª até a atingir um pico na 10ª semana. Quando cultivadas em presença de LPS, o pico de liberação de NO ocorreu também na 8ª semana ($p < 0,05$ quando comparada com a liberação em presença de LPS nas demais semanas do experimento).

5.4. Avaliação da liberação de TNF- α

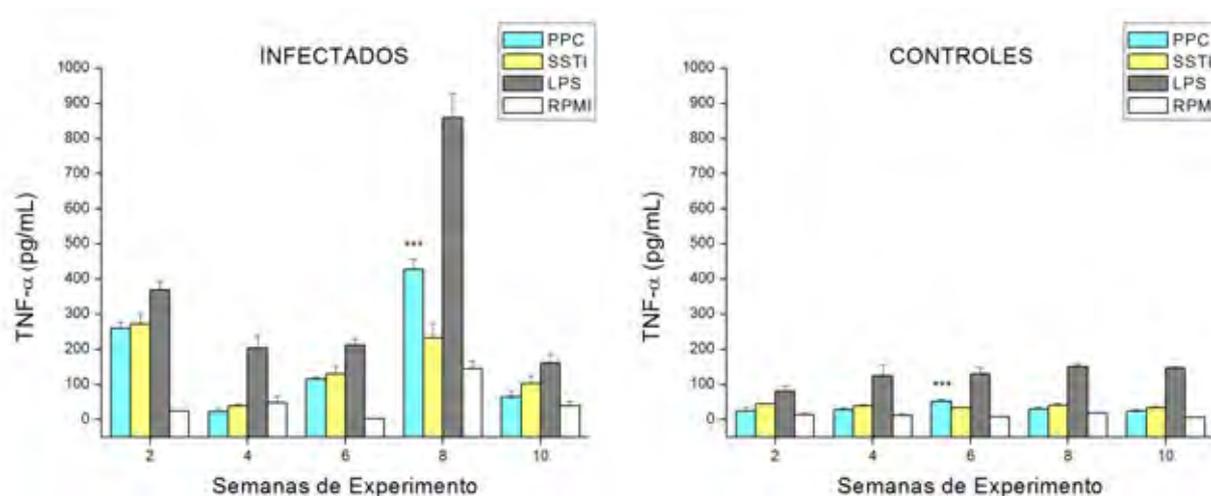


Figura 4. Determinação da liberação ex-vivo de TNF- α no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss infectados e controles: Culturas de macrófagos de animais infectados e controle foram cultivadas em presença de PPC (peptídeo-polissacarídeo da parede celular), SSTI (*S. schenckii* morto pelo calor), LPS (lipopolissacarídeo bacteriano) ou meio RPMI-1640C (RPMI-1640 completo) como controle negativo. Concentrações de TNF- α obtidas através de teste imunoenzimático (ELISA) a partir de reta padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas de TNF- α . Resultados expressos em pg/mL como a média \pm desvio padrão de 4 animais em duplicata. *** ($p < 0,001$) estão detalhadas no texto.

Avaliadas para a liberação de TNF- α , as PEC dos animais controle não foram capazes de induzir a produção de quantidades significativas desta citocina quando cultivadas com PPC ou SSTI em praticamente nenhum dos períodos testados, com exceção da 6ª semana quando as células foram cultivadas com PPC ($p < 0,001$ em comparação com o controle negativo).

Quando cultivados com as PEC dos animais infectados, os antígenos apresentaram todos um perfil semelhante, com pico de liberação de TNF- α na 8ª semana pós-infecção. Cultivadas em presença de PPC ou SSTI, as PEC apresentaram liberação significativa desta citocina na 2ª, 6ª e 8ª semanas (maior liberação, significativa em relação aos outros períodos experimentais para cada composto), e valores basais (não significativos em relação ao controle negativo do respectivo período) na 4ª e 10ª semanas. Cabe ressaltar que na 8ª semana a liberação de TNF- α em resposta ao PPC foi significativamente maior que em resposta ao

SSTI ($p < 0,001$). Em presença de LPS o perfil de liberação de TNF- α se manteve semelhante àquele obtido com PPC ou SSTI, diferindo apenas no fato de que houve elevação significativa em todos os períodos experimentais, quando comparados com o controle negativo ($p < 0,001$).

5.5. Avaliação da liberação de IL-10

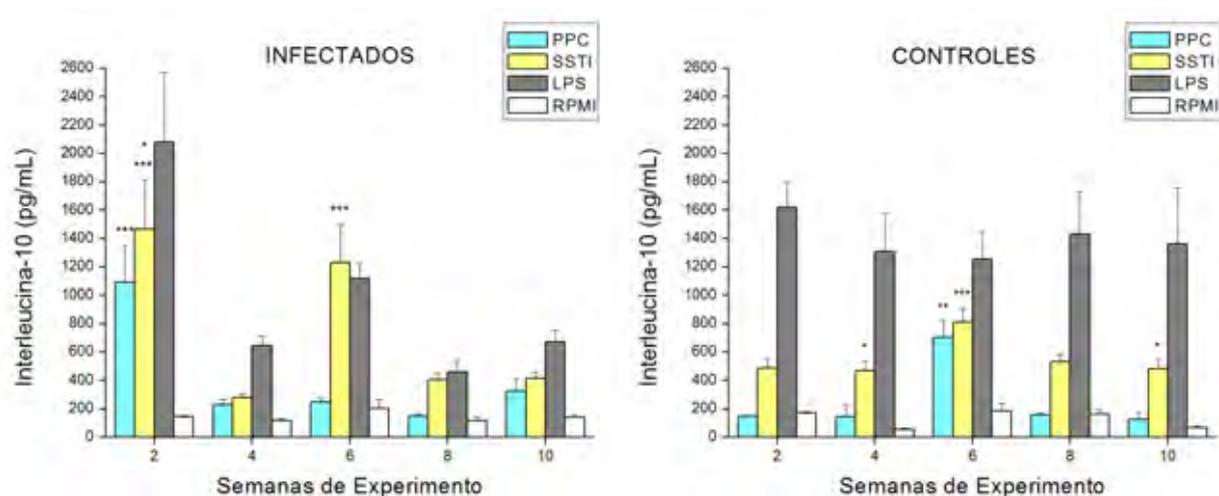


Figura 5. Determinação da liberação *ex-vivo* de IL-10 no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss infectados e controles: Culturas de macrófagos de animais infectados e controle foram cultivadas em presença de PPC (peptídeo-polissacarídeo da parede celular), SSTI (*S. schenckii* morto pelo calor), LPS (lipopolissacarídeo bacteriano) ou meio RPMI-1640C (RPMI-1640 completo) como controle negativo. Concentrações de IL-10 obtidas através de teste imunoenzimático (ELISA) a partir de reta padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas de IL-10. Resultados expressos em pg/mL como a média \pm desvio padrão de 4 animais em duplicata. *** ($p < 0,001$), ** ($p < 0,01$) e * ($p < 0,05$) estão detalhadas no texto.

Quando expostas ao PPC, as PEC dos animais controle tiveram aumentada a liberação de IL-10 na 6^a semana ($p < 0,01$) quando comparada com o controle negativo. Aumento ainda maior na liberação de IL-10 ocorreu quando as células foram cultivadas com SSTI, na 4^a ($p < 0,05$), 6^a ($p < 0,001$) e 10^a ($p < 0,05$) semanas após o início do experimento.

Nos animais infectados o cultivo das PEC com PPC induziu o aumento da liberação de IL-10 na 2^a semana pós-infecção em comparação com o controle negativo ($p < 0,001$), caindo e mantendo níveis não significativos nas semanas seguintes. Diante do cultivo com SSTI, a liberação de IL-10 pelas PEC aumentou significativamente na 2^a e 6^a semanas, em comparação com o controle negativo ($p < 0,001$ em ambos) ou PPC ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente) nos períodos correspondentes. Níveis não significativos foram mantidos nas demais semanas.

5.6. Avaliação da liberação de IFN- γ

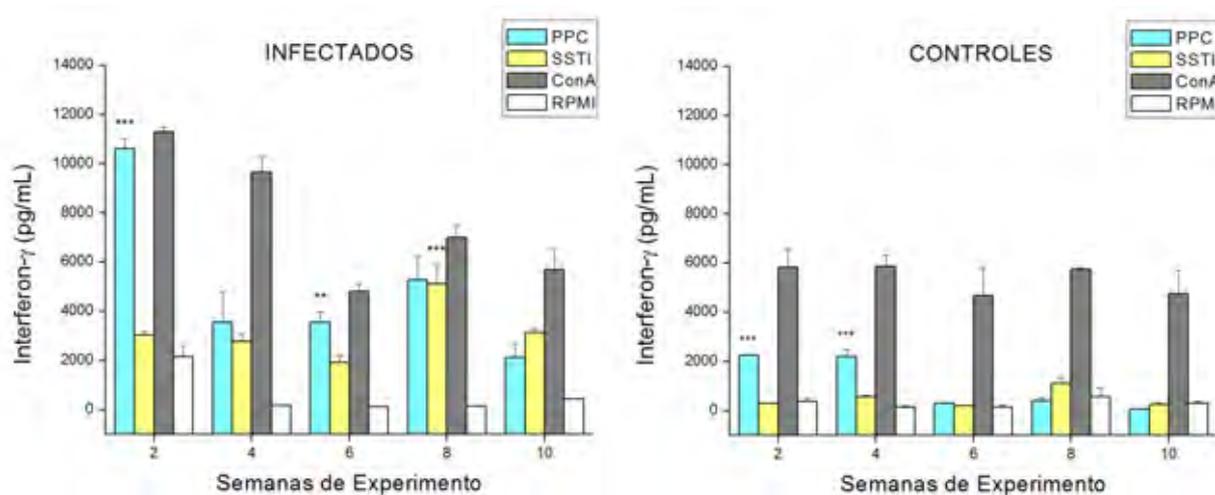


Figura 6. Determinação da liberação *ex-vivo* de IFN- γ no sobrenadante de cultura de esplenócitos totais de camundongos Swiss infectados e controles: Culturas de esplenócitos totais de animais infectados e controle foram cultivadas em presença de PPC (peptídeo-polissacarídeo da parede celular), SSTI (*S. schenckii* morto pelo calor), ConA (concanavalina A) ou meio RPMI-1640C (RPMI-1640 completo) como controle negativo. Concentrações de IFN- γ obtidas através de teste imunoenzimático (ELISA) a partir de reta padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas de IFN- γ . Resultados expressos em pg/mL como a média \pm desvio padrão de 4 animais em duplicata. *** ($p < 0,001$) e ** ($P < 0,01$) estão detalhadas no texto.

Quando cultivado junto aos esplenócitos dos animais controle, nem o PPC nem o SSTI foram capazes de induzir a liberação de IFN- γ , exceto por dois resultados não esperados, na 2^a e 4^a semanas, nas quais a liberação desta citocina em resposta ao PPC se mostrou aumentada em comparação com o controle negativo e SSTI ($p < 0,001$ em ambos os casos).

Nos animais infectados o PPC induziu liberação aumentada de IFN- γ em todos os períodos avaliados, apresentando pico na 2^a semana pós-infecção, seguido de queda na 4^a e 6^a semanas ($p < 0,001$ em comparação com a 2^a em ambos os períodos), novo aumento na 8^a semana ($p < 0,001$ em comparação com a 2^a em ambos os períodos), novo aumento na 8^a semana ($p < 0,01$ em comparação com a 6^a) e, por fim, queda na 10^a semana ($p < 0,001$ em comparação com a 8^a). Ainda, na 2^a e 6^a semanas, os níveis de IFN- γ induzidos pelo PPC foram significativamente maiores que aqueles induzidos pelo SSTI ($p < 0,001$ e $p < 0,01$ respectivamente). Este, por sua vez, induziu liberação aumentada de IFN- γ apenas na 4^a e 6^a

semanas, com pico na 8ª semana pós-infecção ($p < 0,001$ em comparação com quaisquer das outras semanas).

