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

**Estudo da interação de *Sporothrix shenckii*
com macrófagos murinos**

Daniele de Lima Franco

Tese para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

São Paulo
2009

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

F825e Franco, Daniele de Lima
Estudo da interação de *Sporothrix shenckii* com macrófagos
murinos / Daniele de Lima Franco. -- São Paulo, 2009.
50p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Almeida, Sandro Rogério de

1. Fungos : Doenças : Imunologia I. T. II. Almeida, Sandro
Rogério de, orientador.

616.969079 CDD

Daniele de Lima Franco

**Estudo da interação de *Sporothrix shenckii*
com macrófagos murinos**

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Mestre

Profº Dr Sandro Rogério de Almeida
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, 10/08 de 2009.

Dedico essa tese aos meus pais, Marielsa e Carlos, e à minha irmã Luciane, que me acompanharam e me apoiaram diante das alegrias e das angústias, entenderam minhas ausências e possibilitaram a realização deste estudo. Amo vocês.

Agradecimentos

Agradeço com muito carinho à você Pietro, que me deu todo incentivo e amparo necessário, nos momentos de felicidade e dificuldades.

Aos avós Beatriz e Miguel pelo carinho e apoio.

À Luciane, Alex e Yan, pelas alegrias e pelo companheirismo.

À Marilúcia, Amauri, Bruno e Gustavo pelos momentos compartilhados e pelo carinho.

À Fraine, Kleber, Cláudio, Nina, Nicolli, Raphael, Sandro e Camila pelos agradáveis momentos e amizade.

À Adriana Ronchetti por me fazer acreditar que sou capaz e por me incentivar a buscar vitórias.

Agradecimentos

Sou muito grata ao Professor Sandro, que me recebeu em seu laboratório, acreditou no meu trabalho e em minha pessoa e me deu todo suporte necessário. Obrigada pelo aprendizado, paciência, atenção, e apoio.

Aos amigos de laboratório Eliver, Karla, Suelen, Vanessa, Karen, Glória, Gisele, Rosana, Viviane e Sônia, obrigada pelo apoio e amizade.

Fernanda, Elaine, Kátia Lucas, Carol e Mariama pelo suporte e amizade.

Aos amigos Renato e Wilton pelos agradáveis momentos.

Ao Maurício, Dorley, Cláudia, Rose, muito obrigada pelo apoio e atenção.

Introdução.....	1
Objetivos.....	2
Material e Métodos.....	10
Fungos.....	10
Macrófagos.....	10
Ensaio de fagocitose.....	10
Microscopia eletrônica.....	11
Análise de viabilidade das leveduras de <i>S. schenckii</i> após fagocitose por macrófagos , contendo soro, laminarina e manana.....	11
Dosagem de citocinas.....	12
Caracterização de macrófagos através de citometria de fluxo.....	13
Dosagem de NO.....	13
Extração de RNA-total.....	13
Quantificação do RNA total.....	14
Síntese de cDNA.....	14
RT-PCR semiquantitativo.....	14
Estatística.....	15
Resultados.....	16
Ensaio de fagocitose.....	16
Microscopia eletrônica.....	17
Produção de citocinas por macrófagos após interação <i>in vitro</i> com <i>S. schenckii</i>	18
Caracterização dos macrófagos por citometria de fluxo.....	24
Produção de RNAm por TLR4, TLR2, TNF- α , IFN- γ , IL-10, iNOS e MyD88 em macrófagos J774-16.....	25
Viabilidade de leveduras.....	27
Produção de IL-10, TNF- α e IFN- γ após fagocitose com 1 e 3 dias	28
Produção de Óxido Nítrico após incubação dos macrófagos com células leveduriformes de <i>S. schenckii</i>	29
Produção de Óxido Nítrico após incubação dos macrófagos com células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> opsonizadas com soro de camundongos infectados.....	30
Viabilidade de leveduras após fagocitose na presença de soro, laminarina	

ou manana.....	30
Produção de RNAm por iNOS em macrófagos após incubação com soro.....	32
Discussão.....	33
Conclusões.....	39
Referências Bibliográficas.....	40

Resumo

Sporothrix schenckii, um fungo dimórfico, termo-dependente, é encontrado na natureza associado com matéria orgânica em decomposição, como, espinhos, folhas secas, madeira e também na água. Este fungo é o agente causador da esporotricose, que ocorre com maior frequência em pessoas que trabalham com o solo e vegetais contaminados com os esporos do fungo, sendo considerada uma doença ocupacional.

A contaminação acontece com a inoculação traumática do material contaminado e em alguns casos por inalação dos esporos. Quando infecta o organismo humano, bem como outros mamíferos ou quando cultivado a 37°C, passa para a forma de levedura. É comum em áreas de clima tropical e subtropical, com alta umidade. Apresenta distribuição mundial, sendo que, atualmente no Brasil, são relatados casos em São Paulo, Rio de Janeiro e no Rio Grande do Sul. No Rio de Janeiro, a esporotricose tem sido relatada como doença endêmica, onde o agente etiológico é transmitido de gatos para homens.

A esporotricose apresenta caráter crônico, polimórfico e com formação granulomatosa. As formas clínicas e a patogênese dependem do sítio de inoculação do fungo e da resposta imunológica do hospedeiro. O mecanismo de defesa e suscetibilidade do organismo, bem como a disseminação da infecção por este fungo ainda não são totalmente conhecidos. O estado de saúde do paciente contribui diretamente para o estabelecimento da doença, sendo que, alcoolismo, diabetes, imunidade comprometida e uso extensivo de drogas imunossupressoras são fatores que podem predispor à infecções severas.

Neste trabalho estudamos *in vitro* a interação do *S. schenckii* com macrófagos murinos. Por meio de técnicas de fagocitose, ELISA, dosagem de óxido nítrico, viabilidade de leveduras, citometria de fluxo e RT-PCR foram realizados ensaios da atividade de macrófagos. Desta forma foram gerados alguns dados para o melhor entendimento da resposta de defesa nesta doença.

Nos estudos realizados, concluímos que os anticorpos gerados nos camundongos pela infecção por *S. schenckii* foram capazes de induzir a fagocitose do fungo. Também, após a fagocitose das leveduras pelos macrófagos, incubados com laminarina ou

manana, houve inibição significativa da produção de TNF- α , indicando que os receptores dectina-1 e manose, respectivamente, estão relacionados à produção desta citocina. O soro, contendo os anticorpos do animal infectado, também induziu forte produção desta citocina, mostrando que a entrada do fungo via receptor Fc pode também induzir a produção dessa citocina. Verificamos ainda que a fagocitose de leveduras, pelos macrófagos, na presença de soro de camundongo infectado, induziu alta produção de IL-10.

Quando analisamos a expressão de genes presentes nos macrófagos, observamos forte expressão de TLR-2 e MyD-88, na presença das leveduras. Já a expressão de iNOS pelos macrófagos, observamos que foi maior na presença do fungo somente quando as leveduras foram incubadas com o soro, após o período de 72 horas. Em seguida, ao dosar a produção de Óxido Nítrico (NO), verificamos no período de 3 dias de incubação, que houve redução significativa na concentração de NO produzida pelos macrófagos, quando estes foram incubados com o fungo. Porém, quando as leveduras foram opsonizadas pelo soro, houve aumento da produção de NO após 72 horas de incubação. Outra verificação importante foi que os macrófagos foram capazes de destruir as leveduras fagocitadas na presença de soro.

Abstract

Sporothrix schenckii is a dimorphic fungus, term-dependent, find in nature associated with organic material at decomposition, like thorns, wheat leaves, wood and water. This is the fungi agent that causes sporothricosis, which happens with more frequency with people that work with land and green, contaminated with mold of fungus. That is why it is considered a occupational disease.

The contamination happens with traumatic inoculation of material and some cases with inhalation of mold. When a human is infected, as well as other mammals or when cultivate at 37°C, it turns into the yeast form. Is common at tropical and moisture weather areas. Is found all around the world, and nowadays at Brazil, with cases related São Paulo, Rio de Janeiro and Rio Grande do Sul. At Rio de Janeiro, sporothricosis are related like endemic disease, where the etiologic agent is transmitted by cats to men. Sporothricosis is a chronic, polimorfic disease, and with form granulamatosa. The clinical type and the pathogenesis depend on the way of inoculation and the response of immunological system of the host. The defense and suscepibility of the organism, as dissemination of infection with this fungi is not yet totally known. The patient's health state contributes directly to the disease, as much as alcoholism, diabetes and immunity deficiency and the extensive use of immunosuppressive drugs are factors that can bring to harder infection.

Here, we studied *in vitro* the interaction of *S. schenckii* with murine macrophages. Using phagocytosis assay, ELISA, dosage of oxide nitric, CFU assay, flow citometry and RT-PCR were analysed activity of macrophages. We produced some results in order to better understand the response of defense with this disease.

In the present study, we conclude that antibodies generated in mice by infection with *S. schenckii* were capable to promote phagocytosis of fungus. Also, when macrophages and yeast were incubated with laminarin or mannan, we had significant decrease in production of TNF- α , showing that receptors dectin-1 and manose, respectively, are related with production this cytokine. The antibodies of mice infected with *S. schenckii*, also produced hard level this cytokine showing that entrance of fungus by receptor Fc can produce TNF- α . Besides, we verify that phagocitosys of yeast, with sera of infected mice, induct hard production of IL-10.

When we analysed the expression of genes of macrophages, we observed hard expression of TLR-2 and MyD-88, when yeast were present. However, the expression of iNOS by macrophages, was more hard with yeast only when sera was present, before 72 hours. Similarly, when yeast were opsonized by sera, we had increase of production of NO after 72 hours of incubation. After, macrophage were capable to destruct yeast phagocytosed when sera was present.

Introdução

A Esporotricose foi descrita pela primeira vez por um estudante de medicina, Benjamin Shenck em 1898 em Baltimore. Depois de isolado o microrganismo, este foi enviado ao micologista Erwin Smith, que conclui que o agente pertencia ao gênero *Sporotrichum*. Em 1900, a mesma doença foi relatada por Hektoen & Perkins, que classificaram o agente etiológico como *Sporothrix schenckii* (Lipstein-Fresch, et al, 1985). O *S. schenckii* é um fungo dimórfico termo-dependente, sendo que esta característica de transição dimórfica foi descrita por Howard (1961). O fungo pertence a subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Hyphomycetes* (Kwon-Chung, K.J. et al, 1992). O primeiro relato no Brasil foi feito por Lutz & Esplendore em 1907 (Lipstein-Fresch, et al, 1985).

O fungo, é encontrado na natureza, em áreas de clima tropical e subtropical, com alta umidade, sob a forma de micélio (Criseo, et al, 2008). Quando infecta o organismo humano, bem como outros mamíferos ou quando cultivado a 37°C, passa para a forma de levedura. É encontrado na natureza, associado com matéria orgânica em decomposição, como por exemplo, espinhos, folhas secas, madeira e também na água (Revisado por Lopes Bezerra, et al, 2006). Ocorre com maior frequência em pessoas que trabalham com o solo e vegetais contaminados com esporos de *S. schenckii*, sendo considerada uma doença ocupacional, atingindo floristas, agricultores e mineradores (Coles, F.B., et al, 1992, Dixon, D.M., et al, 1991, Hajjeh, R, et al, 1997, Dooley, D.P., et al, 1997, Criseo, et al, 2008). A contaminação acontece com a inoculação traumática do material contaminado e em alguns casos por inalação dos esporos (Rippon, 1988, Conti Diaz, 1989, Elgart, 1992, Radentz, et al, 1992, Davis, 1996).

