UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Gaduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Identificação e caracterização de componentes
antigênicos proteicos secretados por
*Sporothrix schenckii***

Rosana Cícera Nascimento

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

São Paulo
2004

Rosana Cícera Nascimento

Identificação e Caracterização de Componentes Antigênicos
Proteicos Secretados por *Sporothrix schenckii*

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida
Orientador / Presidente

Dr^a. Márcia de Souza Carvalho Melhem
1^o examinador

Prof^a. Dr^a. Arlete Emily Cury
2^o examinador

São Paulo, 23 de setembro de 2004.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais,
Maria Inêz Nascimento e Otaniel Nascimento
por estarem sempre presentes em minha vida.
Por saber que posso contar com vocês. Obrigada
por cuidar de mim!*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A DEUS,

Te agradeço pela presença constante em minha vida e por ter me amparado com suas mãos misericordiosas nos momentos mais difíceis de minha vida !

À minha família,

Mais gratificante do que a conquista deste título é saber que terei com quem compartilhá-lo!

À minha tia, Maria Wilma dos Santos e seu esposo Sérgio Santana Pinto,

Sou grata pelas mãos amigas nos momentos de necessidade!

Ao Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida, meu Orientador,

Pela sua valiosa orientação, confiança, amizade e paciência durante estes anos de trabalho. Sua profunda dedicação à ciência, ensino e pesquisa são motivos de grande admiração. Minha eterna gratidão aos seus ensinamentos.

Aos colegas de pós-graduação do laboratório de Micologia Médica, Eliver Eid Bou Ghosn, Karen Spadari Ferreira, Márcia Hayakawa, Maria da Glória Teixeira de Sousa, Marina Reis de Moura Campos, Tânia Sueli de Andrade e Viviane Mazo Fávero Gimenes, pelo companheirismo, amizade e momentos divertidos durante todo este período.

À estagiária do laboratório de Micologia Clínica, Andrea Arruda, por também compartilhar a sua amizade..

À amiga Sônia Regina Caramico Buratto, técnica do laboratório de Micologia Médica, pela sua valiosa amizade, ajuda e ensinamentos necessários para a concepção deste trabalho.

Às amigas Patrícia Barco e Simone Marques Bolonhes pela convivência harmoniosa, amizade e companheirismo.

À Universidade de São Paulo, especialmete à Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas por contribuir com a formação de novos pesquisadores.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho.

" Se um homem tem um talento e não tem capacidade de usá-lo, ele fracassou. Se ele tem um talento e usa somente a metade deste, ele fracassou parcialmente. Se ele tem um talento e de certa forma aprende a usá-lo em sua totalidade, ele triunfou gloriosamente e obteve uma satisfação e um triunfo que poucos homens conhecerão ".

Thomas Wolfe

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas com o auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

SUMÁRIO

	Páginas
Lista de figuras	i
Lista de abreviaturas	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
I. Introdução	1
1.Revisão histórica	1
2.Epidemiologia	2
3. Agente etiológico	5
4. Manifestações clínicas	9
5. Diagnóstico laboratorial	11
6. Imunologia	14
II. Objetivos	19
III. Material e Métodos	20
1. Fungos	20
2. Preparação do exoantígeno	20
3. Dosagem de proteínas	21
4. SDS-PAGE das proteínas liberadas pelo <i>S. schenckii</i>	21
5. Infecção experimental com o isolado <i>S. schenckii</i> M-64	22
6.Infecção com os isolados FCF-278, FCF-280 E FCF-356	24
7 <i>Western blot</i>	24
8 Purificação de proteínas	26
9 Avaliação da resposta imune humoral contra <i>S. schenckii</i>	27
10. Ensaio de proliferação celular	28
11. Ensaio de fagocitose	31

IV. Resultados	34
1. Perfil eletroforético do exoantígeno de <i>S. schenckii</i>	34
2. Infecção experimental	35
3. Detecção de citocinas nos homogenatos de baço e fígado	36
4. <i>Western blot</i>	38
5. Purificação da proteína antigênica de <i>S. schenckii</i>	40
6. Produção de anticorpos anti- <i>S. schenckii</i>	41
7. Ensaio de proliferação celular	45
8. Ensaio de fagocitose	48
V. Discussão	50
VI. Conclusões	57
VII. Referências Bibliográficas	59
Anexos	

LISTA DE FIGURAS

Páginas

Figura 1: Perfil eletroforético do exoantígeno de <i>S. schenckii</i> M-64.....	34
Figura 2: Carga fúngica nos órgãos dos animais infectados com <i>S. schenckii</i> M-64.....	35
Figura 3: Níveis de citocinas produzidas nos órgão dos animais infectados com <i>S. schenckii</i> . M-64.....	37
Figura 4: <i>Western blot</i> dos soros dos camundongos infectados com o isolado de <i>S. schenckii</i> M-64.	38
Figura 5: <i>Western blot</i> com os soros dos camundongos infectados com outro isolados <i>S. schenckii</i>	39
Figura 6: SDS-PAGE da proteína imunorreativa de 70kDa.	40
Figura 7: Produção de anticorpos totais anti-exoantígeno de <i>S. schenckii</i> detectados por ELISA.	41
Figura 8: Produção de anticorpos totais anti-proteína de 70kDa detectados por ELISA.	42
Figura 9: Isotipagem de IgG produzidas contra o exoantígeno de <i>S. scnhenckii</i>	43
Figura 10: Detecção dos isotipos de IgG produzidos contra a proteína de 70 kDa.	44
Figura 11: Capacidade proliferativa de células totais de linfonodos de animais imunizados com <i>S. schenckii</i>	45
Figura 12: Capacidade proliferativa de células totais de linfonodos de animais imunizados com exoantígeno.	46
Figura 13: Proliferação de células totais de linfonodos de camundongos imunizados com a proteína de 70 kDa.	47
Figura 14: Índice de fagocitose de macrófagos.	48
Figura 15: Fagocitose de leveduras de <i>S. schenckii</i> pelos macrófagos.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
KOH	solução de potássio
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
IL	Interleucina
Th	linfócitos T <i>helper</i>
NO	Óxido nítrico
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
IFN	<i>Interferon</i>
INOS	Óxido nítrico sintase
kDa	kilo Dalton
CBB	<i>Coomassie Brilliant Blue</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecylsulfate - poli-acrylamide gel electrophoresis</i>
Da	Dalton
SPF	<i>Specific Patogens Free</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
rpm	rotações por minuto
Ig	Imunoglobulina
Mab	<i>Monoclonal antibody</i>
ConA	Concanavalina A
CO₂	Dióxido de carbono
NK	<i>Natural Killer</i>
Aids	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>

RESUMO

Camundongos da linhagem BALB/c foram infectados com 5×10^6 leveduras de *S. schenckii* e acompanhados durante vinte e oito dias de infecção. Através da contagem do número de UFC nos baços e figados verificou-se que a carga fúngica nos órgãos dos animais diminui drasticamente na segunda semana de infecção. O teste de ELISA revelou que nos órgãos destes animais a citocina IL-10 foi produzida em níveis mais elevados durante toda a infecção, assim modulando o controle da infecção. O padrão de proteínas secretadas pelas células leveduriformes de *S. schenckii* quando cultivadas em meio de cultura líquido e visualizado através de SDS-PAGE, apresentou bandas com pesos moleculares entre 97kDa e 20,1 kDa. Uma banda de 70 kDa foi reconhecida pelos soros dos animais infectados somente após a segunda semana de infecção e persistiu até o final desta. Os níveis de Ig total produzidos contra o antígeno solúvel e a proteína de 70 kDa aumentaram na segunda semana de infecção e os títulos mantiveram-se durante a infecção. A isotipagem dos anticorpos revelou a predominância dos isotipos IgG1 e IgG3 para os dois antígenos testados. Notou-se que o aumento dos níveis de Ig contra o exoantígeno e a proteína imunorreativa de 70kDa, assim como o reconhecimento desta proteína, ocorreu inversamente proporcional à diminuição da carga fúngica nos órgão dos animais infectados. As proteínas secretadas pelas leveduras de *S. schenckii*, principalmente a proteína de 70 kDa, são capazes de ativar uma resposta humoral e conseqüente produção de altos níveis de anticorpos e inibir a fagocitose do fungo pelos macrófagos. Desta maneira, estes antígenos modulam a resposta imune na esporotricose e contribuem para a patogenicidade do fungo.

ABSTRACT

BALB/c mice had been infected with 5×10^6 yeasts of *S. schenckii* and followed during twenty and eight days of infection. Through the counting of the number of UFC in the livers and spleens it was verified that the fungal load in the organs of the animals decreased drastically in the second week of infection. The ELISA test disclosed that in the organs of these animals the cytokine IL-10 was produced in levels more raised during all the infection, thus modulating the control of the infection. The protein standard secreted for the yeasts of *S. schenckii* when cultivated in liquid medium and visualized through SDS-PAGE, it presented bands with molecular weights between 97 and 20,1 kDa. A band of 70 kDa was recognized for the sera of the infected animals after the second week of infection and persisted until the end of this. The levels of total Ig produced against the exoantigen and the protein of 70 kDa had increased in the second week of infection and the titers had been remained during the infection. The isotyping of the antibodies disclosed the predominance of the IgG1 and IgG3 for two tested antigens. One noticed that the increase of the levels of Ig against antigens and the recognition of the protein of 70 kDa occurred parallel with the reduction of the fungal load in the organs of the infected animals. The proteins secreted by the yeasts of *S. schenckii*, mainly the protein of 70 kDa, they are capable to activate a humoral response and consequent production of high levels of antibodies and to inhibit phagocytosis of the fungi for the macrophages. In this way, these antigens modulate the immune response in sporotrichosis and contribute for the pathogenic potential of fungi.

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

1. Revisão histórica

Sporothrix schenckii é um fungo amplamente distribuído na natureza, encontrado no solo, em plantas e vegetais em decomposição. A inoculação traumática de hifas e conídios do fungo diretamente na pele, resulta em micose crônica, denominada esporotricose que afeta os tecidos cutâneo e subcutâneo com freqüente comprometimento linfático ⁽¹⁾.

A esporotricose foi relatada, primeiramente, por Benjamin Schenck em 1898 no Hospital Johns Hopkins em Baltimore, incluindo descrição clínica minuciosa da doença e subsequente isolamento do patógeno pelo micologista Erwin Smith que o identificou como espécie relacionada ao gênero *Sporotrichum*. Em 1900, Hektoen & Perkins relataram o segundo caso desta micose, envolvendo um garoto que desenvolvera lesão no dedo após tê-lo atingido por um martelo. Após isolamento do fungo, esses autores verificaram que se tratava do mesmo agente descrito por Schenck, porém o nomearam de *Sporothrix schenckii*. No entanto, este binômio foi utilizado em poucos relatos ^(2, 3).

No início do século XX, a esporotricose era doença comum na França. Numa série de relatos realizados pelos estudiosos da época foram, descritas desde formas cutâneas da micose, que eram as mais comuns, até as generalizadas, sendo estas muito raras. Para o tratamento desta micose, Sabouraud, em 1903, sugeriu aos pesquisadores Beurmann e Gougerot o uso de iodeto de potássio, terapia que até hoje é utilizada. No Brasil, Adolpho Lutz & Splendore em 1907 foram os primeiros a relatar o aparecimento da esporotricose em animais, ao isolarem o patógeno da mucosa oral de ratos ^(4, 5).

No ano seguinte, Splendore estudando a doença numa mulher italiana que havia imigrado para o Brasil e que apresentava lesões faciais, descreveu uma estrutura radiada ao redor das células leveduriformes de *S. schenckii* no tecido, a qual denominou de corpo asteróide. Esta se tornou muito útil na identificação deste microorganismo ⁽⁶⁾.

Diversas epidemias envolvendo este patógeno já foram relatadas, a maior delas ocorrendo entre os anos de 1941 e 1944 na África do Sul, e que acometeu cerca de 3000 trabalhadores de uma mineradora na cidade de Witwatersrand; foi controlada mediante aplicação de substâncias antifúngicas nas vigas de madeira da mina, as quais estavam colonizadas pelo *Sporothrix schenckii*, e também empregando iodeto de potássio como terapia aos trabalhadores afetados ⁽⁷⁾.

Numerosas tentativas para classificar e nomear esse microrganismo seguiram-se até que, Davis em 1921, estudando os isolados fúngicos dos casos da França e das Américas concluiu que estes eram idênticos e nomeou o agente etiológico como *Sporothrichum schencki*. No entanto, Carmichael, em 1962, comparando as espécies dos gêneros *Sporothrichum* e *Sporothrix* observou diferenças na esporulação entre estes, recomendando o uso do nome *Sporothrix schenckii*, publicado por Hektoen e Perkins, como o correto para o patógeno causador da esporotricose, sendo essa denominação revalidada por Nicot e Mariat em 1973 ^(8, 9).

2. Epidemiologia

Amplamente encontrada no mundo, a esporotricose ocorre com maior frequência em áreas de clima tropical úmido e temperado. Na atualidade, tem sido frequentemente relatada nas Américas do Norte e Sul, África do Sul e Japão ⁽¹⁰⁾.

A distribuição geográfica e a incidência desta micose sofreram mudanças desde seus primeiros relatos. Nas duas primeiras décadas

do século XX, era comum na Europa, em especial na França, onde foram diagnosticados 250 casos e hoje é raras vezes encontrada. Nos Estados Unidos, onde se registraram os primeiros casos de esporotricose, e que até 1932, ocorreram menos de 200 casos diagnosticados. No Japão, o número de casos cresce gradualmente, fato, em parte sendo atribuído ao melhor preparo médico para o diagnóstico ^(11, 12, 13).

A esporotricose tem sido relatada como a mais freqüente das micoses subcutâneas em países como o México, onde a precipitação pluvial é muito baixa. A doença é endêmica no Brasil, Uruguai e África do Sul em regiões úmidas; também há registros de áreas altamente endêmicas na Guatemala e no Peru ^(14, 15, 16).

Embora seja de distribuição geográfica cosmopolita, é possível observar que, mesmo dentro de áreas endêmicas, sua incidência e distribuição não são homogêneas. No Brasil, entre os anos de 1945 e 1954 no Hospital das Clínicas de São Paulo, foram diagnosticados 104 casos de esporotricose. Relacionando-a com às demais dermatoses esta teve uma freqüência de 0,5%. Em Botucatu (SP), houve registro de 53 casos da doença entre 1976 e 1995¹. No Rio Grande do Sul, Londero & Ramos relatam que 195 casos dessa micose foram diagnosticados, considerando-a como a mais comum de localização subcutânea. Entretanto, Lopes *et al.* observaram que ocorreu um decréscimo na ocorrência desta micose nesse estado entre 1988 e 1997, quando foram registrados apenas 31 casos da doença ^(17, 18, 19, 20).

As diferenças na distribuição parecem estar relacionadas à exposição ao *S. schenckii* e à atividade profissional. Há um grande número de casos entre caçadores de tatus no Uruguai, embora os animais não sejam portadores do fungo. Este pode ser isolado do solo de suas tocas. No Japão, 30% dos casos envolvem agricultores e na Guatemala, 45,3% dos casos foram descritos entre pescadores. Nos países de clima temperado, como Estados Unidos, França e Canadá,

as infecções ocorrem em indivíduos que realizam trabalhos com solo, por exemplo, a jardinagem ^(21, 13, 15, 22).