5.7. Avaliação da liberação de IL-4

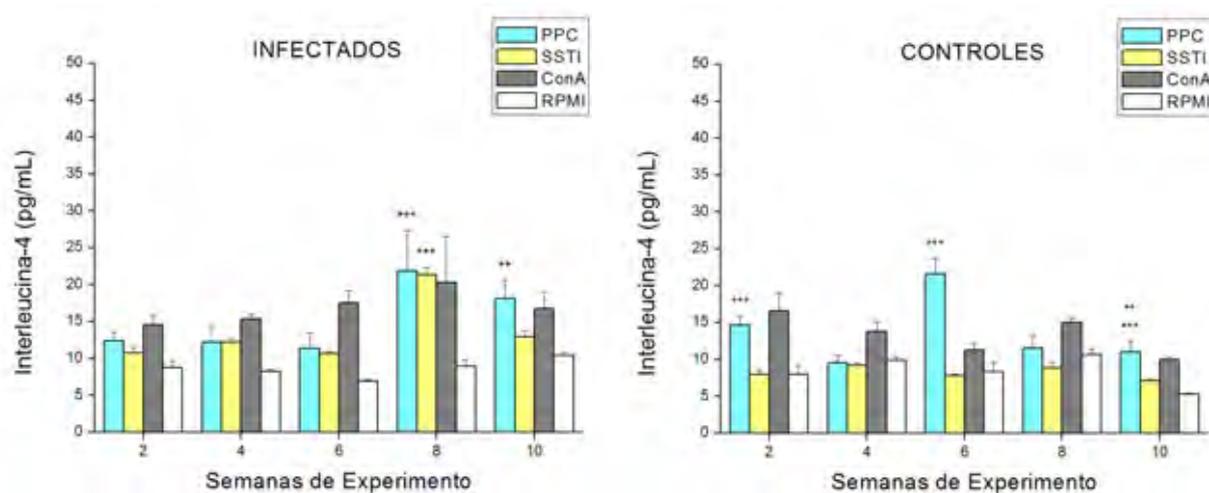


Figura 7. Determinação da liberação *ex-vivo* de IL-4 no sobrenadante de cultura de esplenócitos totais de camundongos Swiss infectados e controles: Culturas de esplenócitos totais de animais infectados e controle foram cultivadas em presença de PPC (peptídeo-polissacarídeo da parede celular), SSTI (*S. schenckii* morto pelo calor), ConA (concanavalina A) ou meio RPMI-1640C (RPMI-1640 completo) como controle negativo. Concentrações de IL-4 obtidas através de teste imunoenzimático (ELISA) a partir de reta padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas de IL-4. Resultados expressos em pg/mL como a média \pm desvio padrão de 4 animais em duplicata. *** ($p < 0,001$) e ** ($P < 0,01$) estão detalhadas no texto.

O PPC induziu liberação aumentada de IL-4 pelos esplenócitos dos animais controle na 2^a, 6^a e 10^a semanas pós-infecção, sempre com $p < 0,001$ quando comparado com o controle negativo nas respectivas semanas. Mesmo comparada com o LPS, a liberação de IL-4 induzida pelo PPC apresentou aumento significativo, porém apenas na 6^a semana ($p < 0,01$).

De modo interessante, a liberação de IL-4 nos animais infectados em resposta ao PPC se manteve em níveis basais até a 6^a semana, sofrendo aumento significativo na 8^a ($p < 0,001$) e 10^a ($p < 0,01$) semanas, quando comparadas com o controle negativo. Já na presença de SSTI, a liberação de IL-4 foi aumentada apenas na 8^a semana em comparação com o controle negativo ($p < 0,001$), regredindo novamente para níveis basais na 10^a semana. Os níveis consistentemente baixos de IL-4 até a 6^a semana nos animais infectados, em contraste com os níveis elevados neste mesmo período no grupo controle, poderiam sugerir que a resposta

imune contra o *S. schenckii* regula negativamente a produção/liberação desta citocina, muito embora a análise estatística tenha mostrado que apenas na 6ª semana a liberação de IL-4 nos animais controle é significativa quando comparada com a semana correspondente nos animais infectados.

5.8. Avaliação da liberação de IL-17

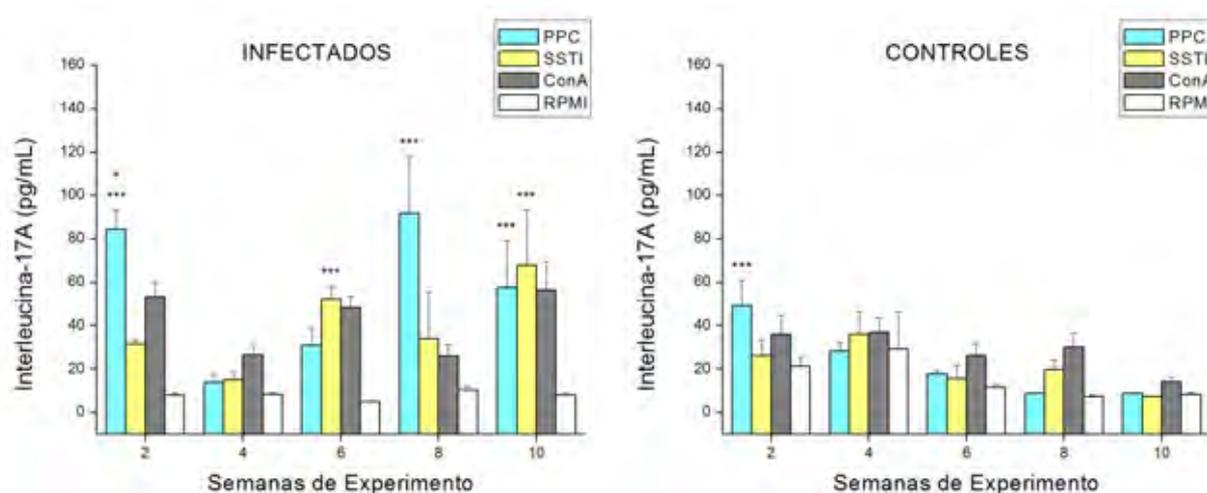


Figura 8. Determinação da liberação *ex-vivo* de IL-17 no sobrenadante de cultura de esplenócitos totais de camundongos Swiss infectados e controles: Culturas de esplenócitos totais de animais infectados e controle foram cultivadas em presença de PPC (peptídeo-polissacarídeo da parede celular), SSTI (*S. schenckii* morto pelo calor), ConA (concanavalina A) ou meio RPMI-1640C (RPMI-1640 completo) como controle negativo. Concentrações de IL-17 obtidas através de teste imunoenzimático (ELISA) a partir de reta padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas de IL-17. Resultados expressos em pg/mL como a média \pm desvio padrão de 4 animais em duplicata. *** ($p < 0,001$) e * ($P < 0,05$) estão detalhadas no texto.

Neste estudo foi dosada a IL-17A, ao invés da IL-17F que é largamente co-expressa pelas células Th17, em virtude da IL-17A ser a mais comumente associada à linhagem Th17 e, não raro, referida apenas como IL-17 (KORN et al., 2009). Nos animais do grupo controle a liberação de IL-17 foi significativa apenas na 2ª semana quando os esplenócitos foram cultivados na presença do PPC, em comparação com o controle negativo ($p < 0,001$).

No grupo infectado o cultivo dos esplenócitos totais com PPC resultou em liberação aumentada de IL-17 já na 2ª semana em comparação com o controle negativo ($p < 0,001$), caindo bruscamente na 4ª e permanecendo baixa na 6ª semana ($p < 0,001$ em ambos os períodos quando comparadas com a semana anterior); na 8ª semana ocorreu a maior elevação de IL-17 em resposta ao PPC ($p < 0,001$ em comparação com a 6ª semana), seguida de queda significativa na 10ª semana, mas mantendo valores maiores que aqueles do controle negativo

($p < 0,001$). Ainda, a liberação de IL-17 em resposta ao PPC na 2ª e 8ª semanas foi maior que aquela obtida com SSTI ($p < 0,001$ em ambos os períodos) ou ConA ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). Os resultados indicam que o PPC possui maior capacidade de estimulação da liberação de IL-17 no modelo avaliado, maior até mesmo que a da ConA, e manifestada de forma mais proeminente na 8ª semana pós-infecção.

O perfil obtido com o SSTI se mostrou bastante diferente daquele exposto acima para o PPC, uma vez que apenas na 6ª e 10ª semanas este antígeno induziu maior liberação de IL-17 que o controle negativo ($p < 0,001$ em ambos períodos). Aparentemente, o PPC isolado possui maior capacidade de indução da liberação de IL-17 que o fungo íntegro inativado.

5.9. Avaliação da liberação de IL-23p19

A avaliação da liberação de IL-23 pelos esplenócitos mostrou que nenhum dos antígenos testados foi capaz de induzir a mesma a níveis detectáveis pelo ensaio utilizado, em nenhum dos grupos experimentais ou períodos avaliados. Em razão da IL-23 ser um heterodímero no qual uma de suas subunidades é compartilhada com a IL-12 (p40), utilizamos um kit específico para sua subunidade p19, exclusivamente presente na IL-23.

5.10. Sumário dos resultados obtidos com as citocinas

Abaixo é fornecido um comparativo entre as citocinas estudadas com base no antígeno utilizado para induzir sua liberação em cultura, ao longo das 10 semanas do experimento. Para a construção do gráfico foram usadas unidades arbitrárias a fim de reproduzir visualmente a cinética das diversas citocinas numa única escala no eixo Y. A citocina IL-23 não foi incluída aqui por não ter sido induzida em níveis detectáveis pelo ensaio utilizado.

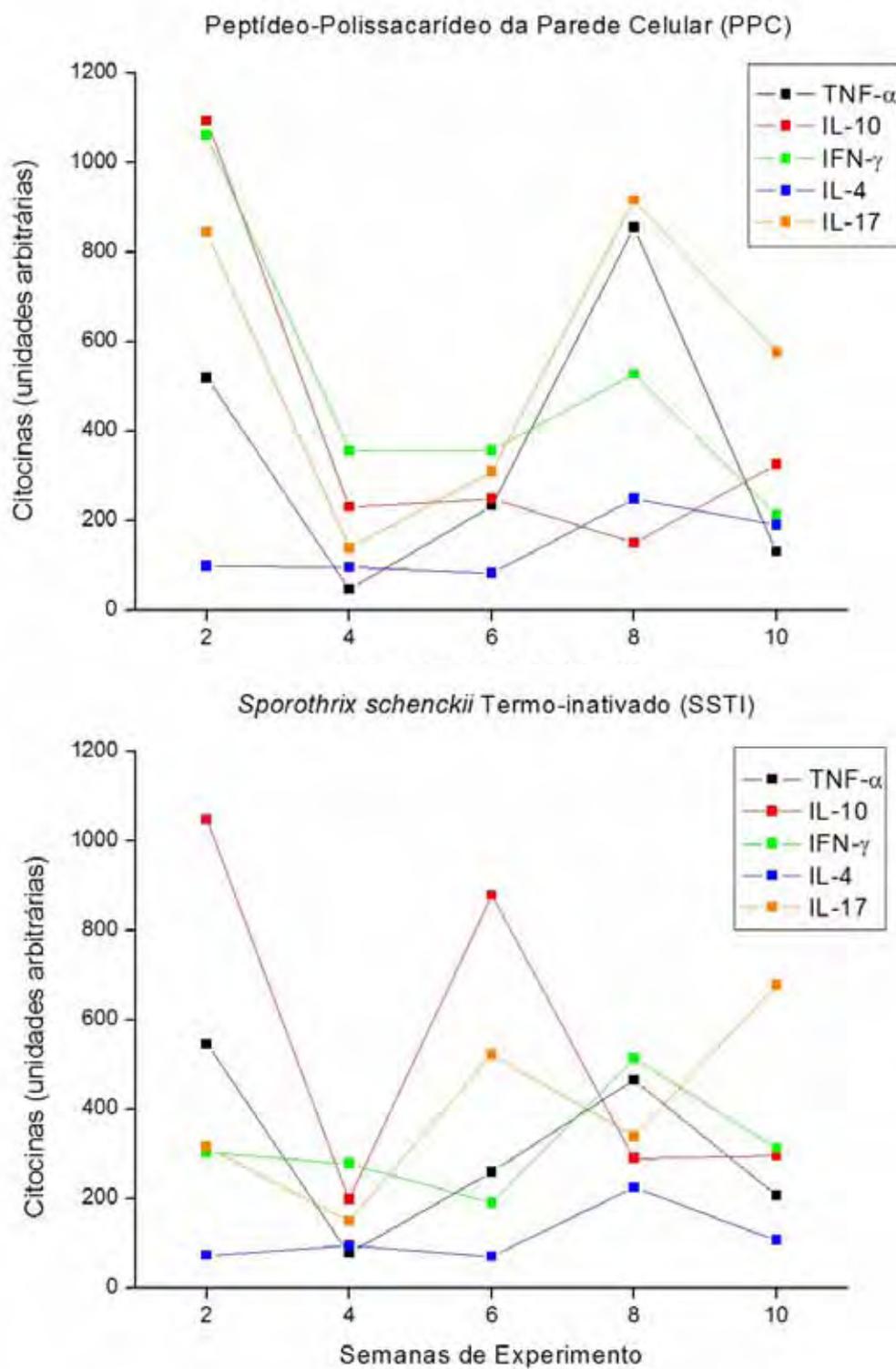


Figura 9. Comparação entre as citocinas liberadas em resposta ao PPC ou SSTI nos animais infectados ao longo do experimento.