A doença se distribui mundialmente atingindo pessoas e algumas espécies de animais. Na Europa o primeiro caso foi descrito em 1903, sendo que mais de 200 foram registrados ao longo de 10 anos (Mackinnon, et al, 1969), sendo de ocorrência rara no continente atualmente (Revisado por Lopes-Bezerra, et al, 2006). Na Itália, 16 casos de esporotricose foram registrados no período de 1978 a 1992 numa província do sudeste da Italia e alguns casos têm sido descritos em outras regiões do país atualmente (Criseo, et al, 2008). A doença ocorre mais comumente de modo esporádico, porém epidemias têm sido descritas (Matter, et al, 1984), como o ocorrido na África do Sul, na década de

40 (Shiraishi, et al, 1992). Um estudo epidemiológico realizado na Índia, no período de janeiro de 2005 a junho de 2006, relatou que a maior parte dos casos ocorreram nos estados do noroeste do país (Agarwal, 2008). Foi observado aumento da incidência no Japão, em parte atribuído ao melhor preparo médico para o diagnóstico (Kusuhara, et al, 1988).

A maior parte dos casos são relatados nas Américas do Norte e do Sul (principalmente México, Colômbia, Uruguai e Brasil) (Kusuhara, et al, 1988, Simson, et al, 1947, Northoff, et al, 1986, D'Alessio, et al, 1965, Crevasse, et al, 1960, Lopes, J.O., et al, 1999). Na Venezuela se constitui a micose subcutânea de maior incidência na área urbana, onde as condições geográficas e climáticas são favoráveis para o desenvolvimento deste fungo (Mendonza, 2007). Conte-Diaz (1980), registrou no Uruguai grande frequência de casos da doença em caçadores de tatus, estes animais são infectados pelo fungo por habitarem um nicho propício ao desenvolvimento deste (Kwon-Chung, et al, 1992). O fungo pode infectar outros animais como mulas, ratos, camundongos, coelhos, cachorros, bois e pássaros, os quais podem ser fonte de contaminação para humanos (Previato, et al, 1979).

Atualmente no Brasil, a esporotricose é relatada em São Paulo, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro (Gutierrez Galhardo, et al, 2008). De 1945 a 1954, a doença teve alto índice na cidade de São Paulo, compreendendo 0,5% de todas as dermatoses registradas no Hospital das Clínicas, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. A incidência de casos diminuiu, provavelmente, devido à industrialização e urbanização, a melhora no diagnóstico no início da doença e ao tratamento adequado (Sampaio, et al, 1954).

No Rio de Janeiro, a esporotricose tem sido relatada como doença endêmica, onde o agente etiológico é transmitido de gatos para homens. Desses casos, 85% dos cachorros e 83,4% dos pacientes possuem contato constante com gatos infectados com esporotricose (Schubach, et al, 2008). Tem sido identificada principalmente em áreas onde a situação socioeconômica é menos privilegiada e as condições de saúde são precárias. Entre 1998 e 2004, foram diagnosticados, por Lopes-Bezerra em 2006, na região metropolitana, 759 casos em humanos, 1.503 em gatos e 64 em cachorros.

A esporotricose apresenta caráter crônico, polimórfico e com formação granulamatosa (Morris-Jones, 2002). As formas clínicas e a patogênese dependem do sítio de inoculação do fungo e da resposta imunológica do hospedeiro. Os pacientes são geralmente adultos saudáveis com menos de 30 anos de idade (Kaplan, et al, 1963,

citado por Matter, et al, 1984). A esporotricose na infância é rara na maior parte dos países, porém, casos isolados ligados à atividade recreacional têm sido demonstrados. Foram diagnosticados 81 casos da doença em crianças abaixo de 15 anos de idade entre 1998 e 2004, parte desses casos estão relacionados ao contato com gatos (Barros, 2008).

Uma vez que ocorre a inoculação do fungo na epiderme, o patógeno pode infectar o organismo em 7 a 30 dias. A inoculação dos esporos produz lesão em 14 dias, na epiderme lesionada previamente, entretanto, quando são inoculados na epiderme sadia, a lesão inicia após 60 dias. Há relatos de pessoas que foram inoculadas pelo patógeno mas não desenvolveram a doença, demonstrando imunidade à esporotricose (Revisado por Rivitti, et al, 1999).

A maior parte dos pacientes apresenta forma localizada ou subcutânea. As manifestações clínicas da doença podem ser agrupadas da seguinte forma:

- Linfocutânea: é a mais freqüente forma da doença, afetando partes expostas do corpo como rosto e membros. Os primeiros sintomas aparecem aproximadamente 3 semanas depois da infecção, mas podem ser retardados a 6 semanas em alguns casos. As lesões iniciais consistem de pequenas pápulas eritematosas indolores, as quais podem aumentar de tamanho em dias ou semanas. Embora as lesões possam permanecer únicas, é comum o alastramento para regiões próximas, formando lesões nodulares discretas. As lesões secundárias produzidas ao longo dos vasos linfáticos se manifesta como pápulas, nódulos ou placas eritematosas. Algumas lesões iniciam-se violáceas e então se tornam ulceradas no centro. Pequena quantidade de fluído sérico ou pus pode ser secretado da lesão e a maior parte dos pacientes necessita de tratamento.
- Cutânea-fixa: ocorre menos comumente e é caracterizada por lesão localizada sem envolvimento linfático. As regiões comumente afetadas são: face, tronco, joelho e dedos, sendo que se apresentam na forma de nódulos que podem ser ulcerados e ocasionalmente formar pequenas lesões satélites nas proximidades.
- Cutânea-disseminada: é raramente demonstrada, sendo descrita clinicamente como lesões disseminadas por várias partes do corpo, podendo anunciar o começo de esporotricose osteoarticular.

- Extra-cutânea: ocorre por alastramento hematogênico, ocasionalmente de regiões da inoculação primária ou linfonodos regionais (Janes, et al, 1987), porém mais comum é o alastramento a partir do foco pulmonar. A disseminação da doença pode afetar regiões como: joelho, cotovelo, tornozelo ou punho. Pode atingir o Sistema Nervoso Central, formando múltiplos abscessos cerebrais ou meningite crônica. O alastramento sistêmico pode representar difícil tratamento e pode causar relevante morbidade e mortalidade.

O estado de saúde do paciente contribui diretamente para o estabelecimento da doença, sendo que, alcoolismo, diabetes e uso extensivo de drogas imunossupressoras são fatores de risco e podem predispor a infecções severas, incluindo esporotricose pulmonar e osteoarticular (Revisado por Kauffman, 1999). A infecção pode ser bastante severa também em imunocomprometidos (Lipstein-Fresch, et al, 1985, Matter, et al, 1984) sendo que, infecções locais ou sistêmicas podem ocorrer com pouca ou nenhuma evidência (Velasco-Castrejón, et al, 1976).

No aspecto macroscópico, os isolados clínicos de *S. schenckii* produzem colônias com aspecto membranoso e superfície rugosa a 25°C. A princípio, as colônias apresentam a coloração branca a creme, se tornando marrom, cinza escuro ou preto com o tempo (Lacaz, 1998, citado por Lopes Bezerra, et al, 2006). A 37°C, o aspecto das colônias é cremoso e úmido, de coloração creme. No aspecto microscópico, a fase miceliar é caracterizada por hifas delgadas, hialinas, septadas e ramificadas. No ápice das hifas há formação de uma vesícula e a partir desta, um conidióforo, onde implantam-se conídeos ovalados, esta forma é denominada de “margarida”. As colônias na fase leveduriforme apresentam células leveduriformes ovais, arredondadas ou em forma de charuto (Lopes Bezerra, et al, 2006).

Fatores como aeração, presença de CO₂, fonte de carbono, cálcio e pH podem influenciar a transição morfológica (Rodriguez-Del Valle, et al, 1984, Alsina, et al, 1984), entretanto, a temperatura é o fator determinante no dimorfismo (Lopes Bezerra, et al, 2006).

A presença de melanina na parede celular pode exercer um papel protetor do patógeno, uma vez que este pigmento funciona como captador de radicais-livres (Romero Martinez, et al, 2000, Morris Jones, et al, 2003). Ao estudar a atividade da melanina presente nos conídeos, Romero-Martinez, et al (2000) observaram que o pigmento conferiu maior resistência à fagocitose e destruição por monócitos humanos e

macrófagos murinos em relação aos conídeos com ausência de melanina. Os resultados demonstraram que este pigmento confere proteção ao *S. schenckii* contra compostos antimicrobianos oxidativos e ao ataque de macrófagos.

A parede celular tem papel central na interação fungo-hospedeiro, mediando vários processos associados com a patogênese deste microrganismo. Esta parede consiste de glucanas alcalinas solúveis e insolúveis encontradas em ambas as fases morfológicas (Previato, et al, 1979).

Lúcia Mendonça (1976) estudou os polissacarídeos do *S. schenckii*, encontrando proporções diversas de ramnose e galactose. A fração contendo 33,5% de glicoproteínas, 57% de manose e 14,2% de proteínas é chamada de peptidioramnomanana, foi isolada da parede celular da fase leveduriforme. Esta fração glicoprotéica reagiu com soro de pacientes com esporotricose e com concavalina A (ConA) (Lloyd, et al, 1971, Travassos, et al, 1977). Cardoso (1984) estudou os glicolipídios, tanto na fase miceliana como na fase leveduriforme, fracionadas por cromatografia. Neste estudo foi notada a predominância de ácido oléico na forma de levedura e do ácido linoléico na de micélio (Kwon-Chung, et al, 1992).

O diagnóstico da esporotricose pode ser realizado pela localização de uma estrutura denominada corpo asteróide, cuja estrutura e formação não são ainda completamente entendidos. Ao estudar a relação do corpo asteróide com a resposta imune do hospedeiro, Da Rosa, et al (2008), aplicaram o teste de imunofluorescência indireta, onde IgG e IgM tiveram ligação com a estrutura em estudo. O corpo asteróide formado na esporotricose é, provavelmente, uma estrutura que o patógeno forma, utilizando moléculas de defesa do hospedeiro e criando resistência. Gezuele, et al (2005), utilizaram a técnica de identificação do corpo asteróide por microscopia como diagnóstico da esporotricose cutânea, onde foram analisados 80 pacientes. Os autores mencionam a importância da técnica como diagnóstico rápido, porém a identificação desta estrutura pode ser exaustiva (Rodriguez, 1998).

A esporotriquina pode ser utilizada na realização de estudos epidemiológicos e como método auxiliar na detecção de formas atípicas da doença (Toriello, et al, 1991). O teste da esporotriquina é utilizado na reação intradérmica em cobaias e humanos (Nielsen Jr, 1968). No entanto, este teste pode fornecer resultado falso-positivo em pacientes saudáveis ou falso-negativo em pacientes doentes (Scheneidau, 1964, Lopes-Bezerra, et al, 2006). A esporotriquina consiste de antígenos isolados de filtrado de cultura ou antígenos isolados de células leveduriformes. Antígenos isolados de filtrado

de cultura são altamente heterogêneos e a reatividade positiva no teste intradérmico e na imunodifusão depende das condições de cultura (Takata, et al, 1983).

Lopes-Bezerra, et al, (2006), aplicaram a técnica para detecção de IgG em materiais clínicos, como líquido sinovial e fluido cérebro-espinhal para o diagnóstico de pacientes com esporotricose meníngea e esporotricose osteo-articular, respectivamente. O teste sorológico, por ELISA, apresenta grande utilidade para diagnóstico de pacientes em tratamento (Bernardes-Engemann, et al, 2005).