Estudos epidemiológicos, utilizando o teste cutâneo com esporotriquina mostram variações no índice de infecção em diferentes populações. É possível observar positividade naquelas populações (2,5%) que já foram expostas à doença, porém, nas que nunca tiveram contato com a esporotricose o mesmo não ocorre. No Brasil, onde a esporotricose é endêmica, a porcentagem de positividade no teste intradérmico varia conforme as áreas estudadas, como pode ser visto nos Estados de São Paulo (23,8%), Amazonas (47,56%) e Minas Gerais (13,91%) ⁽²³⁾.

Analisando-se os fatores envolvidos na aquisição da doença nota-se que a atividade profissional dos indivíduos afetados é um dos principais determinantes na aquisição da esporotricose cutânea. A maioria destes indivíduos exerce atividades diretamente ligadas ao solo e à vegetação, tais como jardinagem, agricultura, mineração, carpintaria etc. No entanto, nas manifestações extracutâneas da micose não se encontra associação entre a doença e a atividade ocupacional, mas sim fatores predisponentes como alcoolismo, transplante de órgãos, *diabetes mellitus* e imunodeficiências ^(24, 25).

A incidência da doença entre os sexos também está diretamente relacionada ao tipo de manifestação clínica. Em geral, nos pacientes que apresentam a forma cutânea, a proporção entre homens e mulheres é de 1:1, aumentando em 6:1 nas formas extracutâneas, tais como pulmonares e osteoarticulares ⁽⁷⁾.

A esporotricose acomete indivíduos em todas as faixas de idade, e as infecções primárias podem ser encontradas em crianças com menos de 10 anos de idade, e em adultos com 80 - 90 anos. No Japão, a incidência maior encontra-se entre crianças (15% dos casos relatados) e adultos com menos de 30 anos. Nestes as lesões são mais freqüentes nos membros superiores sendo a face a região corpórea mais acometida entre as crianças. No México 60% dos casos

ocorrem em adultos jovens, e áreas do corpo expostas a traumas são as mais acometidas, como face e membros superiores e inferiores ^(26, 12, 27).

A variação na incidência ocorre em diferentes períodos e países, sugerindo que o clima, a temperatura, a atividade profissional e a exposição ao fungo sejam fatores determinantes na distribuição da esporotricose em diferentes populações.

S. schenckii é comumente encontrado em associação com matéria vegetal em decomposição, e freqüentemente isolado do solo sob determinadas condições de temperatura e umidade ^(21, 28).

No entanto, pela sua ampla distribuição geográfica, o fungo pode ser isolado em diferentes condições climáticas, desde estações secas e frias como no México, até as mais chuvosas e quentes como acontecem no Uruguai. Findlay *et al.* realizaram um estudo na África do Sul, na região onde ocorreu a epidemia na mina de ouro, descrevendo que o fungo cresce em temperaturas ótimas entre 26°C - 27°C e umidade relativa de 92% - 100% ^(27, 29, 28).

Este microorganismo já foi isolado de animais como gatos, antas e cavalos. Segundo Sampaio, mordeduras e/ou arranhaduras ou até mesmo picadas de insetos podem veicular a doença; nesses casos, os animais atuam apenas como transportadores mecânicos dos conídios de *S. schenckii*. Já a associação saprofítica deste patógeno com plantas pode ser observada após o desenvolvimento de lesões ocasionadas por traumatismos com fragmentos vegetais, como espinhos, palha, gravetos, lascas de madeira etc ^(30, 17, 11).

3. Agente etiológico

Sporothrix schenckii Hektoen et Perkins, 1900, é fungo dimórfico térmico, apresentando-se na natureza e quando incubado às temperaturas entre 19°C e 30°C na forma miceliana. No tecido hospedeiro, ou quando cultivado a 37°C, na forma de levedura. O

estado teleomorfo de *S. schenckii* ainda não foi encontrado. Em estado anamorfo enquadra-se na seguinte classificação ⁽³¹⁾:

Reino: *Fungi*

Filo: *Ascomycota*

Classe: *Eurascomycetes*

Ordem: *Ophiostomatales*

Família: *Ophiostomataceae*

Gênero: *Sporothrix*

Espécie: *schenckii*

Em ágar-Sabouraud à temperatura ambiente, os isolados de *S. schenckii* produzem colônias úmidas de aspecto leveduriforme, coriáceas, com sulcos e dobras na superfície, não se tornando flocosas ou algodonosas, apresentando, a princípio tonalidades de branco a creme, com alguns isolados em tons castanho-escuros a negras ⁽³²⁾.

As hifas (1-2µm de diâmetro) são hialinas, delgadas, ramificadas e com septos; os conidióforos erguem-se em ângulo reto, em cujo ápice desenvolve-se uma vesícula com denticulos dispostos simpodialmente e em cada denticulo nasce um conídio. Estes ficam reunidos em disposição floral (aspecto de margarida). As colônias escuras produzem dois tipos de conídios: os hialinos, ovais e com paredes celulares finas (2-3µm x 3-6 µm), produzidos no ápice do conidióforo. Os conídios escuros, de paredes espessas, esféricos a ovais (2-4µm), são produzidos, principalmente, ao longo das hifas em curtos denticulos; e sua coloração é devida à presença de melanina na sua parede ⁽⁷⁾.

À temperatura de 37°C em ágar BHI acrescido ou não de tiamina, o fungo cresce como levedura, apresentando colônias de consistência mole, coloração branca a creme e com superfície irregular. A morfologia microscópica revela blastoconídios ovais a globosos (1-3µm), alguns apresentando brotamentos múltiplos ⁽³²⁾.

A reprodução por brotamento é característica das células leveduriformes de *S. schenckii* nos tecidos parasitados, ou quando cultivado em meios sintéticos ricos, como ágar BHI. Segundo Garrison *et al.*, ocorrem dois eventos distintos no processo de transformação de micélio para levedura, que são: **i)** condensação do volume citoplasmático da hifa e subsequente formação de septos, formando oidia fragmentado e este se reproduz por brotamento originando o blastoconídio; **ii)** alguns blastoconídios são originados através de brotamentos diretos da hifa ⁽³³⁾.

A virulência do fungo *S. schenckii* está associada aos componentes de sua parede celular como as proteínas e glicoproteínas. Destas são extraídos os principais polissacarídeos encontrados na parede celular, a galactomana e a raminomanana. As galactomananas são isoladas de inúmeros fungos, contudo, as raminomananas não são encontradas em outras espécies patogênicas ao homem ^(34, 35).

Estudos consideram que a relação raminose: manose contida na parede celular dos conídios e blastoconídios correlaciona-se com a virulência. Assim, conídios mais virulentos, capazes de causar infecção aguda com alta mortalidade em modelos experimentais, apresentam quantidades altas de raminose e baixa de manose, comparados com conídios menos virulentos, que causaram doenças menos severas e com maior taxa de sobrevivência. Os blastoconídios de *S. schenckii*, principais formas infectantes *in vivo*, contêm em sua parede celular a mesma relação raminose: manose encontrada nos conídios mais virulentos. Travassos *et al.*, isolaram raminomanana dos blastoconídios e do meio de cultura de *S. schenckii*, sugerindo que esse polissacarídeo seja também excretado pelo fungo ^(36, 37, 38).

Embora tenha sido relatado que os polissacarídeos presentes na parede celular ou secretados pelo *S. schenckii* sejam principalmente raminose, manose e galactose, ocorrem variações nas concentrações em que são encontrados. Essas variações parecem estar

correlacionadas com a morfologia e o tempo de cultivo do fungo. Este aspecto foi estudado por Takada & Ishizaki em culturas com dois, sete e catorze dias em meio líquido. A partir destas, foram identificadas as formas miceliares, conídios e células leveduriformes respectivamente; quanto à proporção dos polissacarídeos raminose e manose, também ocorreram variações, sendo que a raminose foi encontrada em maior quantidade nas culturas de dois dias. Dados semelhantes foram encontrados por Fernandes *et al.* ^(39, 36).

Tanto as glicoproteínas, excretadas pelas células, quanto o ácido siálico, presente na parede celular das células leveduriformes de *S. schenckii* neutralizam os anticorpos e são tóxicos para os macrófagos. Além disso, impedem a fagocitose de leveduras não opsonizadas. Portanto, representam importantes fatores de virulência deste patógeno ⁽⁴⁰⁾.

Embora *S. schenckii* seja um fungo hialino, em isolados recentes freqüentemente se observam colônias de coloração marrom a negras, devido à produção de melanina pelos conídios. Além dos conídios, células leveduriformes também apresentam a capacidade de formar melanina. Este pigmento representa importante fator de virulência de diversos fungos patogênicos, incluindo *S. schenckii*, pois conídios produtores de melanina são mais resistentes à fagocitose e aos compostos oxidativos que atuam como microbicidas ^(41, 42, 43).

Uma outra molécula presente na parede celular das leveduras de *S. schenckii* e que também pode estar relacionada à virulência é o ergosterol. Este é capaz de reagir com o H₂O₂, produzido pelo *burst* respiratório, formando peróxido de ergosterol, o qual age como um mecanismo protetor para as células leveduriformes, ou seja, um mecanismo de evasão ⁽⁴⁴⁾.

A aderência do patógeno aos tecidos é um fator essencial para que ocorra a sua disseminação. Diversos componentes da parede celular de fungos patogênicos, tais como as proteínas (tipo integrinas) e as manoproteínas, já foram relacionados ao processo de adesão.

Como mencionado, os componentes da parede celular de *S. schenckii* agem de muitas maneiras, contribuindo com a virulência deste fungo; Lima *et al.*, demonstraram que as leveduras e os conídios de *S. schenckii* podem se ligar aos componentes da matriz extracelular, como fibronectina, laminina e colágeno tipo II, desta maneira participando na adesão deste microrganismo aos tecidos. Proteinases produzidas extracelularmente, denominadas proteinases I e II, apresentam a propriedade de hidrolizar o extrato córneo, colágeno e elastina e desta forma também contribuem para a disseminação do fungo ^(34, 45, 46).

4. Manifestações clínicas

Segundo Lacaz, após a cura clínica da esporotricose o teste intradérmico com esporotriquina ainda se apresenta positivo; em pacientes não-portadores da doença também é possível observar reações positivas, e estas não devem ser ignoradas, pois podem significar contágio prévio (imuno-alergizante) com *S. schenckii*, revelando a existência de uma esporotricose-infecção ⁽²³⁾.

Em áreas altamente endêmicas indivíduos sem sinais clínicos da doença apresentam reações de hipersensibilidade à esporotriquina, contrastando com a negatividade encontrada em áreas onde esta micose nunca foi relatada ⁽¹¹⁾.

A doença apresenta caráter crônico e polimórfico, revelando que as formas clínicas e a patogênese dependem do sítio de inoculação do fungo e da resposta imunológica do hospedeiro. Sendo assim, diversas são as classificações encontradas para a esporotricose. No entanto, as manifestações clínicas da doença podem ser divididas em três categorias, que são: Esporotricose cutânea, Esporotricose linfocutânea e Esporotricose extracutânea.

Esporotricose cutânea

Na forma cutânea, as lesões limitam-se ao local de inoculação do fungo e podem se apresentar como lesões verrucosas, acneiformes,

placas eritematosas, crostosas, maculosas ou pápulas. Como não há o envolvimento linfático local, permanecem como lesões “fixas”. As áreas corpóreas mais freqüentemente acometidas são face, pescoço, tronco e membros ⁽¹¹⁾.

Este tipo clínico da esporotricose é encontrado em 93% das regiões endêmicas, variando entre 40% - 60% dos casos relatados, como se observa no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. No Japão onde, respectivamente, 45% e 56,7% dos casos manifestaram-se como forma cutânea-fixa, com maior comprometimento da face e dos membros, sendo comum em mulheres e crianças ⁽¹³⁾.

As lesões iniciam no local de inoculação do fungo, e esta pode ser através de traumatismos diversos com fragmentos de vegetais, arranhaduras de animais ou até pelo próprio paciente que pode contaminar ferimentos com conídios presentes nas unhas das mãos ⁽²¹⁾.

Na maioria dos casos a cura é espontânea, mas quando isso não ocorre, o tratamento tópico com substâncias antifúngicas e até mesmo termoterapia são eficientes na resolução da doença ⁽⁴⁷⁾.

Esporotricose linfocutânea

A freqüência da esporotricose linfocutânea é semelhante à forma cutânea, encontrando variações entre as regiões estudadas. Pappas *et al.*, registram 55% de casos no Peru e Itoh *et al.* 54% no Japão; já no México, 82% dos pacientes apresentam esta forma clínica ^(48, 49, 50).

A forma linfocutânea da esporotricose desenvolve-se a partir de uma lesão inicial papular eritematosa. Em seguida, ocorre o desenvolvimento de um nódulo subcutâneo ulceroso, que tende à necrose, conhecido como cancro esporótrico. A evolução da doença se dá com o aparecimento de uma linfangite nodular, no tronco linfático. Segundo Lacaz, os gânglios regionais também podem ser atingidos ^(11, 23).

As lesões secundárias que se desenvolvem ao longo do canal linfático são semelhantes às iniciais, com o centro violáceo e ulceroso; as lesões não ulcerosas podem se apresentar com o epitélio avermelhado, brilhante, liso ou verrucoso, e a pele entre as lesões nodulares também pode se tornar ulcerosas, sendo comum a cronicidade nestes casos da doença ⁽⁸⁾.

Os traumas iniciais que veiculam o patógeno podem ser provocados por animais, vegetais ou objetos em contato com solo contaminado, havendo registros de casos em agricultores, pescadores e jardineiros; indivíduos que não exercem atividades ocupacionais de risco também podem ser acometidos, como por exemplo, as crianças ⁽⁸⁾.

Esporotricose extracutânea

Embora seja uma micose cutânea, o agente pode invadir outros órgãos, sendo a doença denominada de esporotricose extracutânea. Esta resulta da disseminação hematogênica do fungo a partir de um foco de inoculação primário ou inalação dos conídios. É encontrada com maior frequência em pacientes imunocomprometidos como diabéticos, alcoólatras, transplantados de medula óssea, com doença pulmonar crônica, ou aqueles com neoplasia hematológica. Atualmente, em pacientes com Aids é relatada como infecção oportunista ^(52, 50, 45).

Ocorrendo disseminação para outros órgãos a esporotricose pode se apresentar sob diversas formas clínicas, dependendo da área atingida. Encontram-se relatos de sinusite, meningite, endofitalmite, laringite, comprometimento osteoarticular e pulmonar; fungemia por *S. schenckii* também pode ocorrer ^(53, 54, 25, 55, 56, 57, 58, 14).

5. Diagnóstico laboratorial

O exame direto realizado com KOH (20%-40%) não é empregado como rotina para o diagnóstico da esporotricose por

apresentar baixa sensibilidade. As células leveduriformes podem, eventualmente, ser visualizadas em materiais biológicos, como pus retirado das lesões e biópsias, corados pelo método de Gram ou Giemsa ⁽²³⁾.

As formas parasitárias nos tecidos podem ser mais facilmente visualizadas pelas colorações de hematoxilina-eosina, ácido periódico de Schiff e Grocott-Gomori, apresentando-se sob formas esféricas, ovais e alongadas (2-6 μm de diâmetro) ou em forma de “navetas” ⁽⁷⁾.