6. Discussão

Estudos prévios realizados em nosso laboratório estabeleceram o modo como o modelo animal utilizado se comporta diante da infecção pelo *S. schenckii*, assim como algumas citocinas se comportam em resposta à estimulação *ex vivo* das PEC e esplenócitos com o exoantígeno de *S. schenckii*. Reconhecidamente, existe um período de suscetibilidade aumentada à infecção, com redução da transformação linfocitária e hipersensibilidade do tipo tardia, mais grave no período entre a 4ª e 6ª semanas (CARLOS et al., 1992). Neste mesmo período se dá um aumento da multiplicação fúngica no baço e fígado dos animais, bem como elevação na liberação de NO, IFN- γ e IL-12 em resposta ao exoantígeno (MAIA et al., 2006). Neste mesmo trabalho foi também demonstrado o aumento na liberação de IL-4 a partir da 5ª até a 10ª semana de infecção. TNF- α também pode ser induzido por este antígeno, estando levemente aumentado no início e grandemente aumentado a partir da 7ª até a 10ª semana de infecção (dados não publicados).

Neste estudo decidimos avaliar como as PEC e esplenócitos se comportam diante da estimulação com o PPC e o próprio fungo íntegro termo-inativado, uma vez que representam de forma mais acurada a capacidade destas células de responderem ao fungo *in vivo*. Isto difere da resposta ao exoantígeno, que é liberado no meio pelo fungo e pode contribuir para a evasão da resposta imune (ODA et al., 1983), se tornando alvo dos mecanismos efetores como a fagocitose e, conseqüentemente, desviando tais mecanismos da levedura em si. Interessantemente, encontramos diferenças significativas quando comparamos a resposta ao PPC e ao SSTI, mesmo que a superfície do fungo seja essencialmente formada pelos constituintes do PPC.

Encontramos também grandes elevações na produção de NO na 2ª semana, coincidindo com liberação aumentada das citocinas TNF- α , IL-10, IFN- γ e IL-17 nesse período. Ainda, no caso do IFN- γ e da IL-17, assim como ocorre com o NO, a liberação induzida pelo PPC foi significativamente maior que aquela induzida pelo SSTI. Este fenômeno se repetiu na 8ª semana quando avaliamos a liberação de TNF- α e IL-17, e na 6ª semana no caso do IFN- γ . Deste modo é possível dizer que, em linhas gerais, o PPC apresenta maior capacidade de indução da liberação de citocinas inflamatórias que o fungo íntegro e inativado. No entanto, é interessante notar que o contrário aconteceu com a liberação de IL-10, maior em resposta ao SSTI que ao PPC isolado, não só na 2ª mas também na 6ª semana pós-infecção, ocasião em que o PPC não foi capaz de induzir liberação significativa.

Juntos, nossos resultados apontam para a coordenação precoce de uma resposta inflamatória na tentativa de eliminação do fungo pelo sistema imune, resultando em grande produção de NO, cuja citotoxicidade é importante para a defesa inata do hospedeiro em relação a inúmeros patógenos, incluindo fungos (GREEN et al., 2000). Por outro lado, a produção exagerada de NO pode acabar por suprimir a imunidade contra o fungo, atuando como *feedback* da resposta Th1 (VAN DER VEEN, 2001) e chegando a induzir a hiporresponsividade das células T à estimulação por mitógenos e até mesmo a apoptose de linfócitos e macrófagos (MARTINS et al., 1998; 2001; WU-HSIEH et al., 1998). De encontro a isso, os altos níveis de IL-10 logo na 2ª semana parecem surgir, então, como mecanismo regulador da resposta inflamatória que pode estar envolvida na evasão do sistema imune e estabelecimento da infecção pelo fungo (ROMANI & PUC CETTI, 2006).

Segue-se a este período inicialmente crítico, uma drástica queda, na 4ª semana, nos níveis de todos os mediadores supracitados, possivelmente um reflexo do *feedback* estabelecido para conter a inflamação exacerbada. As citocinas TNF- α , IL-10 e IL-17 caem a

níveis não significativos, tanto em resposta ao PPC quanto ao SSTI. Os níveis de NO também caem a valores basais quando estimulados pelo PPC, mas se mostram aumentados em resposta ao SSTI. Já no caso do IFN- γ , mesmo caindo bastante, sua liberação ainda permanece aumentada quando estimulada por PPC ou SSTI. Aliás, é possível que esta liberação de IFN- γ esteja sustentando a liberação aumentada de NO em resposta ao SSTI neste mesmo período. É interessante notar que o pico de multiplicação fúngica no baço e fígado dos animais infectados ocorre justamente durante a 4ª semana (CARLOS et al., 1999; MAIA et al., 2006) que, conforme pudemos mostrar, representa uma depressão na resposta inflamatória.

Avançando para a 6ª semana, os níveis de NO demonstraram aumento considerável com todos os antígenos testados, assim como ocorreu com TNF- α e IL-17. No caso da IL-10, ocorreu novo aumento em resposta ao SSTI durante a 6ª semana, contrastando com os valores obtidos pela estimulação com PPC, que continuou em níveis basais. Neste mesmo período, a liberação de IFN- γ permaneceu aumentada para todos os antígenos, com valores semelhantes àqueles encontrados na 4ª semana, cabendo destacar que a liberação induzida pelo PPC foi significativamente maior que aquela conseguida com o SSTI. Juntamente com a 4ª, a 6ª semana marca um período de suscetibilidade aumentada do animal à infecção pelo *S. schenckii*, como demonstrado pela queda na transformação linfocitária em resposta a uma fração do extrato bruto do fungo (CARLOS et al., 1992; 1999) e também ao exoantígeno do mesmo (dados não publicados).

Está bem estabelecido que a imunossupressão dependente de IL-10 induzida por patógenos fúngicos é um mecanismo de evasão imune. Os dados obtidos neste estudo quando empregado o PPC, assim como dados anteriores (MAIA et al., 2006) utilizando o exoantígeno de *S. schenckii*, sugerem que a IL-10 não assume um papel direto na supressão da resposta

proliferativa dos esplenócitos ou na suscetibilidade aumentada à multiplicação fúngica nos órgãos do hospedeiro entre a 4^a e 6^a semanas. Estes achados contrastam com o que ocorre em outras infecções experimentais por *Candida albicans* (NETEA et al., 2004), *Histoplasma capsulatum* (ALLEN & DEEP, 2005) ou contra glicuronoxilomanana (GXM) de *Cryptococcus neoformans* (CHIAPELLO et al., 2004). No entanto, quando estimulamos as PEC com SSTI notamos marcada elevação de IL-10 na 6^a semana, embora os níveis da mesma tenham sido não significantes na 4^a semana.

Durante a 8^a semana os animais estão entrando na fase de resolução da infecção, conforme indicado pelo aumento da capacidade de transformação linfocitária em resposta à ConA (CARLOS et al., 1999) e queda drástica da viabilidade do fungo nos órgãos do animal (CARLOS et al., 1992; MAIA et al., 2006). Neste mesmo período encontramos níveis de NO, TNF- α e IFN- γ aumentados em relação à 6^a semana em resposta à estimulação com PPC ou SSTI. Com respeito à IL-17, esta se mostrou bastante aumentada em relação ao período anterior quando as PEC foram estimuladas com PPC, mas em níveis reduzidos (embora não estatisticamente significantes) quando estimuladas com SSTI. Durante a 8^a e 10^a semanas a liberação de IL-10 induzida por PPC ou SSTI permaneceu em níveis basais.

Como fase final da infecção e último período avaliado, a 10^a semana marcou a queda das citocinas IFN- γ e TNF- α a níveis não significantes. Ainda assim, a liberação de NO pelas PEC se manteve aumentada, com valores semelhantes àqueles da 8^a semana quando estas células foram cultivadas com PPC ou SSTI. Embora a produção exagerada de NO tenha sido diversas vezes implicada na suscetibilidade dos animais a infecções fúngicas (NASCIMENTO et al., 2002; ANGULO et al., 2002) é sabido que, em níveis adequados, esta molécula é essencial para a resistência do animal e eliminação do patógeno (HUANG et al., 1998; FERNANDES et al., 2007; LIVONESI et al., 2009).

A liberação de IL-17 na 10^a semana em resposta ao PPC apresentou queda significativa em relação à 8^a semana, ainda que mantendo níveis acima dos basais. Níveis semelhantes de IL-17 foram encontrados quando os esplenócitos foram estimulados com SSTI. Em murinos, células Th17 (caracterizadas pela liberação de IL-17) atuam na proteção contra fungos pela indução de uma resposta inflamatória (ROMAGNANI et al., 2009) e diversos patógenos, incluindo os fungos *P. carinii* e *C. albicans*, podem desencadear forte resposta Th17 (BEADLING & SLIFKA, 2006). Até a data atual não temos conhecimento de qualquer referência na literatura quanto à participação de resposta Th17 na infecção por *S. schenckii* em nenhum modelo experimental. Embora IL-17 possa ser produzida também por células do sistema imune inato juntamente com IL-17F e IL-22 (KORN et al., 2009), é pouco provável que a liberação desta citocina em nosso sistema tenha sido devida a outras fontes, visto que células morfológicamente identificáveis como linfócitos constituem a quase totalidade dos esplenócitos totais observados durante a contagem destas células. Diante disto, nossos resultados sugerem a participação de uma resposta Th17 atuando em paralelo à resposta Th1, melhor evidenciada pela liberação de IL-17 quando os esplenócitos foram estimulados com PPC. Este achado vai de encontro à demonstração, por van de Veerdonk et al. (2009), de que a manana (amplamente presente também na parede celular de *S. schenckii*) de *C. albicans* é capaz de induzir a produção de IL-17 em cultura com PBMCs (células mononucleares derivadas do sangue periférico) de humanos.

Também avaliamos a liberação de IL-23 pelos esplenócitos, uma citocina reconhecidamente implicada na expansão e manutenção de células Th17 já diferenciadas (McGEACHY & CUA, 2008; VAN DE VEERDONK et al., 2009). Embora a IL-23 seja predominantemente produzida por macrófagos e células dendríticas (KORN et al., 2009), decidimos avaliar sua liberação pelos esplenócitos totais, dos quais apenas uma pequena fração são macrófagos e células dendríticas, em razão das quantidades limitadas de

sobrenadante obtido das culturas de PECs. No entanto, nenhum dos antígenos testados foi capaz de induzir a IL-23 a níveis detectáveis pelo ensaio utilizado, em nenhum dos períodos avaliados.

Avaliamos também a liberação de IL-4 pelos esplenócitos ao longo das 10 semanas do experimento. Inúmeros outros modelos experimentais de doença fúngica têm demonstrado que o padrão Th2 de resposta, com envolvimento de IL-4, determina a suscetibilidade ou o agravamento da infecção (KOGUCHI & KAWAKAMI, 2002; ARRUDA et al., 2004; PHADKE & MEHRAD, 2005; MULLER et al., 2007). Na maioria das infecções, salvo aquelas causadas por parasitas, a imunidade do tipo 1 é protetora, enquanto a resposta do tipo 2, caracteristicamente relacionada com a IL-4, auxilia na resolução do processo inflamatório (SPELLBERG & EDWARDS, 2001). Em concordância com essa função desempenhada pela IL-4, nossos dados mostram liberação aumentada da mesma em resposta a ambos os antígenos apenas no final do período experimental, na 8ª e 10ª semanas. Resultados anteriores obtidos em nosso laboratório mostram aumento nos níveis de imunoglobulina G (IgG) sérica na 8ª e 10ª semanas após a infecção dos animais (dados não publicados). Juntos, nossos resultados apontam para um provável papel da IL-4 na resolução da infecção pelo *S. schenckii* no modelo utilizado, possivelmente pela promoção de anticorpos opsonizantes que auxiliariam na eliminação do fungo pelos macrófagos.