Em 1984, Albornoz et al, proporam os testes de imunodifusão e de imunoeletroforese no diagnóstico da esporotricose utilizando um filtrado de cultura como antígeno e o soro do paciente com a forma cutânea disseminada. A caracterização de antígenos específicos, facilmente padronizados expandiu a possibilidade de utilização de métodos sorológicos como ferramenta no diagnóstico de micoses sistêmicas e de forma não-invasiva. Este método é principalmente utilizado em caso de esporotricose extra-cutânea, permitindo a seleção de um tratamento adequado.

Plouffe, J.F., et al, em 1979, estudaram a resposta imune mediada por células induzida na esporotricose cutânea e disseminada, no qual padronizaram um ensaio de proliferação de linfócitos com mitógenos e antígenos de *S. schenkii*, durante o período da doença ativa e tratamento. Enquanto pacientes com esporotricose cutânea mostraram imunidade mediada por células preservada, os pacientes com doença sistêmica tiveram uma significativa diminuição na resposta.

Ao comparar a resposta de camundongos com timo e atímicos, infectados com *S. schenkii*, foi verificado maior sensibilidade à infecção nos atímicos (Shiraishi, et al, 1979, Shiraishi, et al, 1992). A resposta sugere que células derivadas do timo desenvolvem importante papel na resistência à infecção pelo fungo (Shiraishi, et al, 1992). A descoberta da interação imune no combate à doença indica que a resposta é controlada, em parte, por mediadores solúveis (citocinas) produzidas por macrófagos. Citocinas são importantes na resposta inflamatória aguda ou crônica e as predominantemente envolvidas são IL-1 e TNF, as quais medeiam respostas inflamatórias locais e sistêmicas (Dinarello, 1984, Oppenheim, et al, 1986, Northoff, et al, 1986, Silva, et al, 1992). As citocinas citadas são produzidas por monócitos e macrófagos na resposta a agentes infecciosos ou endotoxinas (Dinarello, et al, 1984, Oppenheim, et al, 1986), sendo que possuem atividade microbicida e síntese de proteínas regulatórias. No estudo citado acima, foi demonstrado que a produção de ambas citocinas são bastante prejudicadas no camundongo infectado com *S. schenkii*.

O óxido nítrico (NO) é um importante mediador da resposta imune. A eliminação de microrganismos por macrófagos depende de eventos como fagocitose e liberação de agentes tóxicos ao microrganismo, como intermediários do oxigênio e nitrogênio. O NO possui importante papel na eliminação de parasitas intracelulares, viroses e algumas bactérias (Ding, 1988, citado por Carlos, 2003). Carlos, et al (2003), estudaram o efeito do composto ergosterol, contido na parede celular, e de exoantígenos de *S. schenckii*, onde foi analisada a interação de macrófagos peritoniais com o fungo dosando a produção de NO e TNF- α . Os autores concluíram que os compostos lipídicos da parede celular desenvolvem um importante papel na patogenia desta micose, inibindo o processo fagocítico, outro dado observado foi a alta liberação de NO e TNF- α por macrófagos.

O sistema complemento é um dos principais mecanismos de defesa da imunidade humoral e um importante mecanismo efetor da imunidade inata. A ativação do complemento é inibida por proteínas reguladoras presentes nas células do hospedeiro normal e ausentes nos microrganismos. O complemento pode ser ativado por três vias: clássica, alternativa e das lectinas. A clássica normalmente necessita da interação de anticorpos, a alternativa pode ser ativada independentemente destes, por lipopolissacarídeos e outros polissacarídeos presentes na parede celular de microrganismos (Scott, et al, 1986). E a via das lectinas é desencadeada por uma proteína plasmática chamada lectina de ligação à manose (MBL), que reconhece resíduos terminais de manose em glicoproteínas e glicolipídeos microbianos. Todas essas vias levam a produção de C3b, que é responsável pela fagocitose e opsonização (Abul K. Abbas, 2008).

Nascimento & Almeida em 2005, realizaram um estudo da imunidade humoral, no qual foi analisada a produção de anticorpos contra antígenos solúveis e fracionados de *S. schenckii*. Na 1ª semana após a infecção experimental em camundongos BALB/c, houve formação de carga fúngica, que diminuiu drasticamente após 14 dias de infecção. A análise imunoquímica mostrou que o soro dos camundongos apresentaram anticorpos reativos com o antígeno 70 kDa, com IgG1 e IgG3 predominantes, evidenciando atividade específica humoral nos camundongos infectados. Dando continuidade ao estudo, Nascimento, et al, em 2008, produziram um anticorpo monoclonal (mAb) contra a glicoproteína 70 kDa de *S. schenckii*. Os resultados mostraram significativa redução do número de UFCs em órgãos de camundongos pela injeção do mAb, que foi administrado antes e durante a infecção. O mAb foi também injetado após a infecção ter

sido estabelecida e foi observado redução das UFCs, associado com o aumento da produção de IFN- γ .

O mecanismo de defesa e suscetibilidade do organismo, bem como a disseminação da infecção por este fungo ainda não são totalmente conhecidos. Neste trabalho estudamos *in vitro* a interação do *S. schenckii* com macrófagos murinos. Por meio técnicas de ensaio de fagocitose, ELISA, citometria de fluxo e RT-PCR foram realizados ensaios da atividade de macrófagos. Desta forma foram gerados alguns dados para o melhor entendimento da resposta de defesa na doença.

Objetivos

- Determinar o índice fagocítico (IF) de macrófagos após fagocitose das leveduras;
- Avaliar os possíveis receptores utilizados pelo fungo no processo fagocítico;
- Avaliar a capacidade dos macrófagos em destruir o fungo após fagocitose;
- Por meio de RT-PCR pretende-se determinar a expressão dos genes para TLR-2, TLR-4, MyD88, iNOS, TNF- α , IL-10, IL-4 e IFN- γ pelos macrófagos após fagocitose;
- Dosar citocinas IL-10, IL-12, TNF- α , IL-1 e IL-6 liberadas por macrófagos após fagocitose;
- Determinação das moléculas de superfície: CD80, CD86, MHC-II, CD54, CD40 por meio de citometria de fluxo.

Material e Métodos

Fungos

Foi utilizado o isolado M-64 de *S. schenkii*, obtido de material clínico de um paciente com esporotricose linfocutânea. Este isolado é mantido 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, à temperatura de 25°C, sob óleo mineral. Foi revertido para a fase leveduriforme em ágar BHI a 37°C e mantido através de repiques a cada 15 dias.

Macrófagos

Foram utilizados para todos os experimentos macrófagos murinos da linhagem J774-16, originariamente derivados de sarcoma de camundongos BALB/c. Os macrófagos foram cultivados a 37°C em estufa de CO₂ com meio RPMI com 10% de SFB (Meio R10) (SFB - Soro Fetal Bovino, Cultilab).

Ensaio de Fagocitose

Os macrófagos foram contados em câmara de Neubauer, e ajustados na proporção de 3 leveduras para cada macrófago.

Em cada orifício da placa para cultura celular contendo 24 orifícios (Corning-COSTAR, EUA) foi colocado uma lamínula de vidro de 13 mm de diâmetro. Posteriormente, adicionada a suspensão celular de macrófagos na concentração de 1×10^5 células/mL em meio RPMI. As células foram incubadas a 37°C, em estufa contendo 5% de CO₂, na presença de umidade por 16 horas. As lamínulas foram lavadas com RPMI para retirar as células que não aderiram. Em seguida, foi acrescentado, em cada orifício, a suspensão de células leveduriformes de *S. schenkii*, na concentração de 3×10^5 leveduras e incubadas por 4 horas.

Para o ensaio de inibição da fagocitose, após o período de aderência dos macrófagos nas lamínulas, estas foram lavadas e as células cultivadas na presença de laminarina ou manana nas concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL (Sigma-Aldrich – EUA) por 30 minutos. Após este período, foi adicionada a suspensão de células leveduriformes.

Para avaliar a influência dos anticorpos contidos no soro do camundongo infectado, a suspensão de células leveduriformes foi incubada com o soro diluído nas proporções de 1:50, 1:100 e 1:200. Após o período de incubação de 30 minutos a 37°C, essa suspensão foi adicionada a cultura de macrófagos.

Após os ensaios de fagocitose as lamínulas foram coradas por Giemsa e 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.

Microscopia eletrônica

Os macrófagos foram contados e colocados em placa de cultura celular como descrito anteriormente. Após o período de 16 horas, as leveduras foram cultivadas com soro e adicionadas à placa na proporção de 3 leveduras para cada macrófago. Após o período de 4 horas de incubação, as células foram fixadas de um dia para outro em 2,5% de glutaraldeído a 0,1M e tampão de sódio (pH 7,2) a 4°C. Em seguida, a suspensão foi lavada por 3 vezes em PBS e fixada em 2% de osmium por 2 horas. As amostras foram, então, desidratadas em etanol (25 a 100%) e cobertas com ouro (12nm). As células puderam ser visualizadas no microscópio eletrônico GOL X-100 em um aumento de 5000 e 10000x.

Análise de viabilidade das leveduras de *S. schenckii* após fagocitose por macrófagos, contendo soro, manana e laminarina

Os macrófagos foram cultivados com as células leveduriformes, contendo soro, manana ou laminarina e como controle, somente macrófagos com as células leveduriformes. O ensaio foi realizado em placa de 24 orifícios com incubação de 1 ou 3 dias, numa proporção de 3 leveduras para cada macrófago, ajustados em câmara de Neubauer e incubadas em estufa, a 37°C em 5% de CO₂. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e os orifícios foram lavados 2 vezes com PBS estéril para remoção das leveduras não fagocitadas. Em seguida, adicionado a cada orifício, 1mL de água destilada para lisar as células e promover a liberação das leveduras internalizadas. Deste conteúdo, foi coletado 250µL e diluído a 1.600 vezes em PBS, posteriormente, 600µL da suspensão foi semeada numa placa de Petri contendo meio Sabouraud. As

placas foram mantidas em estufa a 30°C até o crescimento das unidades formadoras de colônias (UFC) do fungo.

Dosagem de Citocinas

O sobrenadante obtido após o ensaio de fagocitose foi coletado para dosagem das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, e TNF- α . A técnica utilizada para a dosagem foi ELISA de captura, utilizando anticorpos monoclonais de captura e detecção contra as citocinas, nas concentrações recomendadas pelo fabricante (Peprotech ou BD Biosciences). A técnica foi realizada como descrito a seguir:

- A placa de microtitulação de 96 poços foi sensibilizada com anticorpo de captura diluído em PBS, e deixada por 16 horas a temperatura ambiente;
- A solução contida nos wells foi removida e a placa foi lavada 4 vezes com a solução de lavagem PBS contendo Tween-20 a 0,05%;
- Foi realizado bloqueio de sítios livres da placa com PBS contendo 1% de BSA (Soro Albumina Bovina), por 1 hora a temperatura ambiente e após este período, a lavagem dos poços por 4 vezes;
- Incubação dos sobrenadantes de cultura e das citocinas recombinantes diluídas em PBS contendo 0,1% de BSA e tween-20 a 0,05%, por 2 horas a temperatura ambiente;
- Lavagem dos poços por 4 vezes;
- Adição dos anticorpos de detecção diluídos PBS contendo 0,1% de BSA e tween-20 a 0,05% e incubados por 2 horas a temperatura ambiente;
- Lavagem dos poços por 4 vezes;
- Incubação com conjugado estreptoavidina-peroxidase por 30 minutos a temperatura ambiente;
- Lavagem dos poços
- Revelação com o-fenilenodiamina 1 mg/mL diluída em tampão fosfato 0,4M citrato de sódio pH 5,3 por 15-30 minutos
- A reação foi bloqueada com H₂SO₄ 4N e a leitura das densidades ópticas (DO) foi feita por meio de um leitor automático, com comprimento de onda de 492nm.
- As concentrações de citocinas nos sobrenadantes foram calculadas com base na equação da reta de regressão linear da curva padrão obtida com citocinas recombinantes murinas.