A observação das reações inflamatórias e algumas características do fungo no tecido são fatores que levam o laboratorista ao diagnóstico da esporotricose. O exame histopatológico revela, em geral, que o granuloma causado pelo *S. schenckii* pode apresentar três zonas distintas: **i)** centro com abscessos ou necrótico (zona central), em seguida **ii)** área com inflamação granulomatosa formada por células epitelióides gigantes (zona tuberculóide) e **iii)** halo linfoplasmocitário, com tecido de granulação e fibrose (zona sífilóide). As formas parasitárias são pequenas (2-6 μm) apresentam-se, em geral, esféricas, ovaladas e alongadas em forma de naveta ou charuto, não apresentando, usualmente, brotamentos; os corpos asteróides (fenômeno Splendore-Hoeppli) podem ser visualizados ⁽²³⁾.

O diagnóstico laboratorial da esporotricose é realizado pelo isolamento do *S. schenckii* de amostras clínicas, tais como tecido obtido por biópsia ou pus das lesões, semeadas em meios de cultura clássicos (ágar-Sabouraud, acrescido ou não de antibióticos) e incubados a 25°C - 30°C. As culturas de *S. schenckii* desenvolvem-se a partir da primeira semana de incubação como colônias brancas de textura glabrosa, podendo adquirir uma tonalidade de marrom a preta com o passar do tempo. Microscopicamente, as hifas são hialinas, septadas, e os conídios dispostos, simpodialmente, em arranjo de rosetas, no ápice dos conidióforos, ou ao longo das hifas.

Embora a fase leveduriforme, obtida a 37°C, não apresente características morfológicas úteis na identificação do fungo, a demonstração do dimorfismo é importante ^(59, 11).

O isolamento do patógeno e sua subsequente identificação, associado à confirmação do dimorfismo térmico são suficientes para o diagnóstico confirmatório da esporotricose. Assim, técnicas imunológicas não são empregadas como rotina diagnóstica para esta micose, mas alguns estudos revelam que técnicas como imunodifusão, soroaglutinação, imunoeletroforese, entre outras, mostraram bons resultados no estudo sorológico desta micose ⁽⁷⁾.

Suspensão de colônias de *S. schenckii* nas formas micelianas e leveduriformes foram empregadas em testes de soroaglutinação. Frente a soro de pacientes com esporotricose, foram obtidos resultados satisfatórios. Soros diluídos em 800 e 60 apresentaram reação positiva contra os antígenos miceliares, respectivamente, durante infecção ativa e após a cura da doença. Quando se utiliza antígeno leveduriforme é possível observar reatividade em títulos de 2 e 16, mostrando sensibilidade e especificidade neste método ⁽²³⁾.

A técnica de imunodifusão é de fácil execução e apresenta grande especificidade no diagnóstico das diversas formas clínicas da esporotricose, além de baixa reação cruzada com soros de pacientes com outras infecções, tais como cromoblastomicose e leishmaniose ⁽⁶⁰⁾.

No Uruguai, Casserone *et al.* identificaram duas bandas de migração anódica na técnica de imunoeletroforese, que denominaram de S₁ e S₂; de Albornoz *et al.* utilizaram preparado antigênico da fase miceliana de *S. schenckii* na mesma técnica e também verificaram a presença de uma banda S, e referiram-se a ela como específica para o patógeno, pois o soro que apresentou esta banda não reagiu com antígenos fúngicos heterólogos ^(61, 60).

A grande maioria dos estudos sorológicos na esporotricose é realizada em casos clínicos de esporotricose cutânea ou linfocutânea,

mas também podem ser empregadas em casos disseminados da doença. As técnicas de ELISA e aglutinação com partículas de látex adsorvidas com antígeno podem ser utilizadas no diagnóstico de meningite por *S. schenckii* ⁽⁶²⁾.

Muito utilizado em estudos epidemiológicos, o teste cutâneo com esporotriquina também pode auxiliar no diagnóstico da esporotricose, uma vez que indivíduos nunca expostos ao fungo apresentam reação negativa; no entanto, reações positivas devem ser analisadas com cuidado, pois indivíduos que residem em áreas endêmicas, mas não têm quaisquer manifestações clínicas da doença reagem positivamente ao teste ^(23, 63).

Embora os estudos empregando diferentes técnicas para o imunodiagnóstico da esporotricose tenham sido realizados, atualmente elas não são empregadas, pois não há padronização de antígenos, metodologia e reagentes disponíveis ⁽⁷⁾.

6. Imunologia

A interação de fungos patogênicos com hospedeiros aparentemente imunocompetentes e imunossuprimidos durante o processo de infecção foi amplamente estudada. Também têm sido pesquisados os mecanismos desenvolvidos pelo hospedeiro para combater estes patógenos e a capacidade destes em causar doenças.

Diversos aspectos clínicos relatam que a imunidade mediada por células pode ser o principal mecanismo de defesa nas micoses, determinando a evolução da infecção. Isto pode ser evidenciado em duas ocasiões: **i)** pacientes que apresentam imunodeficiência, adquirida ou congênita, envolvendo principalmente a imunidade celular, desenvolvem infecções micóticas mais severas e progressivas; **ii)** pacientes aparentemente imunocompetentes quando desenvolvem infecções severas, o fazem diante de resposta imune celular deficiente geralmente, associada à resposta humoral ativa. No entanto, os estudos da imunidade anti-*Candida* e anti-*Cryptococcus* demonstram

que tanto a resposta adaptativa humoral quanto a imunidade inata, estão envolvidas na defesa contra estes patógenos e de modo relacionado com a imunidade celular; ou seja, tanto a resposta imune adaptativa (humoral e celular) quanto a resposta inata participam na eliminação de fungos patogênicos ^(64, 65).

Os mecanismos imunológicos envolvidos no controle e prevenção da infecção por *S. schenckii* foram extensivamente estudados, porém não estão completamente elucidados. Podem envolver resposta imune celular e/ou humoral. Plouffe *et al.* estudando a resposta imune celular em indivíduos com as formas extracutânea e cutânea da esporotricose, verificaram que a imunidade celular estava prejudicada naqueles pacientes que manifestavam a esporotricose extracutânea, e o mesmo não ocorria nos pacientes com a forma cutânea-fixa. Em animais experimentalmente infectados com células leveduriformes de *S. schenckii*, Carlos *et al.* relataram que a doença desenvolveu-se sistemicamente e a resposta imune celular apresentava-se deficiente no mesmo período em que se observava piora na infecção. Esse achado demonstrou a participação da resposta celular na defesa contra a esporotricose ^(66, 67).

A transferência adotiva de células esplênicas ativadas ou não conferem maior resistência à infecção por *S. schenckii*, sendo as primeiras mais efetivas. Da mesma maneira, a imunização ativa de camundongos com células fúngicas é capaz de conter a doença. Dickerson *et al.* depois de transferirem timócitos normais para camundongos suscetíveis (*nude*) verificaram que os animais tornaram-se resistentes à infecção. Contudo, a imunização passiva com anticorpos específicos contra *S. schenckii* não aumentou a resistência em modelos experimentais ^(68, 69, 70).

De acordo com os estudos, acima relatados, torna-se evidente a importância da imunidade celular na defesa do hospedeiro na esporotricose. Porém, quais seriam as populações celulares

responsáveis e quais os mecanismos envolvidos neste processo? Sugere-se que os linfócitos T sejam críticos neste processo, uma vez que a transferência adotiva de células linfóides confere aos animais *nude* resistência ao patógeno. As populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ já foram descritas como protetoras em modelos murinos de candidíase. Na esporotricose experimental em camundongos BALB/c, as células T CD4⁺ participam na resistência adquirida contra *S. schenckii*, mas as T CD8⁺ são negligentes neste evento. Entretanto, células T CD8⁺ são encontradas nas formações granulomatosas da esporotricose, juntamente com populações de linfócitos T CD4⁺. Tanuma *et. al.* relatam que 1,5% dos linfócitos presentes numa lesão granulomatosa de esporotricose são constituídas por células T CD4⁺ e T CD8⁺, e que a modulação desses eventos dependem da atividade da resposta do tipo Th1; pois, mesmo que seja detectada a citocina IL-10, não ocorre expressão de IL-4, citocina característica da resposta tipo Th2 (71, 72, 70, 73, 74).

Além dos linfócitos, células fagocíticas também estão envolvidas no controle da doença. Neutrófilos e monócitos humanos podem fagocitar e destruir células leveduriformes de *S. schenckii*. Nos estágios iniciais da infecção, logo após a entrada do patógeno no organismo e quando não são encontrados células T e macrófagos ativados, os leucócitos polimorfonucleares controlam a doença, através da fagocitose, mas com pouca ação do metabólito oxidativo - H₂O₂. Os macrófagos são capazes de fagocitar e matar leveduras opsonizadas ou não, uma vez que possuem receptores na sua superfície para galactomanana e raminomana que estão na parede celular destas células fúngicas; Shiraish *et al.* demonstraram que macrófagos ativados têm atividade microbicida, contribuindo, deste modo, para a resistência contra este patógeno (75, 76, 77, 40, 68).

É de amplo conhecimento que a eliminação de microrganismos pelos macrófagos depende tanto da fagocitose, quanto dos agentes tóxicos liberados durante este evento, tais como os intermediários

reativos de oxigênio e hidrogênio. Entretanto, a ativação de macrófagos pelas células T CD4⁺ é relevante para que possam desempenhar suas funções fungicidas contra *S. schenckii*. Na esporotricose, diferenças no grau de citotoxicidade mediada pelos macrófagos são dependentes da morfologia do fungo. As formas mais virulentas (conídios e leveduras) são mais resistentes aos efeitos fungicidas dos macrófagos e estes estão relacionados à produção de NO e também TNF- α (78, 79).

Na esporotricose, as citocinas envolvidas na imunidade contra o patógeno parecem atuar de diversas maneiras. Macrófagos ativados por IFN- γ produzem maior quantidade de NO, sendo mais eficientes na morte do fungo. Em seus estudos, Tachibana *et al.* relataram a produção de IFN- γ , TNF- α e IL-10 após reestimulação de linfócitos imunes com antígenos de *S. schenckii*. Logo, as citocinas parecem estar envolvidas na proteção contra este microorganismo; assim como IL-1, pois sua produção e a de TNF apresentam-se prejudicadas em camundongos com infecção sistêmica. A expressão de IFN- γ , TNF- β , TNF- α e iNOS pode ser detectado em lesões cutâneas de esporotricose. Células presentes no granuloma também expressam IFN- γ (79, 70, 80, 74, 73).

Dessa forma, observa-se que a resposta imunológica mediada por células Th1 são predominantemente responsáveis na prevenção e controle da infecção causada por *S. schenckii*.

Apesar de vários trabalhos ressaltarem a importância da resposta imunológica na esporotricose, pouco se conhece sobre componentes antigênicos envolvidos nesse evento. Os testes de imunodifusão sugerem uma maior complexidade antigênica nas culturas de micélio e conídios de *S. schenckii* do que nas de leveduras. Scott & Muchomore estudando o perfil eletroforético do sobrenadante de culturas de células leveduriformes observaram certa complexidade na sua composição, com bandas protéicas variando

entre 22kDa e 70 kDa sendo algumas reconhecidas por soros de pacientes com esporotricose. E nas culturas miceliares Mendoza *et al.* verificaram bandas com pesos moleculares entre 29kDa e 200 kDa confirmando a maior complexidade antigênica destas estruturas ^(60, 81, 82).

No entanto, até o momento não foi descrito nenhum componente antigênico proteico específico de *S. schenckii*. A identificação de determinantes antigênicos e a purificação dessas moléculas poderiam ser úteis no desenvolvimento de testes sorológicos específicos, assim como no estudo da participação desses componentes no processo de virulência e resposta imunológica na esporotricose.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Para verificarmos a relevância de moléculas proteicas secretadas pelo *S. schenckii* na resposta imunológica em modelo experimental de esporotricose, serão analisados:

1. O perfil eletroforético das proteínas liberadas pelo *S. schenckii* em culturas líquidas;
2. Os determinantes antigênicos de *S. schenckii* importantes na esporotricose experimental;
3. A capacidade das moléculas imunorreativas, previamente purificadas, em induzir resposta imune celular e humoral.

MATERIAL e
MÉTODOS

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Fungos

Foram utilizados os isolados M-64, FCF-278, FCF-280 e FCF-356 de *S. schenckii*, obtidos de materiais clínicos de pacientes com esporotricose linfocutânea. Estes isolados são mantidos na micoteca do Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP), na fase filamentosa, em ágar-Sabouraud (anexo 1), à temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), sob óleo mineral. Foram revertidos para a fase leveduriforme em ágar-BHI (anexo 1) a 37°C e assim mantidos através de repiques a cada 15 dias.

O isolado de *S. schenckii* M-64 foi utilizado nos seguintes ensaios: infecção experimental, obtenção do exoantígeno e imunização. Os outros isolados foram utilizados apenas para infecção experimental.

2. Preparação do exoantígeno

O exoantígeno foi produzido segundo Scott & Muchmore⁽⁸¹⁾ com algumas modificações. Após a conversão à fase leveduriforme de *S. schenckii* M-64, as células leveduriformes crescidas em 5 tubos de ágar-BHI, por três dias, a 37°C , foram transferidas para frasco de 500mL, tipo Erlenmeyer, contendo 100mL de meio líquido YCG (anexo 2). Esse pré-inóculo foi cultivado por três dias, sob agitação constante, a 200 rpm, a 37°C em incubadora com agitação (C25 INCUBATOR SHAKER, New Brunswick Scientific, Estados Unidos). Este pré-inóculo, foi então transferido para frasco de 1000 mL, tipo Erleimeyer, contendo 400 mL do mesmo meio incubado nas

mesmas condições do pré-inóculo por mais 7 dias. Após este período, o crescimento fúngico foi interrompido pela adição de 0,2g/L de timerosal (Synth, Brasil) e o cultivo foi mantido 24 horas a 4°C. Em seguida foi centrifugado por 5 min a 3000 rpm, o sedimento desprezado e o sobrenadante filtrado em papel de filtro. O filtrado foi concentrado 10 vezes pelo sistema Amicon (MILLIPORE, Estados Unidos) com membrana de celulose YM10 (MILLIPORE, Estados Unidos) e dialisado contra água destilada, a 4°C, com várias trocas, por 24 horas. A seguir, o exoantígeno dialisado foi filtrado em filtro de 45µm de diâmetro (MILLIPORE, Estados Unidos) e estocado a -20°C.

3. Dosagem de proteínas

A dosagem protéica do exoantígeno de *S. schenckii* M-64 foi realizada segundo Bradford, utilizando CBB G-250 (Sigma, Alemanha) e como padrão albumina bovina (Sigma, Alemanha) ⁽⁸³⁾.

4. SDS-PAGE das proteínas liberadas pelo *S. schenckii* M-64

4.1. Preparo do gel

O gel para eletroforese vertical foi preparado em uma cuba de eletroforese vertical para mini gel (BIO-RAD Mini PROTEAN® 3 Cell), constando de um gel de separação linear a 12% de acrilamida e 0,75mm de espessura.

O gel foi preparado a partir de soluções estoques (anexo 3).

4.2. Preparo das amostras

Uma alíquota do exoantígeno de *S. schenckii* M-64 contendo 2 µg/mL de proteína foi diluída em tampão de amostra. A amostra foi fervida por 5 min, a seguir foi aplicada no gel.

Em cada corrida foi colocado um padrão de baixo peso molecular (PM), composto de fosforilase b (97.000 Da), albumina bovina (66.000 Da), ovoalbumina (45.000 Da), anidrase carbônica (30.000 Da), inibidor de tripsina (20.100 Da), α -lactoalbumina (14.400 Da) (Amersham Pharmacia, Inglaterra).