Ao longo do estudo nos deparamos com diversas diferenças nos resultados obtidos quando as células foram cultivadas na presença de PPC ou SSTI, conforme detalhado nos parágrafos acima e sumarizado na Figura 9. Inúmeros fatores podem estar envolvidos em maior ou menor grau como causa destas alterações, como a presença de componentes termolábeis na parede fúngica que poderiam ser degradados durante a inativação da levedura, ou mesmo o aumento da exposição superficial de algum componente da parede celular devido

ao aquecimento, conforme sugerido pela exposição de uma glucana em *C. albicans* termoinativada (WELLINGTON et al., 2009). No entanto, durante a extração do PPC a levedura de *S. schenckii* é autoclavada e, portanto, também exposta ao calor. Diante disto, outra possibilidade é que, devido ao tamanho da levedura íntegra, a exposição dos antígenos aos receptores celulares seja dificultada ou, ainda, a levedura íntegra poderia não ter determinantes antigênicos suficientemente expostos em sua superfície, estericamente impedidos de se ligarem aos receptores nos macrófagos e linfócitos e, assim, induzir resposta semelhante ao PPC.

7. Conclusões

- ❖ Ambos os antígenos avaliados provocaram quedas moderadas na viabilidade das PEC, mas não nos esplenócitos totais. Reduções mais pronunciadas na viabilidade foram observadas quando as PEC foram cultivadas com LPS, nos levando a inferir que as mesmas sejam o resultado da estimulação exacerbada e alta produção de NO por estas células;
- ❖ PPC possui maior potencial como indutor da liberação de NO, IFN- γ e TNF- α quando comparado com o SSTI;
- ❖ Por outro lado, o SSTI parece induzir maior liberação de IL-10 que o PPC, característica melhor evidenciada enquanto indutor desta citocina em cultura com células de animais não infectados;
- ❖ Ambos os antígenos se comportaram de maneira semelhante quanto à indução da liberação de IL-4 em cultura com os esplenócitos totais;
- ❖ Nossos resultados evidenciam a participação da IL-17 na resposta imune contra *S. schenckii*, possivelmente liberada a partir de células Th17. Esta resposta foi melhor induzida pelo PPC do que pelo SSTI, tanto em animais infectados como não infectados;
- ❖ Em culturas de esplenócitos totais nenhum dos antígenos foi capaz de induzir a liberação de IL-23;
- ❖ Contrariando o que acontece em outros modelos experimentais de doença fúngica, a IL-10 não parece estar relacionada à supressão da resposta proliferativa dos esplenócitos e aumento da suscetibilidade à multiplicação fúngica no animal, assim como não o parece a IL-4, que atua apenas na fase de resolução da infecção.

8. Referencias

ABBAS, A.K.; LICHMAN, A.H.; PILLAI, S. Cellular and molecular immunology. 6th ed. 2007. Saunders Elsevier. 566 pages.

AL-TAWFIQ, J.A.; WOOLS, K.K. Disseminated sporotrichosis and *Sporothrix schenckii* fungaemia as the initial presentation of human immunodeficiency virus infection. Clin. Infect. Dis., v.26, n.6, p.1406-1409, 1998.

ALVIANO, C.S.; TRAVASSOS, L.R.; SCHAUER, R. Sialic acids in fungi: a minireview. Glycoconj. J., v.16, n.9, p.545-554, 1999.

BALISH, E.; WARNER, T.F.; NICHOLAS, P.J.; PAULLING, E.E.; WESTWATER, C.; SCHOFIELD, D. A. Susceptibility of germfree phagocyte oxidase- and nitric oxide synthase 2-deficient mice, defective in the production of reactive metabolites of both oxygen and nitrogen, to mucosal and systemic candidiasis of endogenous origin. Infect. Immun., v.73, p. 1313-1320, 2005.

BALLOY, V.; HUERRE, M.; LATGE, J.P.; CHIGNARD, M. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. Infect. Immun., v.73, p. 494-503, 2005.

BARROS, M.B.L.; SCHUBACH, A.O.; GALHARDO, M.C.G.; SCHUBACH, T.M.P.; VALLE, A.C.F. Sporotrichosis with widespread cutaneous lesions: report of 24 cases related to transmission by domestic cats in Rio de Janeiro, Brazil. Int. J. Dermatol., v.42, p. 677-81, 2003.

- BEADLING, C.; SLIFKA, M;K. Regulation of innate and adaptive immune responses by the related cytokines IL-12, IL-23, and IL-27. *Arch. Immunol.*, v.54, p.15-24, 2006.
- BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.*, New York, v.2, n.10, p. 907-916, 2001.
- CARLOS, I. Z., SGARBI, D.B.G., ANGLUSTER, J., ALVIANO, C.S., AND SILVA, C.L. Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the systemic form of the disease. *Mycopathologia*, v.117, p.139-144, 1992.
- CARLOS, I.Z.; SGARBI, D.B.G.; PLACERES, M.C.P. Host organism defense by a peptide-polysaccharide extracted from the fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*, v.144, p.9-14, 1999.
- CARLOS, I.Z.; SGARBI, D.B.G.; SANTOS, G.C. *Sporothrix schenckii* lipid inhibits macrophage phagocytosis, Involvement of nitric oxide and tumor necrosis factor- α . *Scandinavian J. Immunology*, v.57, p.214-220, 2003.
- CARLOS, I.Z.; ZINI, M.M.C.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C.S.; SILVA, C.L. Disturbances in the production of Interleukin-1 and Tumor necrosis factor in disseminated murine sporotrichosis. *Mycopathologia*, v.127, p.189-194, 1994.
- CARLOS, I.Z.; SASSÁ, M.F.; SGARBI, D.B.G.; PLACERES, M.C.P.; MAIA, D.C.G. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. *Mycopathologia*, v.168, p.1–10, 2009.
- CARRIER, Y.; YUAN, J.; KUCHROO, V.K.; WEINER, H.L. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF- β T cell-transgenic mice. *Journal of Immunology*, v. 178, p. 179-185, 2007.

CASTILLO, M.C.; TAPIA, F.J.; ARCINIEGAS, E. Ultrastructural localization of specific surface antigens in the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*. J. Med. Vet. Mycol., v.28, n.1, p.91-94, 1990.

CHARALANPOS, A.; ROILIDES, E. Cytokines and fungal infections. J. Hematol., v.129, p.583-596, 2005.

DA ROSA, A.C.M.; SCROFERNEKER, M.L.; VETTORATO, R.; GERVINI, R.L.; VETTORATO, G.; WEBER, A. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. J. Am. Acad. Dermatol., v.52, n.3, p.451-459, 2005.

DE ALBORNOZ, M.B.; MENDOZA, M.; DE TORRES, E.D. Growth temperatures of isolates of *Sporothrix schenckii* from disseminated and fixed cutaneous lesions of sporotrichosis. Mycopathologia, v.95, n.2, p.81-83, 1986.

DE ARAÚJO, T.; MARQUES, A.C.; FERDEL, F. Sporotrichosis. Int. J. Dermatol., v.40, n.12, p.737-742, 2001.

FANTONE, J.C.; WARD, P.A. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. Am. J. Pathol., v.107, n.3, p.395-418, 1982.

FERNANDES, K.S.S.; COELHO, A.L.J.; BEZERRA, L.M.L.; BARJA-FIDALGO, C. Virulence of *Sporothrix schenckii* conidia and yeast cells, and their susceptibility to nitric oxide. Immunology, v. 101, p. 563-69, 2000.

FERNANDES, K.S.S.; NETO, E.H.; BRITO, M.M.S.; SILVA, J.S.; CUNHA, F.Q.; BARJA-FIDALGO, C. Detrimental role of endogenous nitric oxide in host defense against *Sporothrix schenckii*. Immunology, v.123, p.469-479, 2007.

FIGUEIREDO, C.C.; LIMA, O.C.; CARVALHO, L.; LOPES-BEZERRA, L.M.; MORANDI, V. The *in vitro* interaction of *Sporothrix schenckii* with human endothelial cells is modulated by cytokines and involves endothelial surface molecules. *Microbial Pathog.*, v.36, p.177-188, 2004.

GALHARDO, M.C.G.; SILVA, M.T.T.; LIMA, M.A.; NUNES, E.P.; SCHETTINI, L.E.C.; DE FREITAS, R.F.; PAES, R.A.; NEVES, E.S.; DO VALLE, A.C.F. *Sporothrix schenckii* meningitis in AIDS during immune reconstitution syndrome. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, v.81, p.696-699, 2010.

GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B.A.W.H. *Kuby immunology*. New York: W.H. Freeman and company, 4ed., p.670, 2000.

GORI, S.; LUPETTI, A.; MOSCATO, G.; PARENTI, M.; LOFARO, A. Disseminated sporotrichosis in patients with AIDS: case report and review of the literature. *Acta Cytol.*, v.41, n.2, p.519-521, 1997.

GREEN, J.T.; RICHARDSON, C.; MARSHALL, R.W.; RHODES, J.; MCKIRDY, H.C.; THOMAS, G.A.; WILLIAMS, G. T. Nitric oxide mediates a therapeutic effect of nicotine in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.*, v.14, p.1429-1434, 2000.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.*, v.126 (1), p.131-138, 1982.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, MC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.*, v.219, p.1-14, 1984

HOGAN, L.H.; KLEIN, B.S.; LEVITZ, S.M. Virulence factors of medically important fungi. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.9, n.4, p.469-488, 1996.

HUANG, F-P.; NIEBALA, W.; WEI, X-Q.; XU, D.; FENG, G-J.; ROBINSON, J. H.; LAM, C.; LIEW, F.Y. Nitric oxide regulates Th1 cell development through the inhibition of IL-12 synthesis by macrophages. *Eur. J. Immunol.*, v.28, p.4062-4070, 1998.

HUFFNAGLE, G.B.; DEEP, G.S. Innate and adaptive determinants of host susceptibility to medically important fungi. *Curr. Opin. Microbiol.*, v.6, p.344-350, 2003.

KAUFFMAN, C.A. Sporotrichosis. *Clin. Infect. Dis.*, v.29, n.2, p.231-236, 1999.

KOGUCHI, Y.; KAWAKAMI, K. Cryptococcal infection and Th1-Th2 cytokine balance. *Int. Rev. Immunol.*, v.21, p.423-438, 2002.

KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M. IL-17 and Th17 cells. *Annu. Rev. Immunol.* v.27, p.485-517, 2009.

KOVALOYSKY, D.; REFOJO, D.; HOSBOER, F.; ARZT, E. Molecular mechanisms and Th1/Th2 pathways in corticosteroid regulation of cytokine production. *J Neuroimmunol.*, v.109, n.1, p.23-29, 2000.

LANGFELDER, K.; STREIBEL, M.; JAHN, B.; HAASE, G.; BRAKHAGEA, A.A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, v.38, p.143-158, 2003.

LEVITZ, S.M. Th17 cells bounce off the fungal wall. *Cell Host and Microbe*, v.5, n.4, p.311-313, 2009.

LIVONESI, M.C.; ROSSI, M.A.; DESOUTO, J.T.; CAMPANELLI, A.P.; DE SOUSA, R.L. M.; MAFFEI, C.M.L.; FERREIRA, B.R.; MARTINEZ, R.; DA SILVA, J.S. Inducible nitric oxide synthase-deficient mice show exacerbated inflammatory process and high production of Th1 and Th2 cytokines during paracoccidioidomycosis. *Microbes and infection*, v.11, n.1, p.123-132, 2009.

LOPES, J.O.; ALVES, S.H.; BENEVENGA, J.P.; REGIO, O.R. Filamentous forms of *Sporothrix schenckii* in material from human lesions. *J. Med. Vet. Mycol.*, v.30, n.5, p.403-406, 1992.

LOPES-BEZERRA, L.M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R.O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *An. Acad. Bras. Cienc.*, v.78, p. 293-308, 2006.