Caracterização de macrófagos através de citometria de fluxo

Os macrófagos, na concentração de 1×10^6 , foram cultivados na presença de 3×10^6 leveduras de *S. schenkii* e após 4 horas, o sobrenadante foi retirado e acrescentado PBS com 3% de SFB em cada orifício e deixados no gelo por 15 minutos. Os macrófagos foram retirados da placa e colocados em tubos. Os anticorpos de marcação: CD80, CD86, MHC-II, CD40 e CD54, previamente titulados, foram adicionados à cada alíquota e incubados no gelo por 30 minutos. Após incubação, a suspensão foi fixada em 2% de glicose, 1% de formaldeído, diluído em PBS, até análise.

Dosagem de NO

Os macrófagos foram incubados com as leveduras na presença e ausência de soro de camundongos infectados, nas condições já descritas anteriormente, e após 4 horas de cultivo o sobrenadante foi retirado para quantificação de Óxido Nítrico (NO) liberado pelos macrófagos.

Análise da expressão de RNAm de TLR-2, TLR-4, MyD88, iNOS, TNF- α , IL-10, IFN- γ e IL-4 de células macrofágicas após interação com *S. schenkii*

Extração do RNA-total

Macrófagos, na concentração de 1×10^6 células, foram cultivados na presença de 3×10^6 células leveduriformes em placa de 6 poços e após 4 horas foram submetidos a extração de RNA pelo reagente Trizol (Invitrogen – Auckland, New Zealand).

As células foram ressuspensas em 500 μ L de Trizol para cada 10^6 células e submetidas a agitação. O material foi incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Após este período foi adicionado 100 μ L de clorofórmio e então agitado manualmente e incubado por 15 segundos a temperatura ambiente. O material foi centrifugado (4°C a 15.000g, por 15 minutos), desta forma o conteúdo foi separado em três fases: fenol-clorofórmio, interfase (DNA) e fase aquosa (RNA). A fase aquosa foi transferida para outro tubo e neste adicionado 250 μ L de álcool isopropílico para precipitar o RNA. A solução foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugada (4°C a 15.000g, por 10 minutos) e o sobrenadante desprezado, permanecendo o RNA precipitado.

Na sequência, o RNA foi lavado com 1mL de etanol 75% e centrifugado (4°C a 15.000g, por 5 minutos). O pellet foi deixado secar por 15 a 30 minutos e ressuspendido em 20 µL de água livre de RNase (DEPC). O RNA extraído foi submetido a quantificação e síntese de cDNA (as amostras que não puderam ser convertidas à cDNA em seguida, foram armazenadas a temperatura de -80°C até o uso).

Quantificação do RNA total

Uma alíquota de cada preparação de RNA extraído foi quantificado pelo método espectrofotométrico a 260 nm e a pureza avaliada em um comprimento de onda 280/260 nm (Beckman DU 640 spectrophotometer, Roche, EUA).

Síntese de cDNA

Após a quantificação do RNA, foi sintetizada a primeira fita de cDNA por meio de SuperScript e Random hexâmeros do kit Super Script First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, CA, EUA). Cada reação de 10 µL de volume final continha, (1µL) de Oligo dT, (1 µL) de 10mm dNTP mix e volume variável de RNA para cada amostra. Esta reação foi incubada a 65° C durante 5 minutos e logo após, resfriados no gelo, por pelo menos 1 minuto. Um segundo “mix”, contendo (2,5 µL) de 1x RT Buffer, (5 µL) de 25mm MgCl₂, (5 µL) de 0,1 M DTT e (1,25 µL) de “RNase OLIGO” foi adicionado à reação. A reação foi incubada em 42°C por 2 minutos e logo após, foi adicionado (1 µL) de Super Script II RT e incubado por 42 °C por 50 minutos e a 70°C por 15 minutos. No final da reação foi adicionado (1 µL) de RNase H e incubado a 37 °C por 20 minutos para remover as fitas de RNA que não foram convertidas a cDNA. As preparações de cDNA obtidas foram estocadas a - 20 °C até o uso.

RT-PCR semiquantitativo

A primeira fita de cDNA sintetizada foi submetida à técnica de RT-PCR semiquantitativo. O cDNA foi amplificado em reação de PCR utilizando Taq DNA polimerase, tampão de enzima, e iniciadores específicos. As sequências de cDNA utilizadas foram, obtidas no Gen Bank com número de acesso para TLR-2: AF124741 e para TLR-4: AF095353. Os primers do RT-PCR para: TLR 2 serão: 5'- ACA GCT TAC TGT GAC TCT CCG CC-3' e 5'-GGT CTT GGT GTT ATT ATC TTG CGC-3'.

Para TLR4: 5'-GAC CTC AGC TTC AAT GGT GC-3' e 5'-TAT CAG AAA TGC TAC AGT GGA TAC C-3'. Para MyD88: 5'-CAC CTG TCT GGT CCA TT-3' e 5'-CGC AGG ATA CTG GGA AAG T-3'. Para iNOS: 5'-(F): CAT GGC TTG CCC CTG GAA GTT TCT CTT CAA AG-3' e 5'-GCA GCA TCC CCT CTG ATG GTC CCA TCG-3'. Para TNF- α : 5'-GGC AGG TCT ACT TTG GAG TCA TTG C-3' e 5'-ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TCG G-3'. Para IFN- γ : 5'-AGC GGC TGA CTG AAC TCA GAT TGT AG-3' e 5'-GTC ACA GTT TTC AGC TGT ATA GGG-3'. Para IL-10: 5'-CCA GTT TTA CCT GGT AGA AGT GAT G-3' e 5'-TGT CTA GGT CCT GGA GTC CAG CAG ACT CAA-3'. Para IL-4: 5'-CAT CGG CAT TTT GAA CGA GGT CA-3' e 5'-CTT ATC GAT GAA TCC AGG CAT CG-3'.

As reações foram padronizadas para um volume de 30 μ L, contendo 22 μ L de Platinum mix, 1,3 μ L de $MgCl_2$, 0,1 μ L de enzima Taq DNA polimerase e 0,6 μ L de água DEPC. Logo em seguida, foi acrescentado 2 μ L da amostra de cDNA, 2 μ L de Primer-forward e 2 μ L de Primer-reverse. As amplificações foram realizadas em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf), com as condições ideais para cada primer. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1 % utilizando TBE 0,5 (Trisma base 0,1 M, ácido bórico 0,09M e EDTA 1mM) como tampão de corrida. As amostras foram coradas em brometo de etídio (10 μ g/mL) e visualizadas em luz UV. Como controle positivo, utilizamos a enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HPGRT), presente em todas as células eucariontes.

Estatística

Os resultados obtidos foram analisados pelo método One-Way ANOVA e múltiplas comparações pelo método de Turkey. O nível de significância admitido foi de $p < 0,05$, em todas as amostras analisadas. Cada um dos experimentos foram realizados pelo menos 3 vezes, aqui foram representados uma média destes.

Resultados

Ensaio de Fagocitose

A linhagem de macrófagos J774-16 foi cultivada com as células leveduriformes de *S. schenckii* a fim de estudarmos as possíveis vias de fagocitose. Para observarmos a fagocitose de leveduras opsonizadas, soro de animais BALB/c infectados com *S. schenckii* foi colocado em contato com os fungos por 30 minutos. Após este período, esta suspensão foi adicionada às culturas de macrófagos.

Utilizamos manana e laminarina a fim de estudar as possíveis interações do fungo com receptores de manose e dectina-1, respectivamente. Desta forma, manana ou laminarina foram adicionadas aos macrófagos nas concentrações 50, 100, e 200µg/mL 30 minutos antes da adição das células leveduriformes.

Os nossos resultados mostraram que os macrófagos aumentaram a capacidade de fagocitose quando leveduras foram incubadas com soro de animal infectado na diluição de 1:200 (Figura 1A).

Como pode ser observado na figura 1B, a laminarina induziu a diminuição do índice de fagocitose, com 100 e 200 µg/ml. O mesmo fenômeno foi observado quando adicionado de 50 µg/ml de manana, como demonstra a figura 1C.

Figura 1: A – Indução experimental da fagocitose por meio de soro de animal BALB/c infectado com células leveduriformes de *S. Schenckii* nas diluições 1:50, 1:100 e 1:200. B – Inibição experimental da fagocitose por meio de laminarina nas concentrações 50, 100, e 200 µg/mL. C – Inibição experimental da fagocitose por meio de manana nas concentrações 50, 100, e 200 µg/mL. * $p < 0,05$ em relação ao controle (macrófagos na presença de células leveduriformes).

Microscopia eletrônica

Após aderência dos macrófagos na placa, as leveduras foram cultivadas com soro e adicionadas à cultura, na proporção de 3 leveduras para cada macrófago, para observarmos e confirmarmos a capacidade dos macrófagos J774-16 fagocitarem *S. schenckii* opsonizados por IgG. Após o período de 4 horas de incubação, as células foram fixadas e visualizadas no microscópio eletrônico GOL X-100 em um aumento de

5000 e 10000x. Na figura abaixo, podemos observar que os macrófagos internalizaram eficientemente as leveduras de *S. schenckii* opsonizadas.

5000x

10000x

Figura 2: Microscopia eletrônica dos macrófagos J774-16 após fagocitose das células leveduriformes de *S. Schenckii* opsonizadas com soro de animal BALB/c infectado na diluição 1:200, incubadas pelo período de 4 horas. As flechas indicam as leveduras fagocitadas. Aumento de 5000 e 10000x.

Produção de citocinas por macrófagos após interação *in vitro* com *S. schenckii*

Após o período de incubação de 4 horas entre macrófagos e células leveduriformes de *S. schenckii*, o sobrenadante de cultura foi coletado a fim de observarmos o padrão de citocinas produzido após a fagocitose do fungo. As citocinas, dosadas por ELISA, foram IL-6, IL-10, TNF- α , IL-12 e IL-1 β .

O soro de camundongo infectado (Figura 3) induziu um aumento significativo de IL-6 com a diluição de 1:200, em relação aos controles (macrófagos e macrófagos na presença de células leveduriformes). A presença de laminarina no cultivo dos macrófagos com as células leveduriformes apresentou produção de IL-6, porém não foi significativo. A manana induziu produção significativa de IL-6 com a concentração de 50 μ g/mL. Quando incubamos os macrófagos com laminarina e manana, não houve produção desta citocina (resultado não demonstrado).

Figura 3: Produção da citocina IL-6, quantificada a partir do sobrenadante de cultura de macrófagos com células leveduriformes. A - Na presença de soro de animal BALB/c infectado, nas diluições de 1:50, 1:100 e 1:200. B - Na presença de laminarina, nas concentrações 50, 100 ,e 200µg/mL. C - Na presença de manana nas concentrações 50, 100 ,e 200µg/mL. * $p < 0,05$ em relação ao controle (macrófagos na presença de células leveduriformes).

A fagocitose de leveduras na presença de soro de camundongo infectado (Figura 4) induziu alta e significativa produção de IL-10 em todas as diluições de soro utilizadas. A incubação com laminarina induziu produção de 1.112,62 pg/mL de IL-10,

com a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ sendo um aumento significativo em relação ao controle. Na dosagem do sobrenadante contendo manana na incubação, o resultado foi significativamente maior em relação ao controle na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ (1.245,1 pg/mL) e 100 $\mu\text{g/mL}$ (1.087,15 pg/mL). A presença de laminarina e manana na cultura, induziu a diminuição da produção desta citocina em relação aos controles.