4.3. Condições da corrida eletroforética

O gel contendo a amostra e o padrão de baixo peso molecular foi submetido à corrida eletroforética por 90 min a 120V.

4.4. Coloração do gel de SDS-PAGE pela prata

Após a corrida eletroforética, para a visualização das bandas protéicas o gel foi corado pela prata (Anexo 4).

5. Infecção experimental com o isolado *S. schenckii* M-64

5.1. Animais

Foram utilizados 64 camundongos fêmeas da linhagem BALB/c de 8-12 semanas de idade, obtidos no biotério de produção e experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os animais foram criados em condições - SPF.

5.2. Preparo do inóculo fúngico

O isolado de *S. schenckii* M-64 foi cultivado em meio BHI a 37°C por 72h. A seguir as leveduras foram suspensas em 10 mL de PBS estéril para realização da contagem das células. As células foram contadas em câmara de Neubauer, diluídas na proporção de 1:1 com corante azul de trypan para verificação da viabilidade celular.

5.3. Infecção via peritonial (v.p.)

Um grupo de 32 animais foi infectado com leveduras de *S. schenckii* M-64. Com o auxílio de uma seringa de 1mL, cada animal recebeu, v. p., um inóculo de 100µL com 5×10^6 leveduras. Um outro grupo de 32 camundongos, considerado como grupo controle, recebeu v.p. 100 µL de PBS estéril.

5.4. Sacrifício dos animais

Nos 7°, 14°, 21° e 28° dias após a infecção, quatro animais de cada grupo foram anestesiados e o sangue destes animais colhido intracardiaco para posterior obtenção do soro. O baço e o fígado destes animais foram retirados para avaliação da infecção pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e dosagem de citocinas.

5.5. Obtenção dos soros

As amostras de sangue dos camundongos coletadas durante a infecção foram centrifugadas para separação dos soros e estes foram estocados. As amostras de sangue dos camundongos coletadas durante a infecção foram centrifugadas para separação do soro e este foi estocado à temperatura de -20°C até o momento do uso à temperatura de -20°C até o momento do uso.

5.6. Cultura dos órgãos

O fígado e baço retirados de cada animal foram colocados em placas de Petri estéreis e pesados imediatamente. Cada órgão foi macerado com o auxílio de um homogeneizador manual em 10 mL de PBS. Desta solução foram retirados 300 µL e semeados em placas de ágar-Sabouraud (MERCK, Alemanha) acrescido de cloranfenicol 0,05g/L. As placas foram mantidas a 30°C por 15 dias.

As colônias fúngicas foram contadas e o número de UFC para cada órgão foi então determinado. O valor de UFC de quatro

camundongos por grupo experimental foi utilizado para calcular a média de UFC por grama de órgão.

5.7. Dosagem de citocinas

A determinação da concentração das citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ , foi avaliada por meio de ELISA. Para este ensaio, o macerado de baço e fígado dos animais foi centrifugado por 5 min a 2000 rpm, o sedimento foi desprezado e o sobrenadante estocado a -70°C até o momento de uso.

O teste de ELISA de captura foi realizado utilizando um kit comercial (Pharmingen, Estados Unidos) e os todos os procedimentos seguiram-se de acordo com o fabricante.

6. Infecção com os isolados FCF-278, FCF-280, FCF-356

Foram preparados inóculos de 100 μ L com 5×10^6 leveduras de *S.schenckii* FCF-278, FCF-280, FCF-356 e inoculados v.p., respectivamente, em camundongos BALB/c divididos em 3 grupos com três animais. Após 21 dias de infecção, os animais foram anestesiados e o sangue destes animais colhidos intracardiaco, depois os sangues foram centrifugados para separação dos respectivos soros e estes foram estocados à temperatura de -20°C até o momento de uso.

7. Western blot

7.1. Transferência das proteínas

Uma alíquota do exoantígeno de *S. schenckii* M-64 contendo 15 μ g/mL de proteína foi diluída em tampão de amostra e fervida por 5 min. Em seguida foi separada por eletroforese em gel de

poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% e 1,0mm de espessura. As condições da corrida foram às mesmas descritas no item 4.3.

Após a corrida eletroforética, a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose (MILLIPORE, Estados Unidos) foi realizada segundo Camargo, mas com algumas adaptações ⁽⁸⁴⁾. A cuba de transferência (BIO-RAD Mini Trans-Blot[®] Cell) foi colocada em uma caixa de isopor com gelo, e em seguida o sistema foi submetido a uma diferença de potencial de 90 volts por 120 minutos.

7.2. Coloração reversível das proteínas

A coloração da membrana após o término da transferência foi realizada com Ponceau S ⁽⁸¹⁾.

7.3. Bloqueio dos sítios livres

Para o bloqueio dos sítios livres das membranas de nitrocelulose, estas foram cobertas com 100 mL de PBS com 5% de leite desnatado por 2h, sob agitação leve, à temperatura ambiente. Depois foram lavadas duas vezes com PBS (10 min).

7.4. Reação das proteínas com os anticorpos

A membrana foi cortada em tiras de 0,5 cm e cada tira foi colocada em uma canaleta para reagir com os soros dos animais infectados com os isolados M-64, FCF-278, FCF-280, FCF-356 e de animais não infectados, respectivamente, conforme os seguintes procedimentos modificados de Camargo ⁽⁸³⁾.

- cada tira foi incubada com 2 mL dos soros dos camundongos diluídos 1:100 em PBS +5% de leite desnatado por 1h, sob agitação leve, à temperatura ambiente;
- lavagem com PBS por 3 vezes – 10 min cada vez;
- depois da lavagem foram adicionados, em cada canaleta, 2mL do conjugado anti-Ig de camundongo ligado à peroxidase (BIO-RAD), diluídos a 1:3000 em PBS+ 5% de leite desnatado, e incubação de 1h à temperatura ambiente, sob agitação leve;

- depois de nova lavagem foram adicionados, em cada canaleta, 2 mL por canaleta da solução de substrato 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (SIGMA-ALDRICH, Alemanha) acrescida de H₂O₂ à 30% (MERCK, Alemanha).
- após leve agitação até a revelação das bandas, a reação foi interrompida lavando-se a membrana com água bidestilada.

8. Purificação de proteínas

Após a realização do *Western blot*, a proteína que se mostrou imunorreativa foi purificada através da técnica de eletroeluição conforme os seguintes procedimentos:

8.1. SDS – PAGE

Foram preparados géis de poliacrilamida conforme descrito no item 4.1., mas com géis de 1,0 mm de espessura e pente preparativo para aplicação de uma alíquota do exoantígeno contendo 20 µg/mL de proteína, em cada gel. Após a corrida eletroforética, foi cortada uma tira de cada gel (a extremidade com o padrão de peso molecular) e esta foi corada pela prata.

Após a visualização das proteínas, a tira de gel corada foi alinhada com a outra parte do gel e o fragmento de poliacrilamida contendo a molécula imunorreativa foi retirada. Os fragmentos de poliacrilamida foram estocados em PBS a 4°C até o momento da eletroeluição.

8.2. Eletroeluição dos géis

Para a eletroeluição, os fragmentos de géis foram colocados em um saco de diálise, e foram adicionados 15 mL de tampão de transferência e o saco foi colocado em um suporte plástico. Este foi colocado dentro da cuba de transferência (BIO-RAD Mini Trans-Blott® Cell) contendo tampão de transferência. A cuba foi colocada em uma

caixa de isopor com gelo e o sistema foi, então, submetido a uma diferença de potencial de 100 volts por 1h.

8.3. Diálise do material eletroeluído

Após a eletroeluição, o material contido no saco de diálise foi dialisado contra PBS por 24h a 4°C, com várias trocas de PBS.

O material dialisado foi recuperado e liofilizado, e em seguida ressuspensionado em 500 µL de PBS. A quantificação protéica deste material foi realizada conforme o item 3. Este material foi estocado a -20°C até o uso.

Para a confirmação da purificação da proteína, foi realizado eletroforese vertical (SDS-PAGE) nas mesmas condições descritas anteriormente no item 4, utilizando 5 µg/mL do material liofilizado.

9. Avaliação da resposta imune humoral contra *S. schenckii*

Foram realizados, através de ELISA, ensaios para avaliar a resposta humoral dos camundongos infectados i.p. com 5x10⁶ células leveduriformes de *S. schenckii* M-64. Os objetivos destes ensaios foram detectar anticorpos totais, assim como a caracterização isotípica e a titulação dos mesmos.

O exoantígeno de *S. schenckii* M-64 e a proteína imunorreativa no *Western blot* e que foi purificada por eletroeluição, foram utilizados como antígeno a serem adsorvidos à placa. E os soros a serem dosados foram os dos animais infectados com os isolados de *S. schenckii* M-64, FCF-278, FCF-280, FCF-356 e soros de animais não infectados (controle).

9.1. ELISA para titulação de Ig total anti-*S. schenckii*

O teste de ELISA para titulação de Ig total nos soros dos animais infectados com o isolado de *S. schenckii* M-64 foi realizado

segundo Camargo ⁽⁸³⁾, com algumas adaptações. Soros de animais não infectados foram utilizados como controles.

Para a sensibilização da placa de poliestireno (Corning-COSTAR, Nova Iorque, Estados Unidos) foi utilizado uma alíquota do exoantígeno de *S. schenckii* M-64 contendo 5µg/mL e uma alíquota de 1µg/mL da proteína imunorreativa purificada. O conjugado utilizado foi anti-Ig de camundongo marcado com peroxidase (ZYMED).

As densidades ópticas (DO) obtidas das leituras dos soros dos camundongos controles foram consideradas como o ponto de corte, e a DO de cada diluição comparada com o ponto de corte controle.

9.2. Caracterização isotípica de IgG

No ensaio de ELISA para realização da isotipagem dos anticorpos circulantes (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) seguiram-se os mesmos procedimentos do item 9.1., mas os conjugados utilizados foram mAb de rato anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b e anti-IgG3 de camundongo marcado com biotina (Pharmingen, Estados Unidos) nas concentrações indicadas pelo fabricante e a solução de substrato foi estreptoavidina (R&D SYSTEMS, Estados Unidos)

As DO obtidas das leituras dos soros dos camundongos controles foram consideradas como o ponto de corte, e a DO de cada diluição comparada com o ponto de corte controle.

10. Ensaio de proliferação celular

10.1. Imunização dos camundongos

Os animais utilizados para imunização foram camundongos da linhagem BALB/c fêmeas com 8-12 semanas de idade. E para a imunização foram utilizadas as células leveduriformes de

S. schenckii M-64, o exoantígeno do fungo e a proteína imunorreativa purificada.

10.1.1. Imunização com *S. schenckii* M-64

Foi preparado um inóculo de 2×10^5 células leveduriformes em 100 μ L de PBS estéril; os animais foram imunizados por via subcutânea (sc). com 50 μ L da suspensão fúngica em cada coxim plantar posterior.

10.1.2. Imunização com exoantígeno

Os animais foram imunizados com 10 μ g/mL de exoantígeno de *S. schenckii* M-64, que foi anteriormente emulsificado em igual volume de adjuvante completo de Freund (ACF) (Gibco BRL, Estados Unidos). A imunização foi por via sc. em cada coxim plantar posterior.

10.1.3. Imunização com as proteínas purificadas

Para a imunização com a proteína purificada, 5 μ g/mL desta foi emulsificada em igual volume de ACF (Gibco BRL, Estados Unidos), e os animais foram inoculados sc em cada coxim plantar posterior.

10.2. Obtenção de células de linfonodos dos camundongos e proliferação celular

Os camundongos previamente imunizados com *S. schenckii* M-64, exoantígeno ou proteína purificada foram sacrificados após 18 dias de imunização, e deles foram retirados os linfonodos inguinais e poplíteos para a proliferação celular.

Os procedimentos para os ensaios de proliferação celular foram os seguintes:

- linfonodos de cada camundongo, foram macerados manualmente em placa de Petri estéril contendo 5 mL de RPMI 1640 (SIGMA-ALDRICH, Alemanha);
- os homogenatos foram centrifugados a 2000 rpm por 5 min;

- o sobrenadante desprezado e o sedimento celular ressuspensionado em 5mL de RPMI 1640(SIGMA-ALDRICH, Alemanha);
- seguiu-se nova centrifugação a 2000 rpm por 5 min;
- depois o sobrenadante foi desprezado, e o sedimento de células foi ressuspensionado em 5 mL de meio R5% (RPMI 1640(SIGMA-ALDRICH, Alemanha) suplementado com 1mM de piruvato de sódio, 1mM de aminoácidos não essenciais, 1mM de piruvato de sódio e 5% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil);
- as células foram contadas em câmara de Neubauer, diluídas na proporção de 1:1 com corante azul trypan para verificação da viabilidade celular;
- suspensões de células viáveis foram ajustadas a concentração final de 2×10^6 células/ mL.
- 100 μ L destas suspensões foram depositadas em cada orifício da placa para cultura celular com 96 orifícios (Corning-COSTAR, Estados Unidos).

Estas suspensões celulares foram reestimuladas conforme o seguinte esquema:

i) células obtidas dos animais imunizados com o fungo

- foi acrescentado exoantígeno nas concentrações 1 μ g, 2 μ g, 4 μ g e 8 μ g.
- e concentrações de 1 μ g e 2 μ g da proteína imunorreativa purificada.

ii) para os camundongos imunizados com exoantígeno

- foi acrescentado às células as seguintes concentrações de exoantígeno: 2,5 μ g, 5 μ g, 7,5 μ g e 10 μ g;
- a proteína purificada foi acrescentada na concentração de 2,5 μ g.

iii) células obtidas dos animais imunizados com a molécula purificada

- células foram estimuladas com 2,5µg da proteína purificada.

Como controles positivos as células foram estimuladas com o mitógeno Con A (SIGMA-ALDRICH, Alemanha) na concentração de 2µg/mL e como controles negativos células sem nenhum estímulo.

As células foram incubadas à 36,5° C, em estufa umidificada, contendo 5% de CO₂ por 72 – 96 h, e 18 a 24hs antes de coletar as células, 1µCi/poço de timidina triciada [metil-³H] (Amershan Biosciences, Inglaterra);

As células foram coletadas em um coletor automático de células (Cell harvester, LKB Wallac 1295-001, Turku, Finlândia) e a radioatividade incorporada foi medida em contador de emissões β (Liquid Scintillation Counter 1205 Betaplate, Wallac, Turku, Finlândia) ; a proliferação foi determinada pela incorporação da radioatividade pelas células e os resultados expressos em cintilações por minuto (com).