LOUREIRO Y PENHA, C.V.; LOPEZ-BEZERRA, L.M. Concanavalin A-binding cell wall antigens of *Sporothrix schenckii*, a serological study. *Med. Mycology*. v.38, p.1-7, 2000.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Proteins measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v.193, n.1, p.265-275, 1951.

LYON, G.M.; ZURITA, S.; CASQUERO, J.; HOLGADO, W.; GUEVARA, J.; BRANDT, M.E.; DOUGLAS, S.; SHUTT. K.; WARNOCK, D.W.; HAJJEH, R.A. Population-based surveillance and a case-control study of risk factors for endemic lymphocutaneous sporotrichosis in Peru. *Clin. Infect. Dis.*, v.36, n.1, p.34-39, 2003.

MADRID, I.M.; XAVIER, M.O.; MATTEI, A.S.; FERNANDES, C.G.; GUIM, T.N.; SANTIN, R.; SCHUCH, L.F.D.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A. Role of melanin in the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis. *Microbes and Infection*, v.12 p.162-165, 2010.

MAHAJAN, V.K.; SHARMA, N.L.; SHANKER, V.; GUPTA, P.; MARDI, K. Cutaneous sporotrichosis: Unusual clinical presentations. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.*,v.76, p.276-280, 2010.

MAIA, D.C.G.; SASSÁ, M.F.; PLACERES, M.C.P.; CARLOS, I.Z. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. *Mycopatologia*, v. 161, p. 11-19, 2006.

MARSHALL, H.E.; STAMLER, J.S. NO waiting to exhale in asthma. *Am J Respir. Crit. Care Med.*, v.161, p.685-687, 2000.

MARTINS, G.A.; CARDOSO, M.A.G.; ALIBERTI, J.C.S.; SILVA, J.S. Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Immunology Letters*, v.63, p.113-120, 1998.

MARTINS, G.A.; PETKOVA, S.B.; MACHADO, F.S.; KITSIS, R.N.; WEISS, L.M.; WITTNER, M.; TANOWITZ, H.B.; SILVA, J.S. Fas-FasL interaction modulates nitric oxide production in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *Immunology*, v.103, p.122-129, 2001.

McCORMACK, F.X.; GOBBONS, R.; WARD, S.R.; KUZMENKO, A.; WU, H.; DEEP, G. S. Macrophage-independent fungicidal action of the pulmonary colletins. *J. Infect. Dis.*, v.278, p. 36250-36256, 2003.

McGEACHY, M.J; CUA, D.J. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity*, v.28, p.445-453, 2008.

MENCACCI, A.; CENCI, E.; BACCI, A.; MONTAGNOLI, C.; BISTONI, F. ROMANI, L. Cytokines in candidiasis and aspergillosis. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, v.1, p. 235-251, 2000.

MENDES-GIANINNI, M.J.S.; MELHEM, M.S.C. Infecções Fúngicas. *In*: FERREIRA, A.W.; AVILA, S.L.M. Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2ª Ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001, p.443.

MORRIS-JONES, R. Sporotrichosis. *Clin. Exp. Dermatol.*, v.27, n.6, p. 427-431, 2002.

MORRIS-JONES, R.; YOUNGCHIM, S.; GOMEZ, B.L.; AISEN, P.; HAY, R.J.; NOSANCHUK, J.D.; CASADEWALL, A.; HAMILTON, A.J. Synthesis of melanin-like pigment by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. *Infect. Immun.*, v.71, n.7, p.4026-4033, 2003.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, v.65, p.55-63. 1983.

MUGURUMA, K.; FUJIMURA, T.; MASUZAWA, M.; HASHIMOTO, A.; OHTA, Y.; KATSUOKA, K. Analysis of cytokine profiles in sporotrichosis. *J. Dermatol. Sci.*, v.10, p.92, 1995.

MULLER, U.; STENZEL, W.; KOHLER, G.; WERNER, C.; POLTE, T.; et al. IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol.*, v.179, p.5367–5377, 2007.

MYERS, J.T.; TSANG, A.W.; SWANSON, J.A. Localized reactive oxygen and nitrogen intermediates inhibit escape of *Listeria monocytogenes* from vacuoles in activated macrophages. *J. Immunol.*, v.171, p.5447-5453, 2003.

NASCIMENTO, F.R.F.; CALICH, V.L.G.; RODRÍGUEZ, D.; RUSSO, M. Dual role for nitric oxide in paracoccidiodomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. *The Journal of Immunology*, v.168, p.4593-4600, 2002.

NASCIMENTO, R.C.; ALMEIDA, S.R. Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis. *FEMS Immunol. and Med. Microbiol.*, v.43, p.241-247, 2005.

NEYRA, E.; FONTEYNE, P.; SWINNE, D.; FAUCHE, F.; BUSTAMANTE, B.; NOLARD, N. Epidemiology of human sporotrichosis investigated by amplified fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.*, v.43, p. 1348-1352, 2005.

NOBEN-TRAUTH, N. Conventional naive CD4+ T cells provide na initial source of IL-4 during Th2 differentiation. *J. Immunol.*, v.165, p.3620-3625, 2000.

NOBRE, M.O.; ANTUNES, T.A.; FARIA, R.O.; CLEFF, M.B.; FERNANDES, C.G.; MUSCHNER, A.C.; MEIRELES, M.C.A.; FERREIRO, L. Differences in virulence between isolates of feline Sporotrichosis. *Mycopathologia*, v. 160 (1), p. 43-49, 2005.

PHADKE, A.P.; MEHRAD, B. Cytokines in host defense against *Aspergillus*: recent advances. *Med. Mycol.*, v.43, s.1:S173-176, 2005.

MARCIA RAMOS-E-SILVA, M. ; VASCONCELOS, C. ; CARNEIRO, S. ; CESTARI, T. Sporotrichosis. *Clinics in Dermatology*, v.25, p.181–187, 2007.

RENGARAJAN, J.; SZABO, S. J.; GLIMCHER, L. H. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today*, v.21, n.9, p.479-483, 2000.

RESTREPO-GUTIERREZ, S.; ARANGO-ARTEAGA, M.; URIBE-JAMILO, F.; ZULUAGA-CADENA, A.I.; RETREPO-MORENO, A. Course of experimental murine infection induced by *Sporothrix schenckii* conidia according to depth of inoculation J. Med. Vet. Mycol., v.31, p.411-420, 1993.

ROMAGNANI, S.; MAGGI, E.; LIOTTA, F.; COSMI, L.; ANNUNZIATO, F. Properties and origin of human Th17 cells. Molecular Immunology, v.47, p.3-7, 2009.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. Nature Rev. Immunol., v.4, p.1-23, 2004.

ROMERO-MARTINEZ, R.; WHEELER, M.; GUERRERO-PLTA, A.; RICO, G.; TORRES-GUERRERO, H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. Infect. Immun., v.68, p.3696-3703, 2000.

SCHUBACH, A.; BARROS, M.B.; WANKE, B. Epidemic sporotrichosis. Curr. Opin. Infect. Dis., v.21, n.2, p.129-133, 2008.

SGARBI, D.B.G.; SILVA, A.J.R.; CARLOS, I.Z.; SILVA, C.L.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C.S. Isolation of ergosterol peroxide and its reversion to ergosterol in the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. Mycopathologia, v.139, p.9-12, 1997.

SHIMONAKA, H.; NOGUCHI, T.; KAWAI, K.; KASEGAWA, I.; NOZAWA, Y.; ITO, Y. Immunochemical studies on the human pathogen *Sporothrix schenckii*: effects of chemical and enzymatic modification of the antigenic compounds upon immediate and delayed reactions. Infect. Immun., v.11, n.6, p.1187-1194, 1975.

SHIRAISHI, A.; NAKAGAKI, K.; ARAI, T. Role of cell-mediated immunity in the resistance to experimental sporotrichosis in mice. Mycopathologia, v.120, n.1, p.15-21, 1992.

SPELLBERG, B.; EDWARDS, J.E. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Immunity and Infection*, v.32, p.76-102, 2001.

TABORDA, C.P.; DA SILVA, M.B.; NOSANCHUK, J.D.; TRAVASSOS, L.R. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. *Mycopathologia*, v.165, n.4-5, p.331–339, 2008.

TACHIBANA, T.; MATSUYAMA, T.; MITSUYAMA, M. Characteristic infectivity of *Sporothrix schenckii* to mice depending on routes of infection and inherent fungal pathogenicity. *Med. Mycol.*, v.36, n.1, p.21-27, 1998.

TEIXEIRA, P.A.; DE CASTRO, R.A.; NASCIMENTO, R.C.; TRONCHIN, G.; TORRES, A.P.; LAZÉRA, M.; DE ALMEIDA, S.R.; BOUCHARA, J.P.; LOUREIRO Y PENHA, C.V.; LOPES-BEZERRA, L.M. Cell surface expression of adhesins for fibronectin correlates with virulence in *Sporothrix schenckii*. *Microbiology*, v.155, n.11, p.3730-3738, 2009.

UENOTSUCHI, T.; TAKEUCHI, S.; MATSUDA, T.; URABE, K.; KOGA, T.; UCHI, H.; NAKAHARA, T.; FUKAGAWA, S.; KAWASAKI, M.; KAJIWARA, H.; YOSHIDA, S.; MOROI, Y.; FURUE, M. Differential induction of Th1-prone immunity by human dendritic cells activated with *Sporothrix schenckii* of cutaneous and visceral origins to determine their different virulence. *Int. Immunol.*, v. 18, p.1637-46, 2006.

VAN DER VEEN, R.C. Nitric oxide and T helper cell immunity. *International Immunopharmacology*; v.1, p.1491-1500, 2001.

VAN DE VEERDONK, F.L.; GRESNIGT, M.S.; KULLBERG, B.J.; VAN DER MEER, J.W.M.; JOOSTEN, L.A.B.; NETEA, M.G. Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. *BMB Reports*, v.42, n.12, p.776-787, 2009.

VAN DE VEERDONK, F.L. MARIJNISSEN, R.J.; KULLBERG, B.J.; KOENEN, H.J.P.M. CHENG, S-C.; JOOSTEN, I.; VAN DEN BERG, W.B.; WILLIAMS, D.L.; VAN DER MEER, J.W.M.; JOOSTEN, L.A.B.; NETEA, M.G. The macrophage mannose receptor induces il-17 in response to *Candida albicans*. *Cell Host & Microbe* v.5, p.329–340, 2009.

WANG, Z.; WANG, Y.; ZHU, K.; GUO, L.; YANG, Y. Mechanism of three inhibitors of TACE in blocking the converting of pro-TNF alpha into sTNF alpha. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.*, v.23, n.2, p.116-120, 2003.

WELLINGTON, M.; DOLAN, K.; KRYSAN, D.J. Live *Candida albicans* suppresses production of reactive oxygen species in phagocytes. *Infection and Immunity*, v.77, n.1, p.405-413, 2009.

WU-HSIEH, B. A.; CHEN, W.; LEE, H-J. Nitric oxide synthase expression in macrophages of *Histoplasma capsulatum*-infected mice is associated with splenocyte apoptosis and unresponsiveness. *Infection and immunity*; v.68, n.11, p.5520-5526, 1998.

XIE, Q.; KAWAKAMI, K.; KUDEKEN, N.; ZHANG, T.; QURESHI, M.H.; SAITO, A. Different susceptibility of three clinically isolated strains of *Cryptococcus neoformans* to the fungicidal effects of reactive nitrogen and oxygen intermediates: possible relationships with virulence. *Microbiol. Immunol.*, v.41, n.9, p.725-731, 1997.

Anexo i: tabelas

Tabela 1: Viabilidade celular das PEC dos animais infectados.

Semanas	Animais Infectados							
	PPC	±DP	SSTI	±DP	LPS	±DP	RPMI	±DP
2	96,00	1,95	99,69	0,23	90,87	6,25	100	0
4	95,07	1,13	94,06	0,70	79,68	2,25	100	0
6	61,32	5,57	64,11	2,41	44,53	2,30	100	0
8	92,01	3,73	97,31	0,98	93,12	4,11	100	0
10	98,84	0,82	95,05	3,50	99,53	0,36	100	0

Tabela 2: Viabilidade celular das PEC dos animais controle.