Figura 4: Produção da citocina IL-10, medido a partir do sobrenadante de cultura de macrófagos com células leveduriformes. A - Na presença de soro de animal BALB/c infectado, nas diluições 1:50, 1:100 e 1:200. B - Na presença de laminarina, nas concentrações 50, 100, e 200 $\mu\text{g/mL}$. C - Na presença de manana nas concentrações 50, 100, e 200 $\mu\text{g/mL}$. D - Na presença de laminarina e manana nas concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$. * $p < 0,05$ em relação ao controle (macrófagos na presença de células leveduriformes).

A produção de TNF- α , quando os macrófagos foram incubados com soro, foi significativamente maior com as diluições de 1:100 e 1:200, alcançando 934 pg/mL. Os resultados obtidos após a fagocitose de leveduras na presença de laminarina mostrou que a produção de TNF- α foi inibida com todas as concentrações utilizadas. A produção de TNF- α por macrófagos incubados com manana foi significativamente menor, em relação ao controle, quando a concentração de 100 μ g/mL foi utilizada. Também, a produção desta citocina foi significativamente diminuída quando os macrófagos foram incubados com laminarina e manana (Figura 5).

Figura 5: A - Produção de citocinas TNF- α , quantificado a partir do sobrenadante de cultura de macrófagos com células leveduriformes na presença de soro de animal BALB/c infectado, nas diluições 1:50, 1:100 e 1:200. B - Na presença de laminarina, nas concentrações 50, 100, e 200 μ g/mL. C - Na presença de manana nas concentrações 50, 100 e 200 μ g/mL. D - Na presença de laminarina e manana, nas concentrações 50, 100 e 200 μ g/mL. * p <0,05 em relação ao controle (macrófagos na presença de células leveduriformes).

A Produção de IL1- β pelos macrófagos, quando as leveduras foram opsonizadas pelo soro de camundongo infectado, foi significativamente maior em relação ao controle. Quando os macrófagos foram incubados com laminarina, houve diminuição significativa da produção desta citocina, em relação ao controle. Obtivemos redução significativa, porém, pequena quando as células foram incubadas com manana. Houve grande e significativa redução, na produção desta citocina, quando as células foram incubadas com laminarina e manana ao mesmo tempo (Figura 6).

Figura 6: A - Produção de citocinas IL1- β , quantificada a partir do sobrenadante de cultura de macrófagos com células leveduriformes na presença de soro de animal BALB/c infectado, nas diluições 1:50, 1:100 e 1:200. B – Na presença de laminarina, nas concentrações 50, 100, e 200 μ g/mL. C – Na presença de manana nas concentrações 50, 100 e 200 μ g/mL. D - Na presença de laminarina e manana, as concentrações 50, 100 e 200 μ g/mL. * $p < 0,05$ em relação ao controle (macrófagos na presença de células leveduriformes).

Após opsonização das leveduras pelo soro do camundongo infectado, a produção de IL-12 encontrada foi menor em relação ao controle. Quando incubamos os macrófagos com laminarina, houve diminuição significativa da produção desta citocina, em relação ao controle. De forma similar, quando os macrófagos foram incubados com manana, a produção de IL-12 foi significativamente menor em relação ao controle, porém, pequena. Já quando as células foram incubadas com laminarina e manana, houve grande e significativa diminuição da produção desta citocina, em relação ao controle (Figura 7).

Figura 7: A - Produção da citocina IL12, quantificada a partir do sobrenadante de cultura de macrófagos com células leveduriformes na presença de soro de animal BALB/c infectado, nas diluições 1:50, 1:100 e 1:200. B - Na presença de laminarina, nas concentrações 50, 100, e 200µg/mL. C - Na presença de manana nas concentrações 50, 100 e 200µg/mL. D - Na presença de laminarina e manana, nas concentrações 50, 100 e 200µg/mL. *p<0,05 em relação ao controle (macrófagos na presença de células leveduriformes).

Caracterização dos macrófagos por citometria de fluxo

Após fagocitose das leveduras pelos macrófagos, foi realizada incubação com os anticorpos CD86, CD80, CD40, CD54 e de MHC-II para análise da expressão dos receptores de membrana.

Nos ensaios de citometria de fluxo realizados, não houve diferença na intensidade de fluorescência nessas moléculas quando macrófagos foram incubados com as células leveduriformes. Entretanto, foi observado que um menor número de macrófagos expressavam essas moléculas na presença do fungo (Figura 8). Esses resultados foram obtidos em todas as análises realizadas, abaixo representamos um dos ensaios.

Figura 8: Fenotipagem de macrófagos J774-16 na presença de células leveduriformes de *S. schenckii* por citometria de fluxo. Análise dos receptores de membrana CD86 (marcado com FITC), CD80, CD40, CD54 e de MHC-II (marcado com PE) presentes nos macrófagos. Vermelho: controle (fmo), azul: macrófagos e verde: macrófagos na presença do fungo.

Produção de RNAm por TLR4, TLR2, TNF- α , IFN- γ , IL-10, iNOS e MyD88 em macrófagos J774-16

Para estudarmos a expressão de TLR4, TLR2, TNF- α , IFN- γ , IL-10, iNOS e da molécula adaptadora MyD88, os macrófagos J774-16 foram cultivados na presença ou ausência de células leveduriformes por 4 horas e submetidos a extração total de RNA, síntese de cDNA e RT-PCR semiquantitativo. Como controle da reação de RT-PCR, foi utilizado HPGRT que é expresso em todas as células eucariontes.

A expressão de TLR-4 pelos macrófagos foi bastante fraca e não houve diferença de expressão com presença ou ausência do fungo. Na figura abaixo podemos observar que a expressão de TLR-2 e de MyD88 pelos macrófagos, foi maior quando estes foram incubados com o fungo, em relação ao controle de macrófagos.

IL-10 foi expressado pelos macrófagos de forma fraca, porém, sem variação quando o fungo estava presente ou ausente. A expressão de IFN- γ foi bastante fraca quando os macrófagos foram incubados com o fungo, e com a ausência deste não houve expressão. Já a expressão de iNOS pelos macrófagos, podemos observar na Figura 9 que foi maior na ausência do fungo.

Figura 9: Os macrófagos foram incubados na presença ou ausência das células leveduriformes pelo período de 4 horas. Após este período foram realizadas a extração de RNA, cDNA e RT-PCR para verificar a expressão de TLR-4, TLR-2, MyD88, IL-10, IFN- γ , iNOS e TNF- α . A: Macrófagos J774-16 com presença das células leveduriformes, B: Macrófagos J774-16 e C: HPGRT (utilizado como controle, com os macrófagos).

Viabilidade de leveduras

Com o objetivo de analisar a diferença na viabilidade das leveduras após fagocitose, com diferentes períodos de incubação, cultivamos os macrófagos com as células leveduriforme por 1 e 3 dias. Após o período de incubação, as células contidas nos orifícios da placa foram semeadas em placa de Petri contendo ágar Sabouraud a fim de obtermos as UFC (Unidades Formadoras de Colônia).

Nossos resultados mostraram que, macrófagos sem estímulo não foram capazes de destruir as leveduras fagocitadas, onde observamos um aumento significativo das UFCs após 3 dias de cultura quando comparados com 1 dia (Figura 10).

Figura 10: Unidades formadoras de colônias (UFC) de *S. schenkii* após 1 e 3 dias de fagocitose por macrófagos. * $p < 0,05$ quando comparado com 1 dia

Produção de IL-10, TNF- α e IFN- γ após fagocitose com 1 e 3 dias de incubação

A dosagem de citocinas foi realizada com os macrófagos na presença e ausência de células leveduriformes por 1 e 3 dias para verificar a quantidade liberada por essas células nestes tempos de incubação. O maior nível de IL-10 produzido pelos macrófagos na presença do fungo foi de 614,3 pg/mL com 3 dias de cultivo, porém não foi significativo em relação ao controle de 3 dias. Ao dosar TNF- α , produzido pelos macrófagos, detectamos apenas produção basal da citocina. Na dosagem da citocina IFN- γ , produzida pelos macrófagos, não foi detectada produção da citocina na presença do fungo (Figura 11).

Figura 11 – Produção de IL-10, TNF- α e IFN- γ por macrófagos na presença e ausência de células leveduriformes com 1 e 3 dias de incubação. * $p < 0,05$ em relação ao controle (macrófagos na presença de células leveduriformes).

Produção de Óxido Nítrico após incubação dos macrófagos com células leveduriformes de *S. schenckii*

Para estudarmos os possíveis mecanismos microbicidas liberados por macrófagos durante a fagocitose, foi realizada a dosagem de NO.

A figura 12 mostra produção similar de NO dos macrófagos na presença de leveduras com 1 dia de incubação em comparação ao controle. Já no período de 3 dias de incubação houve redução significativa na concentração de NO produzida pelos macrófagos quando estes foram incubados com o fungo.

Figura 12: Produção de NO após incubação de macrófagos com células leveduriformes nos períodos de 1 e 3 dias. O NO foi dosado a partir do sobrenadante de cultura após o período de incubação. * $p < 0,05$ em relação ao controle (macrófagos na presença de células leveduriformes).

Produção de Óxido Nítrico após incubação dos macrófagos com células leveduriformes de *S. schenckii* opsonizadas com soro de camundongo infectado

Após observação dos resultados acima, onde encontramos forte redução de óxido nítrico produzida pelos macrófagos, quando as leveduras estavam presentes, incubamos as leveduras com o soro de camundongo infectado com *S. schenckii*. Relatamos que o soro não induziu aumento da produção de óxido nítrico, em relação ao controle. Entretanto, não foi observado uma queda da produção de NO, após 3 dias, como observado no experimento anterior.

Figura 13: Produção de NO após incubação de macrófagos com células leveduriformes opsonizadas com soro de camundongo infectado com *S. schenckii*, nos períodos de 1 e 3 dias. O NO foi dosado a partir do sobrenadante de cultura após o período de incubação.

Viabilidade de leveduras após fagocitose na presença de soro, laminarina ou manana

Com o objetivo de analisar a diferença na viabilidade das leveduras após fagocitose com diferentes estímulos, cultivamos os macrófagos com as células leveduriforme por 1 e 3 dias na presença de soro, laminarina ou manana. Após o período de incubação, as células contidas nos orifícios da placa foram semeadas em placa de Petri contendo ágar Sabouraud a fim de obtermos as UFC (Unidades Formadoras de Colônia).

Nossos resultados mostraram que os macrófagos foram capazes de destruir leveduras fagocitadas, na presença de soro. Esse dado demonstra que apesar das

leveduras opsonizadas com soro fossem mais fagocitadas, os macrófagos mostraram maior capacidade microbicida. Foi também observado no período de 3 dias uma diminuição significativa da viabilidade das leveduras quando macrófagos foram incubados na presença de laminarina. Por outro lado, quando os macrófagos foram incubados com manana, não foi observada diferença na viabilidade das leveduras (Figura 14).

Figura 14: A - Viabilidade das leveduras após fagocitose por macrófagos com presença de soro do animal BALB/c infectado nas diluições de 1:200 por 1 e 3 dias. B – Viabilidade das leveduras após fagocitose com presença de laminarina na concentração de 200 µg/mL. C – Viabilidade das leveduras após fagocitose na presença de manana na concentração de 200µg/mL. Controle *p<0,05 em relação ao controle (macrófagos na presença de células leveduriformes).

Produção de RNAm por iNOS em macrófagos após incubação com soro

Ao analisar, por meio da técnica de RT-PCR, que os macrófagos tiveram a expressão de iNOS reduzida quando as leveduras estavam presentes, e que após a fagocitose das leveduras com presença de soro de camundongo infectado, houve redução das UFCs, com atividade fungicida, realizamos um ensaio incubando as leveduras com soro para observar uma possível atividade dos anticorpos. Analisamos então a expressão de iNOS pelos macrófagos, após incubação das leveduras com soro. Verificamos que após 72 horas de incubação, a expressão de iNOS foi maior quando as leveduras foram opsonizadas com o soro, em relação ao controle de macrófagos.