11. Ensaio de fagocitose

Três camundongos BALB/c foram utilizados para a realização deste ensaio que seguiu-se conforme os seguintes procedimentos:

11.1. Obtenção de macrófagos peritoneais:

- após o sacrifício de cada animal, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, a cavidade peritoneal foi lavada com 2mL de meio RPMI 1640 (SIGMA-ALDRICH, Alemanha) para obtenção de macrófagos;
- a suspensão de células foi centrifugada por 5 min a 2000 rpm;

- o sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspendido em 2mL de meio RPMI 1640 (SIGMA-ALDRICH, Alemanha) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil);
- as células foram contadas em câmara de Neubauer, diluídas na proporção de 1:1 com corante azul trypan para verificação da viabilidade celular;
- suspensões de células viáveis foram ajustadas a concentração final de 5×10^5 células/ mL;

11.2. Cultura de macrófagos:

- em cada orifício da placa para cultura celular de 24 orifícios (Corning-COSTAR, Estados Unidos) foi colocado uma lamínula e 1mL da suspensão celular foi depositada em cada orifício desta placa;
- as células foram incubadas à 36,5° C, em estufa umidificada, contendo 5% de CO₂ por 24 h;
- as células foram lavadas e o meio de cultura desprezado para retirar as células que não aderiram à lamínula e em seguida foi colocado 1mL de meio RPMI 1640 (SIGMA-ALDRICH, Alemanha) em cada orifício da placa;
- em cada orifício da placa, agora contendo apenas macrófagos, foi acrescentado, respectivamente, 4µg da proteína imunorreativa purificada e 4µg de exoantígeno de *S. schenckii* M-64 e as células foram incubadas por mais 30 min;
- após este tempo foi acrescentado à cultura de macrófagos 4×10^6 células leveduriformes de *S. schenckii* M-64 em cada orifício da placa e as células incubadas por mais 4 h;

Como controle os macrófagos não foram pré-incubados com os antígenos.

11.3. Coloração

As lamínulas foram retiradas dos orifícios da placa e coradas por Giemsa (NEWPROV – Brasil). Cada lamínula foi mantida por 5 s, sob leve agitação, em cada um dos corantes e depois fixadas em lâminas para microscopia com Entellan (MERCK – Alemanha).

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico comum (MOC)(OLYMPUS CBA, Japão) e o índice de fagocitose (IF) calculado multiplicando-se a porcentagem de macrófagos que fagocitaram, pelo número médio de leveduras fagocitadas por estas células ⁽³⁹⁾.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. Perfil eletroforético do exoantígeno de *S. schenckii*

Na **figura 1** está ilustrada, a eletroforese vertical (SDS-PAGE) do exoantígeno obtido do cultivo de *S. schenckii* M-64. Podemos observar um perfil protéico de 12 bandas com pesos moleculares variando entre 97 kDa e 20,1 kDa.

Figura 1: Perfil eletroforético do exoantígeno de *S. schenckii* M-64. Linha 1: exoantígeno e linha 2: padrão de peso molecular. O gel foi corado pela prata.

2. Infecção Experimental

Camundongos da linhagem BALB/c foram infectados, via peritonal, com 5×10^6 células leveduriformes de *S. schenckii* M-64 e após 7, 14, 21 e 28 dias sacrificados e avaliados quanto ao aspectos da carga fúngica no baço e fígado, determinados pela contagem do número de UFC/g na cultura dos respectivos órgãos.

Como observado na **figura 2**, houve um decréscimo na carga fúngica em ambos os órgãos, ao longo da infecção. No início da infecção, aos 7 dias, foram recuperados os números mais elevados de leveduras tanto no baço ($45,8 \times 10^3$ UFC/g) quanto no fígado ($36,5 \times 10^3$ UC/g) com relação ao inóculo fúngico inicial. E aos 21 dias de infecção observamos que a carga fúngica recuperada destes órgãos foi a menor durante toda a infecção, $0,14 \times 10^3$ UFC/g e $3,9 \times 10^3$ UFC/g no baço e fígado, respectivamente.

Figura 2: Carga fúngica nos órgãos dos animais infectados com *S. schenckii* M-64. As UFC foram recuperadas dos baços e fígados de camundongos BALB/c infectados com 5×10^6 leveduras após 7, 14, 21 e 28 dias de infecção. Os resultados representam as Médias $\pm$ Desvio Padrão da contagem de colônias nos diversos tempos de infecção.

3. Detecção de citocinas nos homogenatos de baço e fígado

Na **figura 3** observamos os níveis de citocinas produzidas nos órgãos dos camundongos infectados com *S. schenckii* M-64. A citocina INF- γ foi produzida em níveis constantes ao longo da infecção, sendo detectada em menores concentrações no baço. As concentrações de IL-2 foram baixas tanto no baço quanto no fígado, porém neste foi sintetizado em maiores níveis e de forma decrescente ao longo da infecção. No baço esta citocina foi produzida até os 14 dias e no fígado até os 21 dias de infecção.

A citocina IL-4 foi detectada nos dois órgãos em baixas concentrações, não sendo detectada no fígado aos 21 dias após a infecção. No baço esta citocina foi detectada ao longo de toda a infecção.

Podemos observar que os níveis de IL-10 foram os mais altos nos dois órgão, porém, no fígado é sintetizada de maneira decrescente até os 21 dias de infecção, ocorrendo um aumento na sua produção aos 28 dias. No baço, verificamos que os níveis de IL-10 oscilaram ao longo da infecção e foram menores na 1^a, 2^a e 3^a semanas de infecção, apenas 3^a semana verificamos que esta citocina foi sintetizada em maiores concentrações que no fígado.

Figura 3: Níveis de citocinas produzidas nos órgãos dos animais infectados com *S. schenckii* M-64. As citocinas foram detectadas através de ELISA aos 7, 14, 21 e 28 dias de infecção. Os resultados representam as Médias $\pm$ DP obtidos nos diversos tempos de infecção.

4. Western blot

4.1. Soros de animais infectados com o isolado *S. schenckii* M-64

Os soros que foram obtidos dos animais infectados após 7, 14, 21 e 28 dias de infecção foram colocados para reagir com o exoantígeno de *S. schenckii* M-64 para detecção dos componentes antigênicos proteicos. Observou-se que apenas uma proteína de 70 kDa reagiu com os soros dos animais infectados, sendo reconhecida apenas no 21º e 28º dias de infecção. Soro de animais não infectados não apresentaram reação (**figura 4**).

Figura 4: Western blot dos soros dos camundongos infectados com o isolado de *S. schenckii* M-64. Linha 1: soro de animal não infectado; Linhas 2, 3, 4 e 5: soros de animais infectados colhidos no 7º, 14º, 21º e 28º dias de infecção, respectivamente.

4.2. Soros de animais infectados com outros isolados de *S. schenckii*

Quando foram testados os soros de animais infectados com os isolados de *S. schenckii* – FCF-279, FCF-256 e FCF-280 observamos que os anticorpos produzidos contra estes isolados também reagiram apenas com a proteína de 70 kDa (**figura 5**).

Figura 5: *Western blot* com os soros dos camundongos infectados com outro isolados *S. schenckii*. As linhas 2, 3, e 4 representam, respectivamente, os soros de animais imunizados com os isolados FCF-279, FCF-280 e FCF-356. Soro de animal infectado com o isolado M-64 - linha 1.

5. Purificação da proteína antigênica de *S. schenckii*

Após a identificação da proteína antigênica de 70 kDa de *S. schenckii*, através da técnica de *Western blot*, esta foi purificada por eletroeluição e a confirmação foi realizada por eletroforese (SDS-PAGE) como observamos na **figura 6**.

Figura 6: SDS-PAGE da proteína imunorreativa de 70 kDa. A proteína foi purificada por eletroeluição e após corrida eletroforética, o gel foi corado pela prata. **Linha 1:** exoantígeno e **linha 2:** proteína de 70kDa, purificada.

6. Produção de anticorpos anti-*S. schenckii*

A produção de anticorpos específicos contra o exoantígeno e a proteína de 70 kDa foi detectada através de ELISA para avaliação da resposta imune humoral dos camundongos BALB/c infectados ou não com o fungo.

6.1. Níveis de Ig total

Os níveis de Ig total produzidos anti-exoantígeno de *S. schenckii* oscilarem durante a infecção, mas as maiores concentrações foram detectadas aos 14 e 28 dias após infecção (**figura 7A**), com respectivos títulos de 600 e 3200 (**figura 7B**).

Figura 7: Produção de anticorpos totais anti-exoantígeno de *S. schenckii* detectados por ELISA. Foram utilizados os soros de camundongos BALB/c infectados i.p. com o fungo, colhidos após 7, 14, 21 e 28 dias de infecção. **(A)** Níveis de Ig total. Os resultados representam as Médias $\pm$ DP das concentrações detectadas nos diferentes tempos de infecção. A barra horizontal (—) representa a média de reatividade de animais normais não infectados. **(B)** Titulação dos anticorpos totais. As DO obtidas das leituras dos soros dos camundongos controles foram consideradas como “cut-off”, e a DO de cada diluição comparada com o “cut-off” controle.

Os anticorpos contra a proteína de 70 kDa foram produzidos no início da infecção (7 dias) em níveis mais baixos, aumentando nos demais dias de infecção, e aos 28 dias de infecção observamos a maior síntese de anticorpos (**figura 8A**). Os maiores títulos de Ig (1600) foram detectados nos 14° e 28° dias pós infecção (figura 8B)

Figura 8: Produção de anticorpos totais anti-proteína de 70 kDa detectados por ELISA. Foram utilizados os soros dos animais infectados i.p. com o fungo e colhidos após 7, 14, 21 e 28 dias de infecção. **(A)** níveis de Ig total. Os resultados representam as Médias $\pm$ DP das concentrações encontradas nos diversos tempos de infecção. A barra horizontal (—) representa a média de reatividade de animais normais não infectados. **(B)** Títulos dos anticorpos totais. As DO obtidas das leituras dos soros dos camundongos controles foram consideradas como “cut-off”, e a DO de cada diluição comparada com o “cut-off” controle.

6.2. Isotipagem de IgG

Podemos observar na **figura 9** que os isotipos de IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) produzidos contra o exoantígeno de *S. schenckii* começam a ser sintetizados após 14 dias de infecção. O isotipo IgG1 é produzido em maiores níveis que os outros, seguido pelo isotipo IgG3, IgG2b e IgG2a. E suas maiores concentrações são detectadas aos 21 dias pós infecção.

Figura 9: Isotipagem de IgG produzidas contra o exoantígeno de *S. schenckii*. Os isotipos IgG1, IgG2, IgG2b e IgG3 foram dosados por ELISA utilizando soros de animais após 7, 14, 21 e 28 dias de infecção com o fungo. Os resultados representam as Médias $\pm$ DP das concentrações encontradas nos diversos tempos de infecção. A barra horizontal (—) representa a média de reatividade de animais normais não infectado.

Quando realizado o ELISA para detecção dos isotipos de IgG específicos contra a proteína de 70 kDa observou-se que aos 7 dias de infecção estes já são produzidos, porém em níveis muito baixos (**figura 10**). No entanto, ao longo da infecção podemos verificar que ocorre um aumento na produção destes isotipos, sendo que no 21º dia de infecção detectaram-se os maiores níveis destes anticorpos. Os isotipos IgG3 e IgG1 foram produzidos em maiores concentrações que os isotipos IgG2a e IgG2b.

Figura 10: Detecção dos isotipos de IgG produzidos contra a proteína de 70 kDa. Os isotipos IgG1, IgG2, IgG2b e IgG3 foram dosados por ELISA utilizando soros de animais após 7, 14, 21 e 28 dias de infecção com o fungo. Os resultados representam as Médias $\pm$ DP das concentrações encontradas nos diversos tempos de infecção. A barra horizontal (—) representa a média de reatividade de animais normais não infectados.

7. Ensaios de proliferação celular

Os ensaios de linfoproliferação foram realizados para avaliar a capacidade do exoantígeno e da proteína de 70 kDa estimularem a proliferação de células totais de linfonodos de camundongos imunizados com células leveduriformes de *S. schenckii*, com exoantígeno ou com o proteína de 70 kDa

7.1. Animais imunizados com o fungo

Camundongos da linhagem BALB/c foram imunizados subcutaneamente com 1×10^5 células de *S. schenckii* e após 18 dias células totais dos linfonodos inguinais e poplíteos foram avaliadas quanto à capacidade de proliferação frente às diferentes concentrações de exoantígeno (1 μ g, 2 μ g, 4 μ g e 8 μ g) e da proteína de 70 kDa (1 μ g e 2 μ g).

Como é possível observar na **figura 11**, as células de linfonodos dos animais imunizados com o fungo não foram capazes de proliferar quando estimuladas com exoantígeno, em nenhuma das concentrações utilizadas. Também não houve proliferação quando utilizou-se a proteína de 70 kDa tanto na concentração de 1 μ g, quanto na de 2 μ g.

Figura 11: Capacidade proliferativa de células totais de linfonodos de animais imunizados com *S. schenckii*. As células foram estimuladas *in vitro* com exoantígeno ou proteína de 70 kDa. A proliferação foi determinada pela incorporação de timidina [metil-³H] pelas células e os resultados expressos como Média $\pm$ DP de cpm. Controle positivo: células estimuladas com 2 μ g/mL de ConA. Controle negativo: células cultivadas sem estímulos.

7.2. Animais imunizados com exoantígeno

Na **figura 12** verificamos que as células dos animais previamente imunizados com o exoantígeno não foram capazes de proliferarem quando estimuladas *in vitro* com o exoantígeno ou com a proteína de 70 kDa em quaisquer das concentrações utilizadas com o exoantígeno.

Figura 12: Capacidade proliferativa de células totais de linfonodos de animais imunizados com exoantígeno. As células foram reestimuladas *in vitro* com o exoantígeno ou proteína de 70 kDa. A proliferação foi determinada pela incorporação de timidina [metil-³H] pelas células e os resultados expressos como Média ± DP de cpm. Controle positivo: células estimuladas com 2μg/mL de ConA. Controle negativo: células cultivadas sem estímulos.

7.3. Animais imunizados com a proteína de 70 kDa

Na **figura 13**, é possível observar que as células dos animais previamente imunizados com a proteína de 70 kDa não proliferaram quando estimuladas *in vitro* com a proteína de 70kDa na concentração utilizada.

Figura 13: Proliferação de células totais de linfonodos de camundongos imunizados com a proteína de 70 kDa. As células foram estimuladas *in vitro* com 2,5µg/mL da molécula purificada, a proliferação celular determinada pela incorporação de timidina [metil-³H] e os resultados expressos como Média ± DP das cintilações por minuto – cpm. Controle positivo: células estimuladas com 2µg/mL de ConA. Controle negativo: células cultivadas sem estímulos.

8. Ensaio de fagocitose

O exoantígeno e a proteína de 70 kDa foram capazes de inibir a fagocitose de leveduras de *S. schenckii* pelos macrófagos peritonias murinos quando foram cultivados na presença de ambos os antígenos (**figuras 14 e 15**).

Figura 14: Índice de fagocitose de macrófagos. Os macrófagos foram pré-incubados com exoantígeno ou com a proteína de 70 kDa e depois foi acrescentado à cultura 4×10^6 leveduras de *S. schenckii*. O IF foi calculado multiplicando-se a porcentagem de macrófagos que fagocitaram, pelo número médio de leveduras fagocitadas por estas células (Oda *et al.*, 1983). Controle: macrófagos e leveduras sem antígenos.

Figura 15: Fagocitose de leveduras de *S. schenckii* pelos macrófagos. Os macrófagos peritoniais foram pré-incubados com 4 $\mu\text{g/mL}$ de exoantígeno (C) ou 4 $\mu\text{g/mL}$ da proteína de 70kDa (D) e depois foi acrescentado à cultura 4×10^6 leveduras de *S. schenckii*. (A e B) macrófagos e leveduras sem antígenos (B-MOC1000x · A C e D-MOC400x)

DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

A resposta imune do hospedeiro nas micoses é o resultado das ações entre a imunidade inata, imunidade adaptativa (Th1, Th2, células regulatórias, células B e anticorpos) e os fatores de virulência do fungo. Os mecanismos efetores da imunidade inata podem destruir o fungo ou limitar a infecção até que a imunidade adaptativa se desenvolva, e a ativação desta é um passo crítico no controle das infecções por fungos patogênicos ⁽⁸⁵⁾.