Semanas	Animais Controle							
	PPC	±DP	SSTI	±DP	LPS	±DP	RPMI	±DP
2	80,13	2,80	89,57	4,27	63,13	2,44	100	0
4	81,49	0,83	81,40	2,55	63,44	1,97	100	0
6	81,49	0,83	80,87	2,60	63,44	1,97	100	0
8	100,06	0,06	94,44	2,92	66,17	5,02	100	0
10	100,00	0,00	75,36	2,16	89,17	7,66	100	0

Tabela 3: Viabilidade celular dos esplenócitos dos animais infectados.

Semanas	Animais Infectados							
	PPC	±DP	SSTI	±DP	ConA	±DP	RPMI	±DP
2	95,95	4,05	99,27	0,73	97,83	2,18	100	0
4	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100	0
6	99,64	0,36	100,00	0,00	100,00	0,00	100	0
8	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100	0
10	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100	0

Tabela 4: Viabilidade celular dos esplenócitos dos animais controle.

Semanas	Animais Controle							
	PPC	±DP	SSTI	±DP	ConA	±DP	RPMI	±DP
2	100,00	0,00	95,70	4,30	100,00	0,00	100	0
4	100,00	0,00	97,75	2,26	98,52	1,49	100	0
6	100,00	0,00	97,75	2,26	98,52	1,49	100	0
8	95,54	4,46	100,00	0,00	93,11	6,89	100	0
10	96,33	1,68	100,00	0,00	100,00	0,00	100	0

Tabela 5: Produção de NO pelas PEC dos animais infectados.

Semanas	Animais Infectados							
	PPC	±DP	SSTI	±DP	LPS	±DP	RPMI	±DP
2	114,25	7,17	33,96	1,81	93,57	3,43	94,11	4,86
4	8,80	2,19	24,56	7,52	93,82	3,56	1,23	0,97
6	63,67	15,62	50,81	15,27	104,06	4,99	4,62	1,78
8	100,10	4,59	80,18	14,06	118,64	7,13	47,08	19,89
10	79,55	2,65	83,67	15,66	102,33	3,74	4,52	1,87

Tabela 6: Produção de NO pelas PEC dos animais controle.

Semanas	Animais Controle							
	PPC	±DP	SSTI	±DP	LPS	±DP	RPMI	±DP
2	3,22	1,11	10,98	3,42	112,78	7,47	2,13	0,24
4	4,75	0,48	13,21	2,69	81,21	15,25	2,29	0,21
6	31,34	5,29	3,90	0,53	105,57	7,51	1,82	0,36
8	3,18	0,37	7,46	1,83	112,99	10,78	3,15	0,48
10	2,13	0,44	25,60	5,08	89,68	4,76	2,10	0,57

Tabela 7: Liberação de TNF- α pelas PEC dos animais infectados.

Semanas	Animais Infectados							
	PPC	±DP	SSTI	±DP	LPS	±DP	RPMI	±DP
2	259,48	17,92	272,70	28,52	369,50	25,17	24,68	1,62
4	23,38	7,91	38,55	6,72	203,10	37,58	48,43	17,36
6	116,60	4,98	129,90	24,01	212,65	15,38	2,13	0,86
8	427,33	28,92	232,90	38,91	860,30	68,65	144,13	23,07
10	65,68	17,43	103,88	21,77	160,73	24,38	39,05	12,13

Tabela 8: Liberação de TNF- α pelas PEC dos animais controle.

Semanas	Animais Controle							
	PPC	\pm DP	SSTI	\pm DP	LPS	\pm DP	RPMI	\pm DP
2	25,35	9,79	44,05	2,95	80,93	14,77	13,90	4,44
4	28,55	5,10	39,33	4,31	124,68	30,35	12,53	5,02
6	52,18	5,14	33,83	1,64	129,48	19,97	8,40	1,79
8	29,80	5,24	40,20	6,66	150,50	8,24	18,63	1,82
10	25,10	3,60	34,15	3,03	147,10	3,96	6,55	1,24

Tabela 9: Liberação de IL-10 pelas PEC dos animais infectados.

Semanas	Animais Infectados							
	PPC	\pm DP	SSTI	\pm DP	LPS	\pm DP	RPMI	\pm DP
2	1093,80	260,17	1467,10	345,05	2082,30	489,81	144,23	9,10
4	230,93	36,01	278,15	27,01	644,00	68,20	117,78	10,34
6	248,45	25,93	1230,33	270,52	1118,50	105,90	201,18	64,13
8	149,90	10,28	406,48	45,00	459,45	80,51	117,68	24,56
10	326,25	90,97	415,15	46,06	670,75	84,05	140,03	17,04

Tabela 10: Liberação de IL-10 pelas PEC dos animais controle.

Semanas	Animais Controle							
	PPC	\pm DP	SSTI	\pm DP	LPS	\pm DP	RPMI	\pm DP
2	148,60	5,61	488,78	66,40	1621,00	175,67	172,00	7,71
4	144,10	83,76	468,15	66,57	1309,83	268,72	54,45	7,02
6	704,83	118,92	813,80	96,35	1255,85	193,02	185,08	54,97
8	159,70	12,53	531,53	50,23	1429,35	301,61	160,58	31,46
10	125,53	52,52	483,00	62,86	1361,48	393,08	65,83	15,41

Tabela 11: Liberação de IFN- γ pelos esplenócitos dos animais infectados.

Semanas	Animais Infectados							
	PPC	\pm DP	SSTI	\pm DP	ConA	\pm DP	RPMI	\pm DP
2	10620,08	400,60	3024,78	164,45	11290,45	217,60	2155,90	432,61
4	3558,25	1242,89	2782,85	299,56	9643,30	670,25	172,25	23,46
6	3564,40	409,60	1912,05	297,82	4794,58	331,18	114,60	31,21
8	5268,88	957,51	5127,18	771,25	6999,20	525,50	157,20	24,86
10	2127,05	560,65	3126,50	160,88	5680,95	862,87	430,00	14,25

Tabela 12: Liberação de IFN- γ pelos esplenócitos dos animais controle.

Semanas	Animais Controle							
	PPC	\pm DP	SSTI	\pm DP	ConA	\pm DP	RPMI	\pm DP
2	2244,30	38,23	303,78	33,26	5830,55	732,19	377,43	138,82
4	2198,60	287,71	559,00	59,85	5873,30	473,61	139,90	49,27
6	299,65	30,30	196,53	23,58	4663,40	1151,39	133,48	87,91
8	409,30	134,65	1117,15	216,27	5732,33	81,58	572,83	366,15
10	75,25	24,36	242,23	89,90	4762,15	964,59	296,45	81,65

Tabela 13: Liberação de IL-4 pelos esplenócitos dos animais infectados.

Semanas	Animais Infectados							
	PPC	\pm DP	SSTI	\pm DP	ConA	\pm DP	RPMI	\pm DP
2	12,43	1,11	10,75	0,80	14,60	1,37	8,75	0,93
4	12,25	2,15	12,20	0,51	15,33	0,63	8,25	0,26
6	11,38	2,10	10,65	0,31	17,50	1,67	6,90	0,18
8	21,83	5,50	21,38	0,93	20,28	6,29	8,95	0,83
10	18,13	2,49	12,93	0,74	16,78	2,24	10,45	0,44

Tabela 14: Liberação de IL-4 pelos esplenócitos dos animais controle.

Semanas	Animais Controle							
	PPC	\pm DP	SSTI	\pm DP	ConA	\pm DP	RPMI	\pm DP
2	14,68	1,24	8,00	0,57	16,55	2,53	8,00	1,08
4	9,53	1,07	9,18	0,33	13,83	1,27	9,90	0,50
6	21,63	2,05	7,80	0,22	11,25	0,99	8,30	1,31
8	11,50	1,84	8,85	0,79	15,00	0,62	10,68	0,79
10	11,05	1,45	7,10	0,26	9,95	0,44	5,33	0,13

Tabela 15: Liberação de IL-17 pelos esplenócitos dos animais infectados.

Semanas	Animais Infectados							
	PPC	\pm DP	SSTI	\pm DP	ConA	\pm DP	RPMI	\pm DP
2	84,43	8,95	31,58	2,07	53,23	6,92	8,10	1,12
4	13,83	3,49	15,00	3,76	26,63	4,17	8,28	0,83
6	30,95	7,61	52,20	6,12	48,40	5,02	5,00	0,42
8	91,70	26,34	33,88	22,02	25,88	5,54	10,28	1,86
10	57,60	21,57	67,73	25,51	56,35	13,41	7,93	1,27

Tabela 16: Liberação de IL-17 pelos esplenócitos dos animais controle.

Semanas	Animais Controle							
	PPC	±DP	SSTI	±DP	ConA	±DP	RPMI	±DP
2	49,30	11,44	26,30	7,37	36,13	8,72	21,38	4,06
4	28,38	4,19	35,90	10,44	36,98	6,67	29,25	17,06
6	17,60	1,56	15,63	6,34	26,15	5,53	11,50	1,61
8	8,90	0,29	19,85	4,36	30,15	6,37	7,45	0,69
10	8,98	0,05	7,38	0,28	14,18	2,25	8,33	0,82

Anexo ii: artigo científico

JMM paper no. JMM/2010/025189 - Submission acknowledgement

13/8/2010

Melanie Scourfield

Para Lucas Souza Ferreira

De: Melanie Scourfield (submit.jmm@sgm.ac.uk)

Enviada: sexta-feira, 13 de agosto de 2010 8:07:52

Para: Lucas Souza Ferreira (gigabreath@hotmail.com)

Dear Mr Lucas Souza Ferreira

JMM paper no. JMM/2010/025189: Exaggerated NO production suppress immunity during *Sporothrix schenckii* infection

Thank you for submitting your paper to JMM. It has been assigned the reference number shown above. Please quote this number in any correspondence.

Your paper is being considered for publication by Dr Steven Bates ("Steven Bates" <s.bates@exeter.ac.uk>), who will inform you of the decision in due course. If you have any queries about the progress of your paper prior to receiving the decision please contact Dr Bates. If you are asked to revise the paper, please submit your revised manuscript via the Bench>Press system.

Your paper will be reviewed on the understanding that all the authors have agreed to the submission and to the order of their names on the title page. They must also have agreed that you, as corresponding author, have their agreement to act on their behalf throughout the editorial review and publication process. You are responsible for obtaining such agreement.

If your paper is accepted for publication, it is a condition of acceptance that you assign copyright to the Society for General Microbiology (the URL for the copyright assignment form will be sent to you at the appropriate stage).

We welcome the submission of striking pictures, preferably in colour, for possible use on the front cover of Journal of Medical Microbiology. Pictures need not be linked with a paper in the journal but should be of medical microbiological content (see previous issues of JMM for examples <http://jmm.sgmjournals.org/contents-by-date.0.shtml>). We will pay GBP75 towards expenses for any pictures used.

IMPORTANT:

(i) Papers in Press The journal has a Papers in Press feature where accepted manuscripts appear online in an unedited format before they are scheduled to appear in print. Unless you inform us otherwise, we will assume that you agree to your manuscript being used in this way. Please make sure you check the details you have entered into the Bench>Press site very carefully, particularly the manuscript title, subject category and author details, as these will be used to generate the Papers in Press record. The final PDF used for the peer-review of a paper that is subsequently accepted will be the version of the manuscript used for Papers in Press.

(ii) Copies of files If your paper is rejected, withdrawn or deleted the source files will automatically be deleted from the system. Please make sure you keep your own copies of any files you upload to the site.

Yours sincerely
Dr Melanie Scourfield

Journal of Medical Microbiology Editorial Office Society for General Microbiology, Marlborough House, Basingstoke Road, Spencers Wood, Reading RG7 1AG, UK.

Phone: +44 118 988 1800. Fax: +44 118 988 1834. jmm@sgm.ac.uk
<http://jmm.sgmjournals.org/> <http://www.sgm.ac.uk/>

Society for General Microbiology. Registered as a Charity in England and Wales, no. 264017. A charity registered in Scotland, no. SC039250. Company Limited by Guarantee. Registered in England No. 1039582. Registered Office as above.

EXAGGERATED PRODUCTION OF NO SUPPRESS IMMUNITY DURING *SPOROTHRIX SCHENCKII* INFECTION

Autors: Ferreira LS; Maia DCG; Carli CB; Santos-Junior RR; Carlos IZ.