Figura 15: Os macrófagos foram incubados na presença ou ausência das células leveduriformes pelo período de 4 (I), 24 (II) e 72 (III) horas. Após este período foram realizadas a extração de RNA, cDNA e RT-PCR para verificar a expressão de iNOS. A: Macrófagos J774-16 com presença das células leveduriformes opsonizados com soro de camundongo infectado com *S. schenckii*, B: Macrófagos J774-16 e C: HPGRT (utilizado como controle, com os macrófagos).

Discussão

Por meio dos ensaios de fagocitose, foi possível observar que os anticorpos gerados nos camundongos pela infecção por *S. schenckii*, exerceram importante atividade. Esses anticorpos, presentes no soro do animal foram capazes de induzir a fagocitose de *S. schenckii*. Isso pode ser explicado pelo fato de que os macrófagos possuem receptores para a região Fc das moléculas de anticorpo, sendo que estes opsonizam os microrganismos e promovem a fagocitose pela ligação desse receptor com o anticorpo. Porém, não podemos excluir a participação de proteínas do complemento nesse processo, pois essas proteínas não foram inativadas.

De acordo com a revisão de Underhill em 2002, a ligação de manana ao receptor de manose é suficiente para induzir a internalização de partículas. Entretanto, quando bloqueamos o receptor de manose nos macrófagos, por meio da incubação de manana, a inibição da fagocitose foi muito baixa, sugerindo que a participação desse receptor no processo de internalização de leveduras de *S. schenckii* possa ser limitada. Como citado por Lawrence et al em 2008, a dectina-1 tem sido estudada quanto ao reconhecimento de fungos patogênicos e é expressada na maior parte das células de defesa, sendo responsável por fagocitose e morte dos fungos pelos macrófagos e outras células. Nos nossos resultados, podemos observar a inibição da fagocitose por meio do bloqueio de dectina-1, porém a diminuição foi pequena, o que também mostra, a baixa participação desse receptor no processo de fagocitose.

A fagocitose promovida por manana pode gerar sinais pro-inflamatórios, onde são produzidas as citocinas IL-1 β , IL-6 (Yamamoto, 1997), TNF- α (Stein, 1991, Garner, 1994) e IL-12 (Shibata, 1997). Apesar de termos obtido pouca redução da fagocitose quando as células foram incubadas com manana ou laminarina, nos nossos resultados observamos que a manana na concentração de 100 μ g/mL foi capaz de diminuir significativamente a produção de TNF- α em relação aos controles. Também, após a fagocitose das leveduras pelos macrófagos, incubados com laminarina, houve inibição da produção de TNF- α . Esses resultados podem sugerir que, apesar desses receptores não participarem ativamente no processo de fagocitose, estariam envolvidos na ativação de eventos relacionados com a produção de TNF- α , principalmente o receptor dectina-1. Adicionalmente, o soro induziu forte produção desta citocina mostrando que a entrada do fungo via receptor Fc pode também induzir a produção dessa citocina.

A IL-6 atua na imunidade natural e adquirida, sendo sintetizada por fagócitos mononucleares, células do endotélio vascular, fibroblastos e outras células e também é produzido em resposta a outras citocinas, como IL-1 e TNF- α . Na imunidade natural, ela estimula proteínas de fase aguda. Na imunidade adquirida, estimula o crescimento de linfócitos B produtores de anticorpos. Nos ensaios realizados, verificamos baixa produção de IL-6, produzida pelos macrófagos. Como citado acima, a via de entrada de manose poderia ativar a produção desta citocina, mas isto não foi observado em nossos resultados.

A IL-1 β é mediadora da resposta inflamatória do hospedeiro na imunidade inata, em infecções e outros estímulos. A principal fonte celular da citocina são os macrófagos ativados e é produzida por produtos bacterianos como LPS e por outras citocinas como TNF- α . Na dosagem de IL-1 β , detectamos alta e significativa produção da citocina, quando as células leveduriformes foram incubadas com soro, porém o controle obtido foi bastante alto. Quando os macrófagos foram incubados com laminarina ou manana, houve diminuição significativa da produção da citocina. Também, quando os macrófagos foram incubados com laminarina e manana ao mesmo tempo, houve redução significativa.

IL-12 é o principal mediador da resposta imune natural inicial a microrganismos intracelulares, sendo essencial na imunidade mediada por células. Apresenta papel de ativação das células Natural Killer (NK), estimula a produção de IFN- γ pelas células T e células NK. Obtemos significativa redução na produção da citocina, quando os macrófagos foram incubados com laminarina ou manana. Quando foram incubados com laminarina e manana ao mesmo tempo, houve redução alta e significativa na produção da citocina, indicando que os receptores dectina-1 e manose estão fortemente relacionados a produção de IL-12.

A IL-10 é produzida principalmente por macrófagos ativados e células T reguladoras. Esta citocina tem a função de regular e inibir as atividades de células de defesa como os macrófagos, inibindo a produção de IL-12, IFN- γ e expressão de co-estimuladores e moléculas MHC de classe II. Está envolvida na imunidade natural e mediada por células (Abbul K Abbas, 2008). Sendo que, quando as leveduras foram opsonizadas com soro e incubadas com os macrófagos, houve grande produção da citocina. Obtivemos também, redução de IL-10, em relação ao controle, quando os macrófagos foram incubados com laminarina e manana. Ainda, observamos que com

72 horas de interação dos macrófagos com as leveduras, sem estímulo, houve grande produção de IL-10, porém, similar ao controle. Estes resultados sugerem que a produção de IL-10 pelos macrófagos em interação com *S. schenckii* esteja promovendo respostas imunes como inibição da produção de outras citocinas e de anticorpos.

De acordo com alguns trabalhos descritos na literatura, IL-10 tem sido detectada como imunossupressora de mediadores pró-inflamatórios em muitos estudos (Fiorentino, D.F., 1991, Fiorentino, D.F, 1991, Bogdan, C., 1991), sendo associada com inibição de iNOS (Cunha, F.Q., 1992) e com promoção de defeitos na atividade antifúngica de macrófagos murinos (Fearon, D.T., 1996). Ainda, IL-10 inibe a proliferação de células T e produção de IFN- γ (Fiorentino, et al, 1989), sendo também envolvido na imunossupressão em algumas infecções fúngicas (Del Sero, G., 1999, Michelin, M. A., 2002, Sisto, F., 2003, Netea, M.G., 2004). A baixa produção de NO obtida em nossos resultados, quando os macrófagos foram incubados com as células leveduriformes sem soro, pode ter sido estimulada pela produção de IL-10.

Na dosagem de NO realizada, foi possível observar forte redução de óxido nítrico na presença das células leveduriformes sem estímulos. Já, quando as leveduras foram opsonizadas com o soro, houve um aumento da produção de NO, em relação ao ensaio anterior, proporcionando uma atividade protetora aos macrófagos. Também, por meio da técnica de RT-PCR realizada, observamos que os macrófagos tiveram a expressão de iNOS mais fraca quando o fungo estava presente, em relação ao controle. No entanto, quando as leveduras foram incubadas com o soro, houve aumento da expressão de iNOS no 3º dia. Por meio dos resultados aqui demonstrados, podemos sugerir que os macrófagos, sem estímulos, apresentam fraca atividade de intermediários do óxido nítrico frente ao *S. schenckii*. Quando estimulados pelos anticorpos contidos no soro, são capazes de gerar resposta imune mediada por NO, que é um importante mecanismo de defesa *in vitro*.

Macrófagos podem representar uma fonte de produção de NO, importante para o controle da multiplicação fúngica em camundongos resistentes e suscetíveis. No entanto, alta e persistente produção de NO é uma característica de susceptibilidade, uma vez que inibe a linfoproliferação, a produção de TNF- α e a expressão de moléculas-MHCII, enquanto a produção de TNF é associada a resistência na infecção fúngica (Oswald, 1996).

Dosamos também, sem estímulo, a citocina IFN- γ com o objetivo de verificar a produção desta em diferentes períodos de incubação. A produção de IFN- γ foi pequena

e mais baixa quando as leveduras estavam presentes, em relação ao controle. O IFN- γ acentua a função microbicida dos macrófagos mediante a estimulação da síntese de intermediários reativos do óxido nítrico e do oxigênio (Abbas, 2008). Casadevall, et al (1995) realizaram experimentos para determinar o quanto IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) e IgM influenciam os macrófagos (J774-16) na produção de NO, comparando resultados na presença e ausência de IFN- γ . O estudo demonstrou que somente na presença desta citocina, o complexo imune (IgG) aumentou a produção de nitrato pelos macrófagos.

As moléculas co-estimulatórias e MHC-II expressa por macrófagos são muito importantes na apresentação de antígenos. Alguns microrganismos possuem a capacidade de alterar a capacidade de expressão destas moléculas. Para avaliar a possível expressão dessas moléculas induzidas por *S. schenckii*, analisamos por citometria de fluxo, CD80, CD86, CD40, CD54 e MHC-II após fagocitose. Os resultados mostraram que não houve diferença na intensidade de fluorescência quando os macrófagos foram incubados com as células leveduriformes e marcados com os anticorpos destas moléculas. Contudo, o número de macrófagos que expressam essas moléculas foi menor quando estes foram incubados com a levedura, em relação ao controle.

Observamos também, que após a fagocitose das leveduras pelos macrófagos incubados por 1 e 3 dias, com soro do animal infectado, houve redução das UFCs, com atividade fungicida no terceiro dia. Mostrando que esta é uma importante forma de ativação da resposta imune microbicida exercida por macrófagos frente ao *S. schenckii*. Redução das UFCs também foi observada com o 3º dia de incubação, quando as células foram incubadas com laminarina, porém esse resultado pode ser explicado pela baixa quantidade de leveduras no interior de macrófagos, pois na presença de laminarina houve uma redução da fagocitose.

Os receptores tipo Toll (TLRs) apresentam dois caminhos de sinalização: um, dependente de MyD88 (fator de diferenciação mielóide), que age via fator κ B (NF- κ B) para induzir citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e o outro caminho é independente de MyD88, que age via IFN-I, para aumentar a expressão de genes IFN (Jones, et al, 2006). Nossos resultados demonstraram, pela técnica de RT-PCR, que os macrófagos apresentam forte expressão de TNF- α na presença e na ausência das células leveduriformes de *S. schenckii*, porém de forma semelhante. Foi demonstrado também,

que os macrófagos expressaram, de forma fraca, IFN- γ na presença de células leveduriformes mas não na ausência.

Os TLRs são uma família de receptores de padrão expressos na superfície celular de macrófagos e possuem papel na resposta imune natural aos microrganismos. Alguns dos componentes presentes nos microrganismos que estimulam os TLRs são lipopolissacarídeos bacterianos gram-negativos, peptidoglicanos de bactérias gram-positivas, RNA de simples e dupla-fita, entre outras substâncias (Abul K. Abbas, 2008). O receptor de TLR2 presente em macrófagos, possui o papel de recrutamento de proteínas adaptadoras e conseqüentemente pode causar a expressão de citocinas inflamatórias, moléculas de adesão endotelial, moléculas co-estimuladoras e citocinas antivirais. A fagocitose e a resposta inflamatória associada, entretanto, não necessitam da ativação de TLR. Esta molécula também é recrutada no fagossomo durante a internalização de partículas via receptores Fc, um processo que não estimula TLR, sugerindo ser característica da fagocitose, para reconhecimento de ligantes (Ozinski, 2000). O TLR2 reconhece padrões moleculares como peptidoglicano, lipoproteína e ácido lipoteicoico. Entretanto, alguns autores tem demonstrado que patógenos podem usar a ativação de TLR2 como mecanismo de escape, principalmente pela produção de IL-10. A técnica de RT-PCR mostrou que o gene de TLR-2 foi expresso, de forma mais forte quando as células leveduriformes estavam presentes. Esse dado pode sugerir que a ativação do TLR2 possa estar sendo usado pelo *S. schenckii* para escapar dos processos microbicidas dos macrófagos, pois como observamos em nossos resultados, leveduras conseguiram sobreviver no interior dessas células sem estímulo.