Os mecanismos envolvidos na prevenção e controle da esporotricose, aparentemente, incluem a imunidade inata e a imunidade adaptativa (celular e humoral). No início da infecção, leucócitos polimorfonucleares representam o mecanismo de defesa contra *S. schenckii* até que a imunidade adaptativa seja ativada. Os anticorpos específicos contra *S. schenckii* parecem não estar relacionados com o aumento da resistência na esporotricose, e a imunidade celular tipo Th1 tem sido descrita como o principal mecanismo efetor da imunidade adaptativa no controle da esporotricose ^(76, 86, 70).

Analisando os resultados obtidos em nossos estudos, verificamos o progresso da infecção por *S. schenckii* nos camundongos BALB/c, através de cultivos de baço e fígado dos animais infectados, que revelaram que a carga fúngica nestes órgãos apresentava-se elevada na primeira semana de infecção, diminuindo acentuadamente após o 14º dia de infecção, sugerindo-nos que na fase inicial da doença, a resistência contra esse patógeno não está ligada a uma capacidade natural do hospedeiro para eliminar o fungo. Desta forma, os mecanismos efetores da imunidade adquirida desenvolvidos mais tardiamente durante a infecção representam os fatores relevantes no controle da esporotricose.

Diversos estudos relatam que a imunidade celular mediada pelos linfócitos T e outros mediadores inespecíficos como macrófagos, neutrófilos e células NK são considerados os principais mecanismos de defesa contra os fungos, uma vez que observações clínicas revelam que indivíduos com deficiência na imunidade inata e/ou adaptativa celular são susceptíveis às infecções fúngicas. Aids e doenças hematológicas são exemplos de deficiências nas funções das células T que predispõe às micoses sistêmicas ^(87, 88).

A resposta imune celular, assim como a imunidade humoral e as células efectoras da imunidade inata desenvolvidas no controle e prevenção dos microrganismos são reguladas por diversos mediadores como as citocinas, que estão envolvidas nas respostas inflamatórias e granulomatosas, as quais em geral são pré-requisitos para a erradicação dos microrganismos do tecido ou então restringi-los a um tecido evitando a disseminação ⁽⁸⁹⁾.

Dentro do paradigma da resposta imune celular tipo Th1/Th2, estudos indicam um papel protetor, nas infecções fúngicas, dos mecanismos da imunidade tipo Th1 contrapondo-se às células Th2. Assim, as citocinas caracterizadas como pertencentes ao padrão Th1 estão presentes em modelos de resistência contra diversos fungos, tais como *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* e *Penicillium marneffe* ^(90, 91, 92, 93, 94).

No modelo de esporotricose experimental desenvolvido em nossos estudos, verificamos que nos órgãos dos animais infectados a produção de citocinas não representa um padrão definido Th1 ou Th2, pois houve síntese de citocinas características dos dois tipos de respostas – Th1 (IFN- γ e IL-2) e Th2 (IL-4 e IL-10), sugerindo um padrão misto de resposta no controle da infecção por *S. schenckii*.

Este tipo de resposta pode ser observado em outros modelos tais como na candidíase e na histoplasmose, onde o balanço entre resposta Th1-Th2, com síntese da citocina protetora - IFN- γ , juntamente com citocinas não protetoras - IL-4 e IL-10, é responsável

pela resistência do hospedeiro contra *Candida albicans* e *H. capsulatum*, respectivamente. Desta maneira, observamos que a resposta imune protetora nas diversas infecções fúngicas são dependentes dos fatores relacionados com o patógeno e os mecanismos de defesa do hospedeiro ^(95, 96).

Embora a produção de citocinas apresente um padrão misto, verificamos que a citocina IL-10 foi sintetizada em níveis mais elevados ao longo da infecção. Uma possível explicação para este fato é de que a citocina IL-10 atue regulando negativamente a liberação exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, assim restringindo o amplo espectro de seus efeitos inflamatórios no tecido. Pois, IL-10 é uma citocina antiinflamatória que atua no balanço entre a patologia e a proteção ^(97, 98, 99).

Estes dados propõem que a IL-10 produzida nos tecidos dos animais durante a esporotricose experimental seja relevante para o controle da micose através da diminuição da carga fúngica, limitando o crescimento do patógeno embora não tenha ocorrido a completa eliminação do fungo nos órgãos, caracterizando o caráter crônico desta micose.

Diversos estudos relatam que os polissacarídeos presentes na parede celular de *S. schenckii* ou então secretados pelo fungo atuam como fatores de virulência e imunógenos, deste modo contribuindo na patogenicidade do agente e também modulando a resposta imune do hospedeiro na esporotricose. No entanto, não se conhece proteínas específicas ou enzimas produzidas por este fungo que contribuam para o seu potencial patogênico. Tsuboi e colaboradores, relataram a produção de proteinases extracelulares por *S. schenckii*, mas estas enzimas não estão relacionadas com a patogenicidade na esporotricose ^(1, 36, 39, 100, 46, 101).

Então analisando o perfil de proteínas que as células leveduriformes de *S. schenckii* secretaram quando cultivadas em meio de cultura líquido, identificamos doze bandas proteicas que foram

estudadas para verificarmos a participação destas na regulação da resposta imune contra o fungo. Através de *western blot*, nossos estudos revelaram que os soros dos animais infectados reagem apenas com uma proteína de 70 kDa. Alguns autores relatam que soros de pacientes com esporotricose reagem especificamente com antígenos de 40 kDa-90 kDa ^(81, 82).

Verificamos também que esta proteína de 70 kDa de *S. schenckii* reagiu com os soros dos animais com esporotricose após a segunda semana de infecção persistindo até o final, coincidindo com a diminuição da carga fúngica nos órgãos e o controle da mesma durante a infecção, verificados através da contagem de UFC. Estes resultados sugerem a atuação dos anticorpos na resposta imune do hospedeiro contra o fungo, sendo esta proteína o principal componente antigênico secretado pelas células leveduriformes de *S. schenckii* que participa da modulação desta resposta.

Uma vez verificado que os soros dos animais com esporotricose apresentaram anticorpos reativos contra *S. schenckii*, realizamos o teste de ELISA para quantificar a Ig total nestes soros contra a proteína de 70 kDa, purificada por eletroeluição, e o exoantígeno. Os resultados mostraram que os níveis de Ig total foram elevados no 14º dia de infecção, para ambos os antígenos estudados, mantendo-se durante a infecção. É importante salientarmos que o aumento na produção de Ig contra a proteína purificada e o exoantígeno pode estar relacionado com a diminuição das UFC nos órgãos dos animais e desta maneira, nossos estudos sugerem que os altos níveis de anticorpos produzidos na esporotricose podem estar envolvidos com a proteção específica em camundongos, principalmente, contra a proteína de 70 kDa.

Ainda que alguns estudos relatem que a imunização passiva com anticorpos específicos contra *S. schenckii* não sejam capazes de aumentar a resistência contra o fungo em modelos experimentais, nossos estudos propõem a participação de anticorpos no controle da

infecção, assim como em outras micoses tais como candidíase e criptococose a resposta imune humoral também pode contribuir para a resistência natural e a defesa do hospedeiro^(102, 103, 104).

Analisando a resposta imune humoral em infecções como a paracoccidiodomicose, filariose e criptococose verifica-se que ocorre a expressão de diferentes classes e isotipos de anticorpos durante a doença e que os diferentes isotipos de anticorpos demonstram diferenças na suas habilidades na proteção contra os patógenos^(105, 106, 107, 108, 109, 110, 111).

Se baseando nestes estudos realizamos a isotipagem de IgG produzidas contra os dois antígenos de *S. schenckii* na esporotricose e os resultados revelaram a produção dos isotipos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, demonstrando que os antígenos testados, principalmente a proteína de 70 kDa, possuem epítomos para células B e que estes são capazes de ativar essas células de maneira policlonal. O resultado da isotipagem de IgG também nos mostra que houve uma predominância nos níveis dos isotipos IgG1 e IgG3 para ambos os antígenos estudados e que foram mantidos durante a infecção. Os níveis de IgG2a e IgG2b aumentaram ao longo da infecção quando testamos, principalmente, o exoantígeno, porém, contra a proteína de 70 kDa observamos que o pico de produção do isotipo IgG2b ocorreu no 21º dia de infecção mostrando a especificidade da resposta imune humoral desenvolvida na esporotricose experimental.

Embora diversos estudos relatem a participação da resposta imune humoral na proteção contra algumas micoses, os mecanismos pelos quais os anticorpos modulam esta resposta protetora ainda não estão esclarecidos. Anticorpos contra *Cryptococcus neoformans* podem favorecer a resposta inflamatória aumentando a fagocitose e, conseqüentemente, a apresentação de antígenos e de moléculas co-estimulatórias^(112, 113).

Na candidíase, anticorpos contra manana e a enzima aspartil proteinase (Sap), antígenos definidos de *C. albicans*, são relevantes nos mecanismos de proteção contra infecção primária por este agente. Os polissacarídeos da parede celular de *C. albicans* também são alvos dos anticorpos e estes auxiliam a ativação do sistema complemento contra a célula fúngica favorecendo a fagocitose e, consequentemente, eliminando o fungo ^(114, 115).

E na esporotricose, se desconhece o papel dos anticorpos na resposta imunológica do hospedeiro podendo atuar de diversas maneiras para o controle da infecção. Os altos níveis de IgG1 observados podem ser relevantes no mecanismo de proteção dos anticorpos na esporotricose, uma vez que este isotipo está envolvido na opsonização de antígenos, aumentando a fagocitose das células de *S. schenckii*. Este papel protetor do isotipo IgG1 pode ser observado na criptococose, onde a troca de isotipo não protetor para IgG1 aumenta a eficácia dos anticorpos na proteção contra *C. neoformans* auxiliando a opsonização das leveduras e assim aumentando a sobrevivência dos animais ⁽¹¹¹⁾. É importante considerar que os altos níveis de IgG1 e IgG3 produzidos contra a proteína de 70 kDa ou o exoantígeno podem neutralizar estes componentes, aumentando a eficiência dos macrófagos e consequentemente diminuir a carga fúngica nos órgãos dos animais infectados.

Os resultados obtidos através do *Western blot* e de ELISA revelaram que os antígenos de *S. schenckii*, principalmente a proteína de 70 kDa, possuem epítomos para ativação de células B e são capazes de modular uma resposta humoral protetora contra o fungo. Porém, os experimentos de proliferação celular demonstraram que estes antígenos não possuem epítomos para células T, uma vez que não foram capazes de estimular a proliferação de células de linfonodos dos animais previamente imunizados com o fungo, com a proteína de 70 kDa e com o exoantígeno, logo não sendo capazes de modular uma resposta imune celular protetora na esporotricose.

Contudo, estes resultados são contraditórios aos encontrados na literatura, pois diversos são os estudos que relatam a participação da resposta imune celular na proteção contra a esporotricose (66, 67, 68, 70, 80, 116).

Os ensaios de proliferação mostraram também que os antígenos liberados por *S. schenckii* inibem o crescimento das células, quando comparamos as células cultivadas apenas na presença do meio de cultura com as que foram cultivadas na presença do exoantígeno ou da proteína de 70 kDa, assim estes antígenos atuariam como fatores de virulência do fungo. Para avaliar esta hipótese, realizamos ensaios de fagocitose cultivando os macrófagos na presença ou não dos respectivos antígenos e verificamos que houve uma diminuição na fagocitose de leveduras de *S. schenckii*, que foi mais acentuada na presença da proteína de 70 kDa.

Embora os estudos realizados por Tsuboi *et al.* relatassem a produção de proteinases extracelulares por *S. schenckii*, ainda não se conhece proteínas ou enzimas específicas produzidas por este agente que contribuam na sua patogenicidade. Diversos outros modelos experimentais de infecções fúngicas descrevem a produção de proteínas ou proteinases secretadas pelos fungos tais como *Blastomyces dermatitidis*, *C. albicans* e espécies de dermatófitos que podem atuar na regulação da resposta imune contra tais patógenos (46, 117, 118, 119, 120, 121).

A identificação de componentes antigênicos proteicos de *S. schenckii*, capazes de modular a resposta imunológica do hospedeiro contra o fungo, e a purificação destas proteínas específicas podem auxiliar no entendimento da patogenicidade do fungo, assim como no desenvolvimento de métodos de diagnósticos para esporotricose que sejam mais sensíveis e específicos, tais como ELISA e *immunoblot*.

CONCLUSÕES

IV. CONCLUSÕES

- No controle da esporotricose experimental, a produção de citocinas nos órgãos dos animais infectados representa um padrão misto de resposta imune Th1 - Th2, com síntese das citocinas IL-2, IFN γ , IL-4 e IL-10;
- A citocina IL-10 produzida em níveis elevados nos órgão dos camundongos durante a infecção é relevante no controle da micose através da diminuição da carga fúngica e respectiva limitação do crescimento fúngico;
- As leveduras de *S. schenckii* quando cultivadas em meio de cultura líquido secretam proteínas de pesos moleculares que variam entre 90 kDa e 20,1 kDa;
- Os animais infectados com *S. schenckii* produzem anticorpos reativos contra uma banda proteica de 70 kDa secretada por *S. schenckii* e o reconhecimento desta proteína imunorreativa de 70kDa inicia-se após a segunda semana de infecção, persistindo até o final da mesma;
- Ambos os antígenos estudados, principalmente a proteína de 70 kDa, possuem epítomos para células B, capazes de ativá-las de maneira policlonal com a produção dos isotipos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3;
- Os isotipos IgG1 e IgG3, que foram produzidos em níveis mais elevados contra os dois antígenos estudados, podem estar relacionados com o mecanismo de neutralização dos antígenos, uma vez que estes isotipos estão envolvidos na opsonização e então aumentando a eficiência dos mecanismos de fagocitose;
- Os antígenos proteicos liberados pelo fungo são capazes de diminuir a fagocitose das leveduras de *S. schenckii* pelos macrófagos,

e a diminuição da capacidade fagocítica destas células foi mais acentuada na presença da proteína de 70kDa;

- As leveduras de *S. schenckii* secretam proteínas capazes de modular a resposta imunológica em camundongos infectados com o fungo, através da produção de anticorpos contra antígenos específicos, principalmente contra a proteína de 70 kDa.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) TRAVASSOS, L.R. *Sporothrix schenckii*. In: Szanislo, P.J.(ed). **Fungal Dimorphism, with Emphasis on Fungi Pathogenic for Humans**. New York: Plenum Press: p. 121-131, 1985.
- (2) SCHENK, B.R. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possible related to the Sporotricha. **Bull Johns Hosp 9**: p. 286-290, 1898.
- (3) HEKTOEN, L. & PERKINS, C. F. Refractory subcutaneous abscesses caused by a *Sporothrix schenckii* a new pathogenic fungus. **J Exp Med 5**: p. 77-89, 1900.
- (4) BEURMAN, L. & GOUGEROT, H. Les sporotrichoses (1912 *apud* KWON-CHUNG, K.J. & BENNETT, J.E. Sporotrichosis. In: **Medical Mycology**, Philadelphia, Lea & Febiger, p. 707-729, 1992.
- (5) LUTZ, A. & SPLENDORE, A. Sopra uma micosi in uomini etopi (*Mus decumanus*). Contribuzione alla conoscenza delli cosi dette Sporotricosi (1907) *apud* LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M. & de MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**. São Paulo: SARVIER, 2002. cap. 20, p. 479-497: Esporotricose e outras Micoses Gomosas.
- (6) SPLENDORE, A. Sobre a cultura d'uma nova especie de cogumelo pathogenico *Sporotrichum asteroides* (1908) *apud* LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M. & de MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**. São Paulo: SARVIER, 2002. cap. 20, p. 479-497: Esporotricose e outras Micoses Gomosas.