ABSTRACT

Assays of the immune response to a *Sporothrix schenckii* antigen (ExoAg) were performed to determine the factors responsible for the increased susceptibility of mice to infection by this fungus. The results suggest that the increased levels of nitric oxide (NO) and the reduced spleen cell proliferative response are involved in this increased susceptibility, in which macrophage apoptosis also participates. On the other hand, increased levels of the anti-inflammatory cytokine interleukin (IL)-10 at the beginning of infection are consistent with the low production of the aforementioned mediators at the same time, suggesting a role for IL-10 in starting of infection and establishment of the fungus.

INTRODUCTION

Sporotrichosis is a mycosis caused by the thermally dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*, causing in general subcutaneous nodular and/or ulcerative lesions that spread through lymphatic vessels (Ramos-e-Silva et al., 2007). Studies in murine models have suggested that the adaptive immune response against the fungus is the key mechanism in the host immune defense controlling the infection, and reports have emphasized the importance of the local cytokine profile, in which Th1 responses predominate (Fernandes et al., 2000; Uenotsuchi et al., 2006). This Th1 pattern promotes the activation of macrophages, which have been ascribed an important role in fungal contention and elimination, by producing inflammatory cytokines and other mediators such as NO and ROIs (reactive oxygen intermediates).

The nitric oxide molecule is a free radical produced by NO synthase, which catalyzes the conversion of L-arginine to L-citrulline. An NO synthase isozyme can be induced in response to various stimuli, commonly related to a Th1 pattern (Van Der Veen, 2001), as suggested by previous work in this group with an experimental model of systemic sporotrichosis (Maia et al., 2006). On the other hand, NO seems to have a role in the

negative feedback of the Th1 response, being capable of inducing T-cell hyporesponsiveness to mitogen stimulation (Huang et al., 1998; Van Der Veen, 2001) and macrophage/lymphocyte apoptosis (Laubach et al., 1995; Wu-Hsieh et al., 1998; Martins et al., 1998; 2001). However, despite being directly involved in immunosuppression, NO also represents a basic microbicidal agent used by the host to eliminate invading pathogens (Huang et al., 1998; Martins et al., 1998; 2001; Fernandes et al., 2008).

We have demonstrated an increase in fungal burden in the spleen and liver of mice infected with *S. schenckii*, despite the predominantly Th1 pattern and high NO production, indicating a possible escape mechanism for the pathogen (Carlos et al., 1994; 1999; Maia et al., 2006; Carlos et al., 2009). In this study we decided to evaluate the possible involvement of NO, TNF (tumour necrosis factor)- α and IL-10 in the suppression of antifungal immunity that leads to an increased animal susceptibility to infection.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Swiss mice weighing 18 to 25 g, from the Animal House of the Faculty of Pharmaceutical Sciences at Araraquara, UNESP University (Brazil), were used in all experiments. Test mice were infected with *S. schenckii* and both these and uninfected mice were then tested for 10 weeks.

The fungus. *Sporothrix schenckii*, strain 1099-18, was kindly provided by Dr. Celuta Sales Alviano, Institute of Microbiology, Federal University of Rio de Janeiro (Brazil). This strain was isolated from a human case of sporotrichosis at the Mycology Section of the Department of Dermatology, Columbia University, New York. The fungus was cultured at 37 °C for 8 days in brain heart infusion (BHI) broth (DIFCO) with constant rotary shaking at 150 cycles/min, resulting in a suspension of yeast cells.

Infection method. A suspension of *S. schenckii* yeast cells in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, containing 10^7 cells/mL, was prepared; 0.10mL of this suspension was inoculated intraperitoneally (i.p.) into each animal.

ExoAg derivation. Fungus was cultured as described above and the fungal culture was subjected to UV radiation for 1 h. This culture was shaken at 37 °C for 24 h and then UV-irradiated again for 1 h. After this procedure, merthiolate was added to the culture medium at a concentration of 1/5000 (w/v) and the culture was frozen at -20 °C for 48 h. Next, culture sterility was tested by the Sabouraud agar test and the culture was

filtered and concentrated 50 to 100 times in a concentrator (Amicon 8050, Danvers, MA). Protein was measured as 3.0 mg/mL.

Peritoneal exudate cells. Thioglycollate-elicited peritoneal exudate cells (PECs) were harvested from Swiss mice in 5.0 mL of sterile PBS, pH 7.4. The cells were washed twice by centrifugation at 200 g for 5 min at 4 °C and resuspended in appropriate medium for each test.

Spleen cells and Proliferation assay. The spleens were collected aseptically and placed in a Petri dish containing 3.0 mL RPMI-1640 culture medium (Sigma). The cell suspension was obtained by teasing the spleen and washing three times with RPMI-1640 as described above. The cells were resuspended to a concentration of 5×10^6 cells/mL in RPMI-1640 with 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 5×10^{-2} M mercaptoethanol and 5% inactivated fetal calf serum (Sigma), and cultivated in 96-well tissue culture plates at 3.5×10^5 cells per well in the presence of Concanavalin-A (Con-A), ExoAg or RPMI-1640 medium. [³H] thymidine uptake was measured 18h after a pulse of 0.4 µCi per well.

NO measurement. Adherent PEC were re-suspended in RPMI-1640 medium at a concentration of 5×10^6 cells/mL, and 100 µL of this suspension was added to each well of a 96-well tissue culture dish along with 100 µL of a 10.0 µg/mL (1.0 µg) *E. coli* O111B lipopolysaccharide (LPS) solution as positive control or RPMI-1640 medium as negative control. The cells were incubated for 24 h before stimulation, and 50 µL aliquots of the culture supernatant were mixed with 50 µL of Griess reagent [4] (1% w/v sulphonylamide, 0.1% w/v naphthylethylenediamine and 3% H₃PO₄) and incubated at room temperature for 10 min, after which the color reaction was determined at 540 nm with a Multiskan Ascent ELISA reader (Labsystems, Helsinki, Finland). Supernatants from quadruplicate cultures were assayed in four experiments and are reported as the mean (± SD) nitrite concentration.

Cytokine in culture supernatant. PECs and lymphocytes (5×10^6 cells/mL), harvested as described above, were cultured overnight in RPMI-1640-C at 37°C under 5% CO₂. The culture medium contained 47.40 µg/mL ExoAg or 10 µg/mL LPS/ConA (positive control) to stimulate production of cytokines, or had no stimulant added (negative control). The cytokines TNF-α and IL-10 were assayed by ELISA (Kit DuoSet®, R&D Systems, Minneapolis, MN) according to manufacturer's instructions. The results were expressed in picograms/mL.

Detection of apoptosis - TACS TM Annexin V-Biotin. Apoptosis was quantified by detecting annexin in cultures of peritoneal macrophages from each group

of mice, using the TACS TM Annexin V-Biotin kit, (R&D Systems). After adherence of the macrophages obtained from infected and normal animals on glass microscope slides for 1 h, the culture medium was removed and the samples prepared according to manufacture's instructions. A total of 100 macrophages were counted on each slide from each animal of the different groups. Counts were repeated three times. Apoptotic cells were characterized by green fluorescence while necrotic cells were characterized by red fluorescence, due to propidium iodide staining of the nucleus.

Statistical analysis. Results are representative of three independent experiments and are presented as the mean \pm SD of quadruplicate or triplicate observations (n=12). Means were tested for significant difference by the Tukey Test, using the program GrafPad InStat.

RESULTS AND DISCUSSION

In previous work we have demonstrated the increased susceptibility of mice during the course of experimental infection with *S. schenckii*, as revealed by reduced delayed type hypersensitivity (DTH) and lymphocyte transformation (Carlos et al., 1992), together with increased fungus proliferation in the spleen and liver of infected animals (CARLOS et al., 1994). Two mediators are commonly implicated in the induction of immunosuppression and increased susceptibility to infection: NO released by macrophages (VAN DER VEEN, 2001) and IL-10 produced by T cells (AKDIS & BLASER, 2001).

Analysis of NO production (Figure 1A) during experimental infection showed remarkably high levels, peaking at the 6th week. This increase in NO production coincides with the period of greatest fungal dissemination and IL-12 and IFN- γ production, found previously (Maia et al., 2006). This suggests that an exacerbated inflammatory response occurred, in which exaggerated NO production would suppress immunity against the fungus, thus controlling the response intensity (Van Der Veen, 2001). Estimates of the splenocyte proliferative response against ConA (Concanavalin A) and ExoAg (Figure 2) during infection showed a marked decrease between the 4th and 6th weeks, inversely correlated with the high production of NO and pro-inflammatory cytokines, thus suggesting that these mediators participate in the suppression of splenocyte proliferation and animal resistance to infection.

There is evidence demonstrating that NO is capable of inducing TNF- α production at the transcriptional level (Huang et al., 1998). Our results show TNF- α production following NO increase, much raised at the 7th week and maximized from the 8th week onwards (Figure 1B), possibly having a role in animal recovery. The increase in TNF- α production seems to sustain NO release at levels that allow efficient antifungal immune response, but are not enough to lead to suppression of immunity against the fungus. Corroborating this hypothesis are the findings of Nascimento and collaborators (2002), which show that higher levels of TNF- α production, to the detriment of NO release, are characteristic of mouse strains resistant to the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, but even then some NO production seems essential to animal resistance (Livonesi et al., 2009).

Interestingly, IL-10 production (Figure 3) during infection increased significantly in the 1st week, decreasing in the following weeks until the end of the experimental period. Induction of IL-10-dependent immunosuppression by fungal pathogens is a well-established mechanism of immune evasion (Romani & Puccetti, 2006). In the model used here, however, IL-10 seems not to have a direct role in the suppression of the splenocyte proliferative response or in increased host susceptibility to fungus dissemination between the 4th and 6th weeks, contrasting with what occurs in experimental infection with *Candida albicans* (Netea et al., 2004) or *Histoplasma capsulatum* (Allen & Deep, 2005), or against glucuronoxylomannan (GXM) of *Cryptococcus neoformans* (Chiapello et al., 2004). However, the higher levels of IL-10 at the beginning of infection suggest a role for it in establishing *S. schenckii* infection.

In addition to all the infectious and physiological processes, apoptosis is another natural mechanism of cell response. Much evidence implicates NO in the induction of macrophage apoptosis (Taylor et al., 2003; Chiapello et al., 2008), as a control mechanism for the inflammatory response. Annexin V assay (Figure 4) of cultured peritoneal macrophages from infected animals suggested the occurrence of apoptosis, peaking between the 4th and 6th weeks, during the highest NO, IL-12 and IFN- γ production, as reported here and previously. This evidence indicates that apoptosis may contribute, along with suppression of splenocyte proliferation, to the fungal immune evasion and decreased host resistance to infection.

Taken together, the above results indicate a major role for NO cytotoxic levels in the increased susceptibility of the animals to sporotrichosis infection. Also, we hint at a possible role for IL-10 in

favoring the establishment of infection and for TNF- α in animal recovery. Alongside the possible NO-induced apoptosis of macrophages and reduced proliferative response of splenocytes, these findings add to current understanding of how the immune system reacts during systemic sporotrichosis. The next step should be to establish firmly the relative importance of these various factors in the fungal immune evasion and to determine the mechanisms by which the pathogen induces them.

REFERENCES

Akdis CA & Blaser K (2001) Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression. *Immunology* 103: 131-136.

Allen HL & Deepe GS (2005) Apoptosis modulates protective immunity to the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. *J. Clin. Invest* 115: 2875-2885

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

Carlos IZ, Sgarbi DBG, Angluster J, Alviano CS, and Silva CL (1992) Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the systemic form of the disease. *Mycopathologia* 117:139-144.

Carlos IZ, Sgarbi DBG, Angluster J, Alviano CS, Silva CL (1992) Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the systemic Form of the Disease. *Mycopathologia* 117: 139-144.

Carlos IZ, Sassá MF, Sgarbi DBG, Placeres MCP, Maia DCG (2009) Current Research on the Immune Response to Experimental Sporotrichosis. *Mycopathologia* v. 168, p. 1-10, 2009.

Chiapello LS, Baronetti JL, Garro AP, Spesso MF, Masih DT (2008) *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan induces macrophage apoptosis mediated by nitric oxide in a caspase-independent pathway. *International Immunology* 20(12): 1527-1541.

Chiapello LS, Baronetti JL, Aoki MP, Gea S, Rubinstein H, and Masih DT (2004) Immunosuppression, interleukin-10 synthesis and apoptosis are induced in rats inoculated with *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan. *Immunology* 113: 392-400.