Nascimento & Almeida (2005) realizaram estudos da imunidade humoral e demonstraram uma possível participação de anticorpos específicos no controle da infecção. A análise por immunoblotting mostrou que os anticorpos do soro de camundongos infectados com *S. schenckii* reagiram apenas contra o antígeno de 70 kDa, uma proteína específica produzida pelo fungo. Essa reação começou 14 dias após a infecção e permaneceu por pelo menos 28 dias depois da infecção. Estudos posteriores realizados por Nascimento, et al (2008), confirmaram que antígenos secretados por *S. schenckii* induziram resposta humoral específica nos animais infectados, principalmente contra a molécula de 70 kDa.

Resposta imune gerada por Th1 pode ser mediada por citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-1 β , IL-12 e TNF- α e respostas Th2 pode ser caracterizada por IL-4 (Kovalovsky, 2000).

Shibuya, et al (1998) estudaram o padrão de citocinas produzidas por camundongos sensibilizados com proteína e detectaram que IL-12 e IFN- γ inibem Th2 e IL-4 e IL-10 inibem respostas de Th-1. IL-4 e IL-10 promovem imunidade humoral estimulando o crescimento e ativação de mastócitos e eosinófilos, pela diferenciação de células B em células secretoras de anticorpos. Ainda, estas citocinas inibem a ativação de macrófagos e proliferação de células-T.

Nossos resultados sugerem que a infecção dos camundongos por *S. schenckii* gerou resposta imune humoral e o soro destes camundongos infectados apresentou importante função, tais como, a atividade fungicida detectada por meio de ensaio de viabilidade de leveduras, aumento do índice de fagocitos, expressão de iNOS por RT-PCR, aumento da produção de NO e também no estímulo da produção de citocinas. Os receptores de manose-1 e/ou manose, presentes nos macrófagos, estão ligados a produção das citocinas IL-10, TNF- α , IL-1 β e IL-12.

Em resumo, nossos resultados mostraram que, ao contrario do que se tem afirmado na literatura, a resposta imune humoral pode ser extremamente importante no controle da infecção. Nossos dados demonstraram que macrófagos foram mais eficientes em eliminar o fungo na presença de soro de camundongos infectados com *S. schenckii*. A presença de soro de animais infectados nos ensaios de fagocitose aumentou, o índice de fagocitose, a expressão de iNOS, a produção de NO e consequentemente a atividade fungicida. Podemos então sugerir que, a produção de anticorpos específicos durante a infecção pode ser extremamente importante no controle da esporotricose.

Conclusões

- Os anticorpos gerados nos animais pela infecção por *S. schenckii* aumentaram a capacidade de fagocitose das leveduras, promoveram atividade fungicida e maior expressão de iNOS pelos macrófagos murinos;
- Os anticorpos induzem o aumento da produção de IL-6, IL-10, TNF- α e IL-1 β pelos macrófagos;
- Dectina-1 e receptor de manose são vias de sinalização importantes nos macrófagos para produção de IL-10, TNF- α , IL-1 β e IL-12 na interação com o *S. schenckii*;
- IL-10 é produzido pelos macrófagos em interação com o *S. schenckii*, após 72 horas, sem estímulos;
- TLR-2 e MyD-88 são moléculas co-estimulatórias fortemente expressas na interação dos macrófagos J774-16 com *S. schenckii*.

Referências Bibliográficas

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pillai, S. *Imunologia celular e molecular*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, 2008.
2. Alborno, M.P., Villanueva, E. & Torres, E.D. Application of immunoprecipitation techniques to the diagnosis of cutaneous and extracutaneous forms of sporotrichosis. *Mycopathologia*. 85: 11-183, 1984.
3. Agarwal, S., Gopal, K., Umesh & Kumar, B. *Int. J. Dermatol.* 47 (4): 367 – 71, 2008.
- Alsina, A & Rodriguez-Del Valle, N. Effects of divalent cations and functionally related substances on the yeast to mycelium transition in *Sporothrix schenckii*. *Sabouraudia*. 22: 1-5, 1984.
4. Barros, M.B., Costa, D.L. Schubach, T.M., do Valle, A.C., Lorenzi, N.P., Teixeira, J.L. & Schubach, Ade O. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 27(3): 246-50, 2008.
5. Bernardes-Engemann, A.R., et al. Improved enzyme-linked immunosorbent assay using the Ss-CBF antigen for the serodiagnosis of several clinical forms of sporotrichosis. *Med. Mycol.* 43: 487-493, 2005.
6. Bogdan, C., Vodovotz, Y & Nathan, C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J. Exp. Med.* 174: 1549-55, 1991.
7. 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: 248-254, 1976.
8. Carlos, I.Z., Sgarbi, D.B.G., Santos, G.C., Placeres, M.C.P. *Sporothrix schenckii* lipid Inhibits Macrophage Phagocytosis: Involvement of Nitric Oxide and Tumour Necrosis Factor- α . *Scandinavian Journal of Immunology*. 57, 214-220, 2003.

9. Castillo, M.C.; Tapia, F.J. and Arciniegas, E. Ultrastructural localization of specific surface antigens in the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*. J. of Med. Vet. Mycol. 28, p. 91-94, 1990.
10. Coles, F.B., Salkin, I.F. & Duncan, R.A. A multistate outbreak of sporotrichosis associated with sphagnum moss. Am. J. Epidemiol. 136: 475-87, 1992.
11. Conti Diaz, I.A. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. Mycopathologia. 108: 113-116, 1989.
12. Crevasse, L. and Ellner, P.D. An outbreak of sporotrichosis in Florida. JAMA. 173: 113-7, 1960.
13. Criseo, G., Malara G., Romeo, O. & Guerra, A.P. Lymphocutaneous sporotrichosis in a immunocompetent patient: a case report from extreme Southern Italy. Mycopatologia 166: 159-162, 2008.
14. Cunha, F.Q., Moncada, S. & Liew, F.Y. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. Biochem Biophys Res. Commun. 182: 1155-9, 1992.
15. D'Alessio, D.J., Leavens, L.J., Strumpf, G.B. and Smith, C.D. An outbreak of sporotrichosis in Vermont associated with sphagnum moss as the source of infection. N. Engl. J. Med. 272: 1054-8, 1965.
16. Da Rosa, D.W., Gezuele, E., Calegari, L. & Goñi, F. Asteroid Body in sporotricosis. Yeast viability and biological significance within the host immune response. Med. Mycol. 46(5): 443-8, 2008.
17. Davis, B.A. Sporotrichosis Dermatol. Clin. 14, 69-76, 1996.
18. Del Sero, G. Mencacci, A., Cenci, E., et al. Antifungal type 1 responses are upregulated in IL-10-deficient mice. Microbes Infect. 1: 1169-80, 1999.

19. Dinarello, C.A. Interleukin-1. *Rev. Infect. Dis.* 6: 51-95, 1984.
20. Ding, A., Nathan, C.F. & Stuehr, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* 141: 2407-12, 1988.
21. Dixon, D.M. Salkin, I.F. & Duncan, R.A. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. *J. Clin. Microbiol.* 29: 1106-13, 1991.
22. Dooley, D.P., Bostic, P.S. & Beckius, M.L. Spook house sporotrichosis: a point source outbreak of sporotrichosis associated with hay bale props in a Halloween haunted house. *Arch. Intern. Med.* 157: 1885-7, 1997.
23. Elgart, M.L. Subcutaneous mycosis In: *Cutaneous Fungal Infections* (Elewski, B.E., Ed) Igku-Shoin Medical Publishers, pp. 124-158, 1992.
24. Fearon, D.T. & Locksley, R.M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science.* 272: 50-4, 1996.
25. Fernandes, K.S.S., Mathews, H.L. & Lopes-Bezerra, L.M. Differences in virulence of *Sporothrix schenckii* conidia related to culture conditions and cell-wall components. *J. Med. Microbiol.* 48, 195-203, 1999.
26. Fiorentino, D.F., Bond, M.W. & Mosmann, T.R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* 170: 2081-95, 1989.
27. Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Mosmann, T.R., Howard, M. & O'Garra, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.* 147: 3815-22, 1991.

28. Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T.R., Howard, M., Moore, K.W. & O'Garra, A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *Journal Immunology*. 146: 3444-51, 1991.
29. Garner, R.E., Rubanowice, K., Sawyer, R.T. & Hudson, J.A. Secretion of TNF- α by alveolar macrophages in response to *Candida albicans* mannan. *J. Leuk. Biol.* 55: 161-68, 1994.
30. Garrison, R.G. Cytological and ultrastructural aspects of dimorphism. In: P. Szaniszló (Ed.) *Fungal dimorphism with emphasis on fungi pathogenic for humans*. p.15, 1985.
31. Gezuele, E. & Da Rosa, D. Importance of the sporotrichosis asteroid body for the rapid diagnosis of sporotrichosis. *Rev. Iberoam. Micol.* 22(3): 147-50, 2005.
32. Gutierrez Galhardo, M.C., Zancopé de Oliveira, R.M., Francesconi do Valle, A.C., Paes de Almeida, R., Morais e Silvatares, P., Monzon, A., Mellado, E., Rodriguez-Tudela, J.L. & Cuenca-Estrella, Manuel. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility patterns of *Sporothrix schenckii* isolates from a cat-transmitted epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Medical Mycology*. 141-151, 2008.
33. Hajjeh, R., McDonnell, S., & Reef, S. Outbreak of sporotrichosis among tree nursery workers. *J. infect. Dis.* 176: 499-504, 1997.
34. Hektoen, L. & Perkins, C.F. Refractory subcutaneous caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. *J. Exp. Med.* 5: 77-89, 1900.
35. Howard, D.H. Dimorphism of *Sporotrichum schenckii*. *J. Bacteriol.* 81: 464-469, 1961.
36. Janes, P.C. & Mann, R.J. Extracutaneous sporotrichosis. *J. Hand. Surg.* 12: 441-5, 1987.

37. Kaplan, W. & Gonzales-Ochoa, A. Application of the fluorescent antibody technique to the rapid diagnosis of sporotrichosis. J. of Laborat. and Clin. Med. 62, 835-841, 1963.
38. Kauffman, C.A. Sporotrichosis – State-of-the-art clinical article. Clinical Infectious Diseases. 29: 231-7, 1999.
39. Kusuhara, M. Hachisuka, H. and Sasai, Y. Statistical survey of 150 cases of sporotrichosis. Mycopathologica. 102: 129-133, 1988.
40. Kwon-Chung, K.J. and Bennet, J.E. Sporotrichosis. In: Kwon-Chung, K.J. and Bennet, J.E., eds. Medical Mycology. Philadelphia: Lea & Febiger. 707-29, 1992.
41. Lacaz, C.S., Porto, E. and Martins, J.E.C. Micologia Médica – Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. Sarvier, 8º ed. São Paulo, 1991.
42. Lima, O.C., Figueiredo, C.C, Previato, J.O. Previato-Mendonça, Lucia, Morandi, V. and Bezerra, L.M.L. Involvement of fungal cell wall components in adhesion of *Sporothrix schenckii* to human fibronectin. Infection and Immunity. p. 6874-6880, 2001.
43. Lipstein-Fresch, E. Isenberg, H.D., Singer, C., Cooke, O. and Grenwald, R.A. Disseminated *Sporothrix schenckii* infection with arthritis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. J. Rheumat. 12: p. 805-8, 1985.
44. Lloyd, K.O. & Bitoon, M.A. Isolation and purification of a peptido-rhamnomannan from the yeast form of *Sporothrix schenckii*. Structural and immununochemical studies. J. Immunol. 107: 663-671, 1971.
45. Lopes-Bezerra, L.M., Schubach, A. and Costa, R.O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. Annals Acad. Bras. Cienc. 78(2): 293-308, 2006.
46. Lopes, J.O., Alves, S.H., Mari, C.R., Brum, L.M., Westphalen, J.B., Altermann, M.J. and Prates, F.B. Epidemiology of sporotrichosis in the central region of Rio Grande do Sul. Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop. 32(5): 541-545, 1999.