- (8) DAVIS, D.J. The identity of American and French sporotrichosis (1921) *apud* RIPPON, J.W. Sporotrichosis. In: Rippon, J.W. **Medical Mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes**. Philadelphia: W B Saunders, 1988. cap.11, p. 325-352.
- (9) MCGINNIS, M.R. Mould Identification. In: **Laboratory Handbook of Medical Mycology**, New York, Academic Press Inc., p. 103-336, 1980.
- (10) RIVITTI, E.A. & AOKI, V. Deep Fungal Infections in Tropical Countries. **Clin Dermatol 17**: p. 171-190, 1999.
- (11) RIPPON, J.W. Sporotrichosis. In: Rippon, J.W. **Medical Mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes**. Philadelphia: W B Saunders, 1988. cap.11, p. 325-352.
- (12) CAWLEY, E.P. Sporotrichosis: protean disease with a report of disseminated subcutaneous gummatous case. **Ann Intern Med 30**: p. 1287-1292, 1949.
- (13) KUSUHARA, M.; HACHISUKA, H. & SASAI, Y. Statistical survey of 150 cases with sporotrichosis. **Mycopathologia 102**: p. 129-133, 1988.
- (14) CASTREJÓN, O.V.; ROBLES, M. & ARROYO, O.E.Z. Fatal fungemia due to *Sporothrix schenckii*. **Mycoses 38**: p. 373-376, 1995.
- (15) MAYORGA, R.; CACERES, A.; TORIELLO, C.; ALVAREZ, O. RAMIREZ, M.E. & MARIAT, F. An endemic area of Sporotrichosis in Guatemala. **Sabouradia 16**: p. 185-198, 1978.
- (16) CUADROS, R.G.; VIDOTTO, V. & BRUATTO, M. Sporotrichosis in the metropolitan area of cusco, Peru, and in its region. **Mycoses 33**: p. 231-240, 1990.
- (17) SAMPAIO, S.A.P. Micosis Profundas. In: **Dermatologia Básica**, São Paulo, ESPE, p. 141-149, 1974.

- (18)MARQUES, S.A.; LASTÓRIA, J.C.; CAMARGO, R.M.P.; SUETO, M.; FAGUNDES, L.K. & DILLON, N.L. Sporotrichosis:survey and clinical aspects from Botucatu School of Medicine, state of São Paulo-Brazil. **An Bras Dermatol 72:** p. 343-347, 1997.
- (19)LONDERO, A.T. & RAMOS, C.D. Esporotricose no Rio Grande do Sul: três décadas de observação. **An Bras Dermatol 64:** p. 307-310, 1989.
- (20)LOPES, J.O.; ALVES, S.H.; MARI, C.R.; BRUM, L.M.; WESTPHALEN, J.B.; ALTERMANN, M.J. & PRATES, F.B. Epidemiologia da esporotricose na região central do Rio grande do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop 32:** p. 541-545, 1999.
- (21)CONTI-DIAZ, I.A. Epidemiology of sporotricosis in Latin America. **Mycopathologia 108:** p. 113-116,1989.
- (22)KENYON, E.M.; RUSELL, L.H. & McMURRAY, D.N. Isolation of *Sporothrix schenckii* from potting soil. **Mycopathologia 87:** p. 128, 1984.
- (23)LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M. & de MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica.** São Paulo: SARVIER, 2002. cap. 20, p. 479-497: Esporotricose e outras Micoses Gomosas.
- (24)WIN, R.E. A comteporary view of sporotrichosis. **Current Topics Med Mycol 6:** p.73-94, 1995.
- (25)VIEIRA-DIAS, D.; SENA, C.M.; ORÉFICE, F. TANURE, M.A.G. & HAMDAN, J.S. Ocular and concomitant cutaneous sporotricosis. **Mycoses 40:** p. 197-201, 1997.
- (26)VISMER, H.F. & HULL, P.R. Prevalence, epidemiology and geographical distribution of *Sporothrix schenckii* infections in gauteng, South Africa. **Mycopathologia 137:** p. 137-143, 1997.

- (27)CAMPOS, P.; ARENAS, R.; CORONADO, H. Epidemic cutaneous sporotrichosis. **Int J Dermatol** **33**: p. 38-41, 1994.
- (28)FINDLAY, G.H.; VISMER, H.F. & DREYER, L. Studies on sporotrichosis. pathogenicity and morphogenesis in the Transvaal strains of *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia** **87**: p. 85-93, 1984.
- (29)MACKINNON, J.E.; CONTI-DÍAZ, I.H.; GEZUELE, E.; CIVILA, da LUZ, S. Isolation of *Sporothrix schenckii* from nature and considerations on its patogenicity and ecology. **Sabouraudia** **7**: p. 38-45, 1969.
- (30)READ, S.I. & SPERLING, L.C. Feline sporotrichosis transmission to man. **Arch Dermatol** **118**: p. 429-431, 1982.
- (31)GUARRO, J.; GENÉ, J. & STCHIGEL, A.M. Developments in fungal taxonomy. **Clin Microbiol Rev** **12**: p. 454-500..1999.
- (32)LACAZ, C.S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E.M. & MELO, N.T. Guia para identificação: fungos, actinomicetos, algas de interesse médico, São Paulo, SARVIER, p. 53-344, 1998.
- (33)GARRISON, R.G.; BOYD, K.S. & MARIAT, F. Ultrastructural studies of mycelium to yeast transformation of *Sporothrix schenckii*. **J Bacteriol** **124**: p. 959-968, 1975.
- (34)HOSTETTER, M.K. Adherence molecules in pathogenic fungi. **Cur Opin Infec Dis** **9**: p. 141-145, 1996.
- (35)TRAVASSOS, L.R. Antigenic tructures of *Sporothrix schenckii*..In: Kurstak, E. **Immunology of fungal diseases**. New York. Dekker. 1989. cap.8, p. 193-221.
- (36)FERNANDES, K.S.S.; MATHEWS, H.L. & LOPES BEZZERRA, L.M. Differences in virulence of *Sporothrix schenckii* conidia related to culture conditions and cell wall components. **J Med Microbiol** **49**: p. 195-203, 1999.
- (37)LIMA, O.C. & LOPES-BEZERRA, L.M. Identification of a concanavalin A- biding antigen of the cell surface of

- Sporothrix schenckii*. **J Med Vet Mycol** **35**: p. 167-171, 1997.
- (38)TRAVASSOS, L.R.; GORIN, P.A. & LLOYD, K.O. Comparison of the rhamnomnans from the human pathogen *Sporothrix schenckii* with those from the *Ceratocystis* species. **Infect Immun** **8**: p. 685-693, 1973.
- (39)TAKADA, M. & ISHIZAKI, H. Correlation among culture times, sugar composition and biological activities of *S. schenckii* antigens. **Mycopatologia** **84**: p. 31-39, 1983.
- (40)ODA, L.M.; KUBELKA, C.F.; ALVIANO, C.S. & TRAVASSOS, L.R. Ingestion of yeast forms of *Sporothrix schenckii* by mouse peritoneal macrophages. **Infect Immun** **39**: p. 497-504, 1983.
- (41)MORRIS-JONES, R.; YOUNGCHIM, S.; GOMEZ, B.L.; AISEN, P.; HAY, R.J.; NOSANCHUK, J.D.; CASADEVALL, A & HAMILTON, A.J. synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. **Infect Immun** **71**: p. 4026-4033, 2003
- (42)POLAK, A. Melanin as a virulence factor in pathogenic fungi. **Mycoses** **33**: p. 215-224, 1990.
- (43)ROMERO-MARTINEZ, R.; WHEELER, M.; GUERRER-PLATA, A.; RICO, G. & TORRES-GUERRERO, H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infect Immun** **68**: p. 3696-3703, 2000.
- (44)SGARBI, D.B.; 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** **139**: p. 9-12, 1997.
- (45)LIMA, O.C.; FIGUEIREDO, C.C.; PEREIRA, B.A.S.; COELHO, M.G.P.; MORANDI, V. & LOPEZ-BEZERRA, L.M. Adhesion of the human pathogen *Sporothrix schenckii* to several

- extracellular matrix proteins. **Braz J Med Biol Res** **32**: p. 651-657, 1999.
- (46)TSUBOI, R.; SANADA, T.; TAKAMORI, K. & OGAWA, H. Isolation and properties of extracellular proteinases from *Sporothrix schenckii*. **J Bacteriol** **169**: p. 4104-4109, 1987.
- (47)HADDAD JÚNIOR, V.; MIOT, H.A.; BARTOLI, L.D.; CARDOSO, A.C. & CAMARGO, R.M.P. Localized lymphatic sporotrichosis after fish-induced injury (*Tilapia* sp.). **Med Mycol** **40**: p. 425-427, 2002.
- (48)PAPPAS, P.G.; TELLEZ, I.; DEEP, A.E.; NOLASCO, D. & HOLGADO, W. Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity. **Clin Infect Dis** **30**: p. 65-70, 2000.
- (49)ITOH, M.; OKAMOTO, S. & KARIYA, H. Survey of 200 cases of sporotrichosis. **Dermatologica** **172**: p. 209-213, 1986.
- (50)ESPINOSA-TEXIS, A.; HERNÁNDEZ-HERNANDEZ, F.; LAVALLE, P.; BARBA-RUBIO, J.& LÓPEZ-MATÍNEZ, R. Estudio de 50 pacientes com esporotricosis: evaluación clínica y de laboratório. **Gac Méd Méx** **137**: p. 111-116, . 2001.
- (51)NETO, R.J.P.; MACHADO, A.A.; CASTRO, G.; QUAGLIO, A.S.S. & MARTINEZ, R. Esporotricose cutânea disseminada como manifestação inicial da síndrome da imunodeficiência adquirida-relato de caso. **Rev. Soc Bras Med Trop** **32**: p. 57-61, 1999.
- (52)AL-TAWFIQ, J.A. & WOOL, K.K. Disseminated sporotricosis of *Sporothrix schenckii*: fungemia as the initial presentation of Humans Immunodeficiency Virus infection. **Clin Infect Dis** **26**: p. 1403-1406, 1998.
- (53)MORGAN, M. & REVES, R. Invasive sinusitis due to *Sporothrix schenckii* in a patient with AIDS. **Clin Infect Dis** **23**: p. 1319-1320, 1996.
- (54)DONABEDIAN, H.; O'DONNELL, E.; OLSZEWSKI, C.; MacARTHUR, R. D. & BUDD, N. Disseminated cutaneous

- and meningeal sporotrichosis in an AIDS patient. **Diagn Microbiol Infect Dis 18:** p. 111 - 115, 1994.
- (55)KHABIE, N.; THOMAS, G.B.; GLENN, D.R. & DANA, M.T. Laryngeal sporotrichosis causing stridor in a Young child. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol 67:** p. 819-823, 2003.
- (56)WANG, J.P.; GRANLUND, K.F.; BOZZETE, S.A.; BOTTE, M.J. & FIERER, J. Bursal sporotrichosis: case report and review. **Clin Infect Dis 31:** p. 615-616, Aug. 2000.
- (57)ZHOU, C.H.; ASUNCION, A. & LOVE, G.L. Laryngeal and respiratory tract sporotrichosis and steroid inhaler user. **Arch Pathol Lab Med 127:** p. 893-894, 2003.
- (58)MORGAN, M.A., COCKERILL, F.R.; CORTEJE, D.A. & ROBERTS, G. Disseminated sporotrichosis with *Sporothrix schenckii* fungemia. **Diagn Microbiol Infect Dis 2:** p. 151-155, 1984.
- (59)MENDES-GIANNINI, M.J.S. & MELHEM, M.S.C. Infecções Fúngicas. In: FERREIRA, A.W. & ÁVILA, S.L.M. **Diagnóstico Laboratorial da Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes**. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN S.A., 2001. cap. 33, p. 334-403.
- (60)de ALBORNOZ, M.B. VILLANUEVA, E. & de TORRES, E.D. Application of immunoprecipitation techniques to the diagnosis of cutaneous and extracutaneous forms of sporotrichosis. **Mycopathologia 85:** p. 177-183, 1984.
- (61)CASSERONE, S.; CONTÍ-DIAZ, I.A.; ZANETTA, E.; PEÑA de PEREIRA, M.E. Serologia de la esporotricosis cutánea. **Sabouradia 21:** p. 317-321, 1983.
- (62)SCOTT, E.N.; KAUFMAN, L.; BROWN, A.C. & MUCHMORE, H.G. Serologic studies in the diagnosis and management of meningitis due to *Sporothrix schenckii*. **N Engl J Med 317:** p. 935-940, 1987.
- (63)RODRIGUES, M.T. & RESENDE, M.A. Epidemiologic skin test survey of sensitivity to paracoccidioidin, histoplasmin and

- sporotrichin among gold mine worker of Morro Velho Mining, Brazil. **Mycopathologia** **135**: p. 89-98, 1996.
- (64) STEVENS, D.A.; DOMER, J.E.; ASHMAN, R.B.; BLACKSTOCK, R. & BRUMMER, E. Immunomodulation in mycoses. **J. Med Vet Mycol.** **32**(suppl.1): p. 253-265, 1994.
- (65) CASADEVALL, A.; CASSONE, A.; BISTONI, F.; CUTLER, J.E.; MAGLIANI, W. & MURPHY, J.W. Antibody and/or cell-mediated immunity, protective mechanisms in fungal disease: an ongoing dilemma or an unnecessary dispute? **Med Mycol** **36**(suppl.1): p. 95-105, 1998.
- (66) PLOUFFE Jr, J.F.; SILVA Jr, J.; FEKETY, R.; REINHALTER, E. & BROWNE, R. Cell-mediated immune responses in sporotrichosis. **J Infect Dis** **139**: p. 152-157, 1979.
- (67) CARLOS, I.Z.; SGARBI, D.B.G.; ANGLUSTER, J.; ALVINO, C.S. & LOPES SILVA, L. Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the systemic form of the disease. **Mycopathologia** **117**: p. 139-144, 1992.
- (68) SHIRAISHI, A.; NAKAGAKI, K. & ARAI, T. Role of cell-mediated immunity in the resistance to experimental sporotrichosis in mice. **Mycopathologia** **120**: p. 15-21, 1992.
- (69) DICKERSON, C.L.; TAYLOR, R.T. & DRUTZ, D.J. Susceptibility of congenitally athymic (nude) mice to sporotrichosis. **Infect Immun** **40**: p. 417-420, 1983
- (70) TACHIBANA, T.; MATSUYAMA, T. & MITSUYAMA, M. Involvement of CD4+ T cells and macrophages in acquired protection against infection with *Sporothrix schenckii* in mice. **Med Mycol** **37**: p. 397-404, 1999.
- (71) CENCI, E.; ROMANI, L.; VECCHIARELLI, A.; PUC CETTI, P. & BISTRONI, F. Role of L3T4+ lymphocytes in protective immunity to systemic *Candida albicans* infection in mice. **Infect Immun** **57**: p. 3581-3587, 1989.