Fernandes KSS, Coelho AL, Lopes-Bezerra LM, and Barja-Fidalgo C (2000) Virulence of *Sporothrix schenckii* conidia and yeast cells, and their susceptibility to nitric oxide. *Immunology* 101(4): 563-569.

Fernandes KSS, Neto EH, Brito MMS, Silva JS, Cunha FQ, and Barja-Fidalgo C (2008) Detrimental role of endogenous nitric oxide in host defense against *Sporothrix schenckii*. *Immunology* 123: 469-479.

Huang F-P, Niedbala W, Wei X-Q, Xu D, Feng G-J, Robinson JH, Lam C, and Liew FY (1998) Nitric oxide regulates Th1 cell development through the inhibition of IL-12 synthesis by macrophages. *Eur. J. Immunol.* 28: 4062-4070.

Laubach VE, Shesely EG, Smithies O, and Sherman PA (1995) Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10688-10692.

Livonesi MC, Rossi MA, Desouto JT, Campanelli AP, De Sousa RLM, Maffei CML, Ferreira BR, Martinez R, Da Silva JS (2009) Inducible nitric oxide synthase-deficient mice show exacerbated inflammatory process and high production of Th1 and Th2 cytokines during paracoccidioidomycosis. *Microbes and infection* 11:123-32.

Maia DCG, Sassá MF, Placeres MP, Carlos I (2006) Influence of Th1/ Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia* 161: 11-19.

Martins GA, Cardoso MAG, Aliberti JCS, and Silva JS (1998) Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Immunology Letters* 63: 113-120.

Martins GA, Petkova SB, Machado FS, Kitsis RN, Weiss LM, Wittner M, Tanowitz HB, and Silva JS (2001) Fas-FasL interaction modulates nitric oxide production in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *Immunology* 103: 122-129.

Nascimento FRF, Calich VLG, Rodríguez D, Russo M (2002) Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. *The Journal of Immunology* 168: 4593-4600.

Netea MG, Suttmuller R, Hermann C, Van Der Graaf CAA, Van Der Meer JWM, Van Krieken JH, Hartung T, Adema G, Kullberg, BJ (2004) Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *The Journal of Immunology* 172: 3712-3718.

Ramos-E-Silva M, Vasconcelos C, Carneiro S, Cestari T (2007) Sporotrichosis. *Clinical Dermatology* 25(2): 181-187.

Romani L & Puccetti P (2006) Protective tolerance to fungi: the role of IL-10 and tryptophan catabolism. *TRENDS in Microbiology* 14(4): 183-189.

Taylor EL, Megson IL, Haslett C, and Rossi AG (2003) Nitric oxide: a key regulator of myeloid inflammatory cell apoptosis. *Cell death and differentiation* 10: 418-430.

Uenotsuchi T, Takeuchi S, Matsuda T, Urabe K, Koga T, Uchi H, Nakahara T, Fukagawa S, Kawasaki M, Kajiwara H, Yoshida S, Moroi Y, Furue M (2006) Differential induction of Th1-prone immunity by human dendritic cells activated with *Sporothrix schenckii* of cutaneous and visceral origins to determine their different virulence. *International Immunology* 18(12): 1637-1646.

Van Der Veen RC (2001) Nitric oxide and T helper cell immunity. Review. *International Immunopharmacology* 1: 1491-1500.

Wu-Hsieh BA, Chen W, and Lee H-J (1998) Nitric oxide synthase expression in macrophages of *Histoplasma capsulatum*-infected mice is associated with splenocyte apoptosis and unresponsiveness. *Infection and Immunity* 68(11): 5520-5526.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Nitric oxide (A) and Tumor necrosis factor alpha (B) induced during *S. schenckii* infection. Peritoneal exudate cells (5×10^6 cells/mL) were cultured with ExoAg (■) from *S. schenckii*, LPS (●) or culture medium alone (▲). Supernatants from triplicate cultures were assayed in five experiments. Significance of the differences between the control and experimental groups was accepted when $p < 0.001$.

Figure 2: Tritiated thymidine incorporation into spleen cell cultures derived from infected mice challenged with ExoAg from *S. schenckii* (■), Con-A (●) or culture medium alone (▲). The results showed a significant difference ($p < 0.05$) between the experimental and control groups during the weeks of infection.

Figure 3: IL-10 production during *S. schenckii* infection. Spleen cell culture supernatants were drawn off after 24 h stimulation with ExoAg from *S. schenckii* (■), Con-A (●) or culture media (▲), and assayed for IL-10 by ELISA. Significance of the differences between the control and experimental groups was accepted when $p < 0.001$.

Figure 4: Macrophage apoptosis. Apoptotic cells were counted by the detection of exposure of phosphatidylserine by annexin V assay in cultures of peritoneal macrophages from control group (●) and infected animals (■), visualized by fluorescence microscopy. The level of significance was set at $p < 0.001$, comparing control and experimental groups at the 4th and 6th weeks. {Label for the vertical axis : "Percentage of macrophages with annexin (%)"}

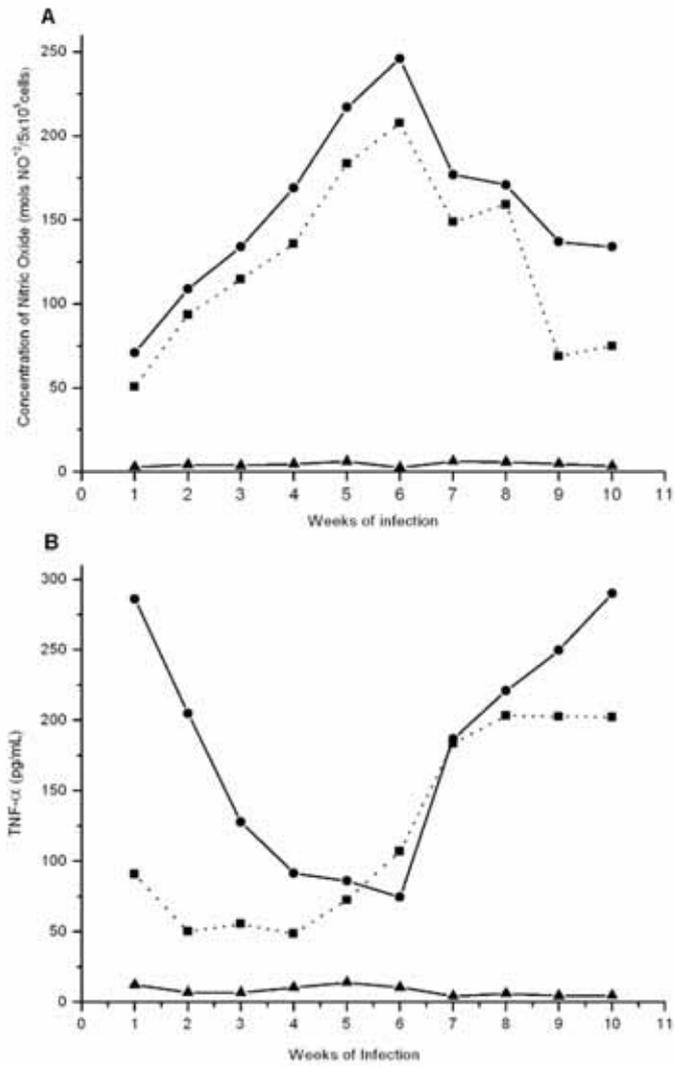


Fig. 1: Nitric oxide (A) and Tumor necrosis factor alpha (B) induced during *S. schenckii* infection. Peritoneal exudate cells (5×10^6 cells/mL) were cultured with ExoAg (■) from *S. schenckii*, LPS (●) or culture medium alone (▲). Supernatants from triplicate cultures were assayed in five experiments. Significance of the differences between the control and experimental groups was accepted when $p < 0.001$.

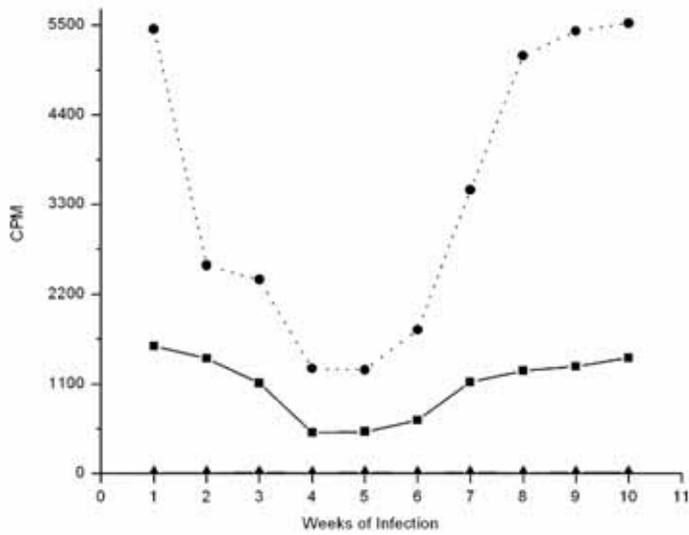


Fig. 2: Tritiated thymidine incorporation into spleen cell cultures derived from infected mice challenged with ExoAg from *S. schenckii* (■), Con-A (●) or culture medium alone (▲). The results showed a significant difference ($p < 0.05$) between the experimental and control groups during the weeks of infection.

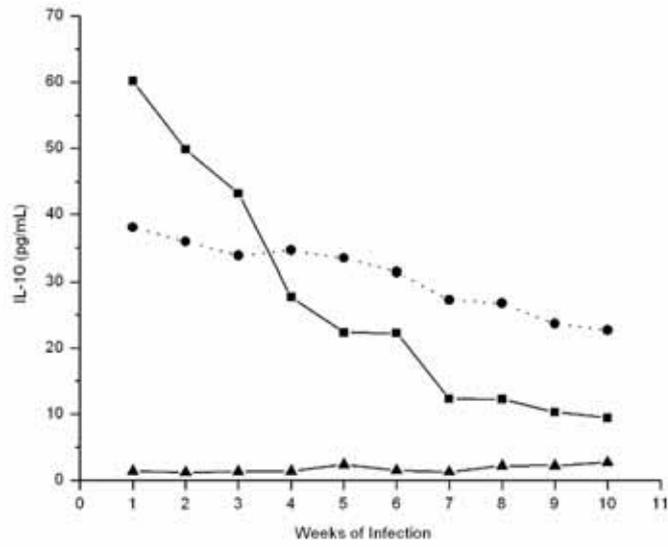


Figure 3: IL-10 production during *S. schenckii* infection. Spleen cell culture supernatants were drawn off after 24 h stimulation with ExoAg from *S. schenckii* (■), Con-A (●) or culture media (▲), and assayed for IL-10 by ELISA. Significance of the differences between the control and experimental groups was accepted when $p < 0.001$.

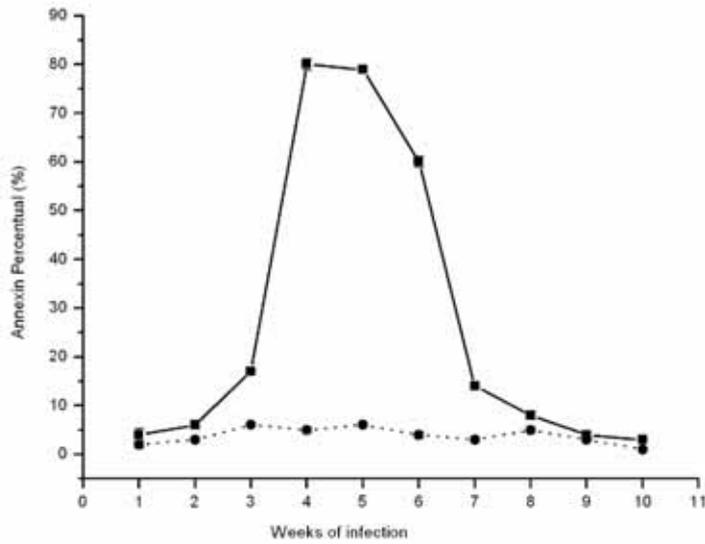


Figure 4: Macrophage apoptosis. Apoptotic cells were counted by the detection of exposure of phosphatidylserine by annexin V assay in cultures of peritoneal macrophages from control group (■) and infected animals (●), visualized by fluorescence microscopy. The level of significance was set at $p < 0.001$, comparing control and experimental groups at the 4th and 6th weeks. {Label for the vertical axis: "Percentage of macrophages with annexin (%)"}