47. Mackinnon, J.E., Conti-Diaz, I.A. Gezuele, E., Civilá, E. and DaLuz, S. Isolation of *Sporothrix schenckii* from nature and considerations on its pathogenicity and ecology. *Sabouraudia*. 7: 38-45, 1969.
48. Mariat, F. The epidemiology of sporotrichosis. In: Wolstenholme Gew (Ed), *Systemic Mycoses*. London, A Churchill, 144-159, 1968.
49. Matter, S.E., Bailey, D.M. and Sexton, D.J. Immune deficiency presenting as disseminated sporotrichosis. *J. Okla. State Med. Assoc.* 77: 114-17, 1984.
50. Mendonza, M, Diaz, E., Alvarado, P., Romero, E. & Alborno, M.C.B. Isolation of *Sporothrix schenckii* from environmental samples in Venezuela. *Revista Iberoamericana de Micología*. 24: 317-319, 2007.
51. Michelin, M.A., Figueiredo, F. & Cunha, F.Q. Involvement of prostaglandins in the immunosuppression occurring during experimental infection by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Exp. Parasitol.* 102: 170-7, 2002.
52. Morris-Jones, R. Sporotrichosis. *Clin. Dermatol.* Review article. 27: p. 427-431, 2002.
53. Morris-Jones, R., Youngchim, S., Gomes, B.L., Aisen, P., Ray, 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: 4026-4033, 2003.
54. Mozafarian, N., Merman, J.W. & Casadewall, A. *Journal of Leukocyte biology*. 57(4): 657-62, 1995.
55. Nascimento, R. C. and Almeida, S.R. Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis. *FEMS Immunol. and Med. Microbiol.* 43, 241-247, 2005.

56. Nascimento, C.R., Espindola, N.M., Castro, R.A., Teixeira, P.A.C., Penha, C.V.L.Y., Lopes-Bezerra, L.M. & Almeida, S.R. Passive immunization with monoclonal antibody against a 70-Kda putative adhesin of *S. schenckii* induces protection in murine sporotrichosis. *European Journal of Immunology*. 38: 3080-3089, 2008.

57. Netea, M.G., Suttmüller, R., Hermann, C., et al. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J. Immunol*. 172: 3712-8, 2004.

58. Neto, R.J.P., Machado, A.R., Castro, G., Quaglio, A.S.S. and Martinez, R. Acquired immunodeficiency syndrome presenting as disseminated cutaneous sporotrichosis – case report. *Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop.* 32(1): p. 57-61, 1999.

59. Nielsen-Jr, H.S. Biological properties of skin tests antigens of yeast form *Sporotrichum schenckii*. *J. Infect. Dis.* 118: 173-180, 1968.

60. Northoff, H., Kabelitz, D. And Galanos, C. Interleukin-1 production for detection of bacterial polysaccharides in fetal calf sera and other solutions. *Immunol. Today*. 2: p. 126-27, 1986.

61. Ochoa, A.G., Ricoy, E., Velasco, O., Lopez, R. and Navarrete, F. Valoración comparativa de los antígenos polisacárido y celular de *Sporothrix schenckii*. *Rev. Invest. Salud. Pub.* 30: 303-15, 1970.

62. Oppenheim, J.J., Kovacs, E.J., Matsushima, K. and Durum, S.K. There is more one interleukin-1. *Immunol Today*. 7: p. 45-56, 1986.

63. Oswald, I.P. & James, S.L. Nitrogen oxide in host defense against parasites. *Meth: A Comp Meth Enzymol*. 10: 8-14, 1996.

64. Pappas, P.G., Telles, I., Deep, A.E., Nolasco, D., Holgado, W. And Bustamante, B. Sporotrichosis in Peru: Description of an Area of Hyperendemicity. *Clin. Infect. Dis.* 30: 65-70, 2000.

65. Plouffe, J.F., Joseph Silva, Jr., Fekety, R., Reinharter, E. and Browne, R. Cell-mediated immune responses in sporotrichosis. *The J. of Inf. Dis.* vol.39, n. 2, 1979.
66. Previato, J.O., Garin, P.A.J., Haskins, R.H. and Travassos, L.R. Soluble and insoluble glucans from different cells types of *Sporothrix schenckii*. *Exp. Mycol.* 3:92-105, 1979.
67. Radentz, W.H. & Elewski, B.E. *Cutaneous Fungal Infections*, pp. 184-211. Igku-Shoin Medical Publishers, New York, 1992.
68. Ramos e Silva, M., Vasconcelos, C., Carneiro, S. & Cestari, T. Sporothricosis. *Clinic Dermatology.* 25(2): 181-7, 2007.
69. Rippon J. Sporotrichosis. In: Rippon JW (ed). *Medical Mycology – The Pathogenic Fungi and Pathogenic Actinomyces*. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 325-352, 1988.
70. Rivitti, E.A. and Aoki, V. Deep fungal infections in tropical countries. Elsevier Science. *Clinics in Dermatology.* 17: 171-190, 1999.
71. Rodriguez-Del Valle, N., Rosario, M., & Torres Blasini, G. Effects of pH, temperature, aeration and carbon source on the development of the mycelial or yeast forms of *Sporothrix schenckii* from conidia. *Mycopathologia.* 82: 83-88, 1984.
72. Rodriguez, G.M.D., Sarmiento. The asteroid bodies of Sporotrichosis. 20(3), pp. 246-249, 1998.
73. Rodrigues, M.T. & Resende, M.A. Epidemiologic skin test survey of sensitivity to paracoccidioidin, histoplasmin and sporotrichin among gold mine workers of Morro Velho Mining, Brazil. *Mycopathologia.* 135: 89-98, 1996.
74. Romero-Martinez R., Wheeler M., Guerrero-Plata, A., Rico, G. & Torres-Guerrero H. Biosynthesis and function of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect. Immun.* 68: 3696-3703, 2000.

75. Sampaio, S.A.P., Lacaz, C.S. & Almeida, F. Aspectos clínicos da esporotricose em SP - análise de 235 casos. *Revista do Hospital das Clínicas*. 391-402, 1954.
76. Schneidau J.D., Lamar, L.M & Hairston, M.A. Cutaneous hypersensitivity to sporotrichin in Louisiana. *JAMA*. 188:371-373, 1964.
77. Schubach, A., Barros, M.B., Wanke, B. Epidemic sporotrichosis. *Current Opinion Infectious Disease*. 21(2): 129-33, 2008
78. Sisto, F. Miluzio, A., Leopardi, O., Mirra, M., Boelaert, J.R & Taramelli, D. Differential cytokine pattern in the spleens and livers of BALB/c mice infected with *Penicillium marneffei* protective role of gamma interferon. *Infect. Immun.* 71: 465-73, 2003.
79. Scott, E.N. & Muchmore, H.G. Immunoblot analysis of antibody responses to *Sporothrix schenckii*. *J. Clin. Microbiol.* 27:300-304, 1989.
80. Scott, E.N., Muchmore, H.G. and Fine, D.P. Activation of the alternative complement pathway by *Sporothrix schenckii*. *Infect. and Immunity*. Jan. p. 6-9, 1986.
81. 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: 935-940, 1987.
82. Shibata, Y., Metzger W.J. & Myrvik, Q.N. Chitin particle- induced cell-mediated immunity is inhibited by soluble mannan: Manose receptor-mediated phagocytosis initiates IL-2 production. *J. Immunol.* 159: 2462-67, 1997.
83. Shiraishi, A., Nakagaki, K. and Arai, T. Experimental sporotrichosis congenitally athymic (nude) mice. *J. Reticuloendothelial Soc.* 26: p.333-336, 1979.

84. 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.
85. Silva, C.L. and Faccioli, L.H. Tumor necrosis factor and macrophage activation are important in clearance of *Nocardia brasiliensis* from the livers and spleens of mice. *Infect. Immun.* 60: p. 3566-70, 1992.
86. Simson, F.W. Sporotrichosis infection in mines of Witwatersrand. A symposium. Transvaal Mine Medical Association. Johannesburg, Transvaal Chamber of Mines., 1947.
87. Stein, M. & Gordon, S. Regulation of tumor necrosis factor (TNF) release by murine peritoneal macrophage: role of cell stimulation and specific phagocytic plasma membrane receptors. *Eur. J. Immunol.* 21: 431-37, 1991.
88. Takata, M., & Ishizaki, H. Correlations among culture times, sugar composition and biological activities of *Sporothrix schenckii* antigens. *Mycopathologia*. 84: 31-39, 1983.
89. Toriello, C., Arjona-Rosado, L.C., Diaz-Gomez, M.L. & Taylor, M.L. Efficiency of crude and purified fungal antigens in serodiagnosis to discriminate mycotic from other respiratory diseases. *Mycoses*. 34: 133-140, 1991.
90. Travassos, L.R., Souza, W., Mendonça-Previato, L. & Lloyd, K.O. Location and biochemical nature of surface components reacting with concanavalin A in different cell types of *Sporothrix schenckii*. *Exp. Mycol.* 1: 293-305, 1977
91. Uenotsuchi, T., Takeuchi, S., Matsuda, T., Urabe, K., Koga, T., Uchi, H., Nakahara, T., Fukagawa, S., Kawasaki, M., Kajiwar, H., Yoshida, S., Moroi, Y. and Furue, M. Differential induction of Th1-prone immunity by human dendritic cells activated with *Sporothrix schenckii* of cutaneous and visceral origins to determine their different virulence. *International Immunol.* 18(12): 1637-1646, 2006.

92. Velasco-Castrejón, O. and Gonzalez-Ochoa, Y.A.. La esporotricosis en un pequeño poblado de la Sierra de Puebla. Rev. Invest. Salud. Pub. 36: 133-7, 1976.
93. Yamamoto, Y., Klein, T.W. & Friedman, H.. Involvement of mannose receptor in cytokine- 1β , IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses, but not in chemokine macrophage inflammatory protein 1- β , MIP-2, KC responses, caused by attachment of *Candida albicans* to macrophages. Infect. Immun. 65: 1077-82, 1997.
94. Zeppone Carlos, I., Magalhães Costa Zini, M., Sgarbi, D.B.G., Angluster, J., Alviano, C.S. and Silva, C.L. Disturbances in the production of interleukin-1 tumor and necrosis factor in disseminated murine sporotrichosis. Mycopathologia. 127: p. 189-194, 1994.
95. Zeppone Carlos, I., Sgarbi, D.B.G., Angluster, J., Alviano, C.S. and Silva, C.L. Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the systemic form of the disease. Mycopathologia. 117: p. 139-44, 1992.
96. Zar, J.H Bioestatistical analysis. 2 ed. New Jersey, Prentice Hall. p.718, 1984.