- (72)BENO, D.W.; STÖVER, A.G. & MATHEWS, H.L. Growth inhibition of *Candida albicans* hyphae by CD8⁺ lymphocyte. **J Immunol** **154**: p. 5273-5281, 1995.
- (73)KOGA, T.; DUAN, H. & FURUE, M. Immunohistochemical detection of interferon- γ - producing cells in ganuloma formation of sporotrichosis. **Med Mycol** **40**: p. 111-114, 2002.
- (74)TANUMA, H.; ASAI, T.; ABC, M.; NISHIYAMA, S. & KATSUOKA, K. Case Report. Lymphatic vessel-type sporotrichosis: immunohistochemical evalulation and cytokine expression pattern. **Mycoses** **44**: p. 316-320, 2001.
- (75)REX, J.H. & BENNETT, J.E. Administration of potassium iodide to normal volunteers does not increasse killing of *Sporothrix schenckii* by their neutrophils or monocytes. **J Med Vet Mycol** **28**: p. 185-189, 1990.
- (76)LEI, P.C.; YOSHIIKE, T. & OGAWA, H. Effects of proteinase inhibitors on the cutaneous lesion of *Sporothrix schenckii* inoculated hairless mice. **Mycopathologia** **123**: p. 81-85, 1993.
- (77)CUNNINGHAM, K.M.; BULMER, G.S. & RHOADES, E.R. Phagocytosis an intracellular fate of *Sporothrix schenckii*. **J Infect Dis** **140**: p. 815-817, 1979.
- (78)da SILVA, L.C.; BEZERRA, L.M.; AGUIAR, T.S.; TAVARES, D.; ARAUJO, L.M.; PINTO, C.E. & RIBEIRO, O.G. Effect of genetic modifications by selection for immunological tolerance on fungus infecction in mice. **Microbes Infect** **3**: p. 215-222, 2001.
- (79)FERNANDES, K.S.S.; COELHO, A.L.J.; LOPES BEZERRA, L.M. & BARJA-FIDALGO, C. Virulence of *Sporothrix schenckii* conidia and yeast cells, and their susceptibility to nitric oxide. **Immunology** **101**: p. 563-569, 2000.

- (80)CARLOS, I. Z.; ZINI, M.M.C.; SGARBI, D.B.G.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C.S. & LOPES SILVA, C. Disturbances in the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor in disseminated murine sporotrichosis. **Mycopathologia** **127**: p. 189-194, 1994.
- (81)SCOTT, E.N. & MUCHMORE, H.G. Immunoblot analysis of antibody responses to *Sporothrix schenckii*. **J Clin Microbiol** **27**: p. 300-304, 1989.
- (82)MENDOZA, M.; DÍAZ, M.A.; HUNG, M.B.; ZANBRANO, E.A.; DÍAZ, E. & DE ALBORNOZ, M.C. Production of culture filtrates of *Sporothrix schenckii* in diverse culture media. **Med Mycol** **40**: p. 447-454, 2002.
- (83)BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** **72**: p. 248-254, 1976.
- (84)CAMARGO, Z.P. Diagnóstico imunológico das infecções fúngicas. In: SIDRIM, J. J. C. & MOREIRA, J.L.B. **Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica**. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN S.A., 1999. cap.17, p. 200-211.
- (85)HUFFNAGLE, G.B. & DEEPE, G.S. Innate and adaptative determinants of host susceptibility to medically important fungi **Curr Opinion Microbiol** **6**: p. 344-350, 2003.
- (86)CHAROENVIT, Y & TAYLOR, R.L. Experimental sporotrichosis in Syrian hamsters **Infect Immun** **23**: p. 366-372, 1979.
- (87)ROMANI, L. & HOWARD, D.H. Mechanisms of resistance to fungal infections **Curr Opinion Immunol** **7**: p. 517-523, 1995.
- (88)CLARK, T. A. & HAJJEH, R.A. Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses **Curr Opinion Infect Dis** **15**: p. 569-574, 2002.

- (89)MURPHY, J.W., WU-HSIEH, A., SINGER-VERMES, L.M.; FERRANTE, A.; MOSER, S.; RUSSO, M.; VAZ, C.A.C.; BURGER, E.; CALICH, V.L.G.; KOWANKO, I.C.; RATHJEN, D.A.; MARTIN, A.J.; BUCI, R.C. & CHEN, Q. Cytokines in the host response to mycotic agents **J Med Vet Mycol** **32**: p. 203-210, 1994.
- (90)SHER, A. & COFFMAN, R.L. Regulation of immunity to parasites by T cell and T cell derived cytokines **Annu Rev Immunol** **10**: p. 385-409, 1992.
- (91)FIDEL, P.L.Jr & SOBEL, J.D. The role of cell-mediated immunity in candidiasis **Trends Microbiol** **2**: p. 202-206, 1994.
- (92)CALICH, V.L.G.& KASHINO, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection **Braz J Med Biol Res** **31**: p. 615-623, 1998.
- (93)ALLEENDOERFER, R.; BOIVIN, G. P. & DEEPE, G.S. Jr Modulation of immune responses in murine pulmonary histoplasmosis **J Infect Dis** **175**: p. 905-914, 1997.
- (94)SISTO, F.; MILUZIO, A.; LEOPARDI, O.; MAURIZIO, M.; BOELAERT, J.R. & TARAMELL, D. Differential cytokine in the spleens and livers of BALB/c mice infected with *Penicillium marneffei*: protective role of gamma interferon. **Infect Immun** **71**: p. 465-473, 2003.
- (95)ROMANI, L.; MOCCI, S.; BIETTA, C.; LANFALONI, L.; PUC CETTI, P. & BISTONI, F. Th1 and Th2 cytokine secretion patterns in murine candidiasis association of Th1 responses with acquired resistance **Infect immun** **59**: p. 4647-4654, 1991.
- (96)DEEPE, G.S. Jr & GIBBONS, R. Protective efficacy of antigens from *Histoplasma capsulatum* in a murine model of pulmonary histoplasmosis **Infect Immun** **69**: p. 3128-3134, 2001.

- (97) Del SERO, G.; MENCACCI, A.; CENCI, C. F.; d'OSTIANI, C.; MONTAGNOLI, A.; BACCI, P.; KOPF, M. & ROMANI, L. Antifungal type I responses are up-regulated in IL-10-deficient mice **Microbes Infect** **1**: 1169-1180, 1999.
- (98) GRÜNIG, G.; CORRY, D.B.; LEACH, M.W.; SEYMOUR, B.W.P.; KURUP, V.P. & RENNICK, D.M. Interleukin-10 is a natural supressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis **J Exp Med** **185**: p. 1089-1100, 1997.
- (99) MOORE, K.W.; MALEFYT, R.W.; COFFMAN, R.L. & O' GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor **Ann Rev Immunol** **19**: p.683-765, 2001.
- (100) SHIMONAKA, H.; NOGUCHI, KT; KAWAI, K.; HASEGAWA, I.; NOZAWA, Y & ITO, Y. Immunochemical studies on the human pathogen *Sporotrix schenckii*: effects of chemical and enzymatic modification of the antigenic compounds upon immediate and delayed reactions **Infect Immun** **11**: p. 1187-1194, 1975.
- (101) TSUBOI, R.; SANADA, T. & OGAWA, H. Influence of culture medium pH and proteinase inhibitors on extracellular proteinase activity and cell growth of *S. schenckii*. **J Clin Microbiol** **26**: p. 1431-1433, 1988.
- (102) SETHI, K.K. & SCHWARS, J. Experimental cutaneous sporotrichosis (1965) *apud* TACHIBANA, T.; MATSUYAMA, T. & MITSUYAMA, M. Involvement of CD4+ T cells and macrophages in acquired protection against infection with *Sporothrix schenckii* in mice. **Med Mycol** **37**: p. 397-404, 1999.
- (103) MATTHEWS, R. & BURNIE, J. Antifungal antibodies: a new approach to the treatment of systemic candidiasis **Curr Opinion Invest Drugs** **2**: p. 472-476, 2001.

- (104)MUKHERJEE, S.; SCHARFF, M.D. & CASADEVAL, A. Protective murine monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans* **Infect Immun** **60**: p. 4354-4541, 1992.
- (105)CALICH, V.L.& BURGUER, E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection **Res Immunol** **149**: p. 407-417, 1998.
- (106)BAIDA, H.; BISELLI, P.J.C.; JUVENALE, M.; Del NEGRO, G.M.B.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; DUARTE, A.J.S. & BERNARD,G. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis
- (107)KWAN-LIM, G.; FORSYTH, K.P.& MAIZELS, R.M. Filarial-specific IgG4 response correlates with active *Wuchereria bancrofti* infection **J Immunol** **145**: p. 4298-4305, 1990.
- (108)KURNIAWAN, A., YAZDANBAKHS, M.; van REE, R.; AALBERSE, R.; SELKIRK, M.E.; PARTONO, F. & MAIZELS, R.M. Differential expression of IgE and IgG4 specific antibody responses in asymptomatic and chronic human filariasis **J Immunol** **150**: p. 3941-3950, 1993.
- (109)MUKHERJEE, S.; FELDMESSER, M. & CASADEVAL, A. Murine macrophage-like cell interactions with *Cryptococcus neoformans* in the presence and absence of opsonins **J Infect Dis** **173**: p.1222-1231, 1996.
- (110)NUSSBAUM, G.; YUAN, R.; CASADEVALL, A. & SCHARFF, M.D. Immunoglobulin G3 blocking antibodies to the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* **J Exp Med** **183**: p. 1905-1909, 1996.
- (111)YUAN, R.R.; SPIRA, G.; OH, J.; PAIZI, M. CASADEVALL, A & SCHARFF, M.D. Isotype switching increases efficacy of antibody production against *Cryptococcus neoformans* infection in mice **Infect Immun** **66**: p. 1057-1062, 1998.

- (112) MONARI, C.; CASADEVALL, A.; RETINI, C.; BALDELLI, F.; BISTONI, L. & VECCHIARELLI, A. Antibody to capsular polysaccharide enhances the function of neutrophils from patients with AIDS against *Cryptococcus neoformans* **AIDS** **13**: p. 653-660, 1999.
- (113) VECCHIARELLI, A. & CASADEVALL, A. Antibody-mediated effects against *Cryptococcus neoformans* evidence for interdependency and collaboration between humoral and cellular immunity **Res Immunol** **149**: p. 321-333, 1998.
- (114) de BERNARDIS, F.; BOCCANERA, M.; ADRIANI, D.; SPREGHINI, E.; SANTONI, G. & CASSONE, A. Protective role of antimannan and anti-aspartyl proteinase antibodies in an experimental model of *Candida albicans* vaginitis in rats **Infect Immun** **65**: p. 3399-3405, 1997.
- (115) HAN, Y.; KOZEL, T.R.; ZHANG, M.X.; MacGILL, R.S.; CARROL, M.C. & CUTLER, J.E. Complement is essential for protection by an IgM and an IgG monoclonal antibody against experimental, hematogenously disseminated candidiasis **J Immunol** **167**: p. 1550-1557, 2001.
- (116) CARLOS, I.Z.; SGARBI, D.B. & PLACERES, M.C. Host organism defense by a peptide-polysaccharide extracted from the fungus *Sporothrix schenckii* **Mycopathologia** **144**: p. 9-14, 1998-99.
- (117) KLEIN, B.S. & JONES, J.M. Isolation, purification, and radiolabeling of a novel 120-kDa surface protein on *Blastomyces dermatitidis* yeasts to detect antibody in infected patients **J Clin Invest** **81**: p. 152-161, 1990.
- (118) NEGI, M.; TSUBOI, R.; MATSUI, T. & OGAWA, H. Isolation and characterization of proteinase from *Candida albicans* **J Invest Dermatol** **83**: p. 32-36, 1984.

- (119)SANYAL, A.K.; DAS, S.K. & BANERJEE, A.B. Purification and partial characterization of an exocellular proteinase from *Trichophyton rubrum* **Sabouraudia** **23**: p. 165-178, 1985.
- (120)TAKIUCHI, I.; HIGUCHI, D., SEI, Y. & KOGA, M. Isolation of extracellular proteinase (keratinase) from *Microsporum canis* **Sabouraudia** **20**: p. 281-288, 1982.
- (121)TSUBOI, R.; KO, I.; TAKAMORI, K & OGAWA, H. Isolation of a keratinolytic proteinase from *Trichophyton mentagrophytes* with enzymatic activity at acidic pH **Infect Immun** **57**: p. 3479-3483, 1989.

ANEXOS

ANEXOS**Anexo 1 - Meios de cultivo para *S. schenckii*:****Meio ágar-Sabouraud**

Ágar Sabouraud à 4% de glicose (MERCK).....	65 g
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

Meio ágar BHI

Ágar infusão cérebro coração (OXOID)..	47 g
Água destilada q.s.p...	1000 mL

Anexo 2 - Meio para preparação do exoantígeno de *S. schenckii***Meio “yeast nitrogen – Casamino Acids glucose” (YCG)**

Yeast nitrogen base	6,7g
Ácido Casamino	2,5 g
Dextrose	50 g
Mistura vitamínica.....	1mL
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

Mistura vitamínica

Tiamina dicloreto	50 mg
Riboflavina.....	50 mg
Piridoxina hidrocloreto	10 mg
Ácido p-aminobenzóico.....	10 mg
Inositol.....	10 mg
Água destilada q.s.p.....	100 mL

Anexo 4 - Coloração pela prata

1. Metanol 50%+ ácido acético 12% + formaldeído 0,01%.....10 min
2. Etanol 50%.....10 min
3. Etanol 50%.....10 min
4. Etanol 50%.....10 min
5. Na₂S₂O₃ 0,02%.....10 min
6. AgNO₃ 2g/L +700µL/L de formaldeído a 37%.....10 min
7. Na₂CO₃ 60g/L+ Na₂S₂O₃ 4mg/L +500 µL/L de formaldeído a 37%.....até a revelação das bandas
8. Metanol 50%+ ácido acético 12 +formaldeído 0,01%.....5 min
9. Metanol 50%.....5 min

Todos os reagentes foram dissolvidos em água bidestilada e cada etapa foi realizada sob leve agitação. Entre cada etapa seguiu-se três lavagens com água bidestilada.

ANEXO 3 - Reagentes para SDS-PAGE**Soluções para o preparo do gel de poliacrilamida****Tabela 1:** Proporções dos componentes utilizados no preparo dos géis de poliacrilamida para eletroforese vertical – SDS-PAGE.

Solução Estoque	Gel de separação 12%(acrilamida)	Gel de empilhamento 3% (acrilamida)
Acrilamida – Bisacrilamida (30%: 0,8%)	6 mL	0,65 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	3,75 mL	----
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	----	1,25 mL
Água bidestilada	5,25 mL	3,05 mL
Persulfato de amônia a 10%	50 µL	25 µL
TEMED	20 µL	10 µL

Tampão de amostra

Tris-HCl 0,5 M pH 6,8

20% SDS

10% de glicerol

0,1% de azul de bromofenol

2-β- mercaptoetanol a 10%

Tampão de corrida pH8.3

Tris 0,025 M

Glicina 0,192 M

0,1% de SDS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

*Certificamos que o Projeto “Identificação e Caracterização de Componentes Antigênicos de Sporothrix Schenckii” (Protocolo nº06), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). **Rosana Cícera Nascimento** e do orientador(a) Sandro Rogério de Almeida, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 10/03/2003.*

São Paulo, 10 de março de 2003.

Elfriede Bacchi

Prof. Assoc. Elfriede Marianne Bacchi
Coordenadora da CEEA