

TAIANNE POETA BATISTA

ESTUDO DA IMUNIDADE TREINADA EM MACRÓFAGOS NO
DESENVOLVIMENTO DA ESPOROTRICOSE ASSOCIADA AO
FUNGO *Sporothrix brasiliensis*



Plano de Monografia apresentado ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
JULHO/2023

Trabalho realizado no Departamento de Imunologia, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob orientação do Professor Fabianno Dutra.

FICHA CATALOGRÁFICA**CIP - Catalogação na Publicação**

P129e Poeta Batista, Tainne
Estudo da imunidade treinada em macrófagos no desenvolvimento da esporotricose associada ao fungo *Sporothrix brasiliensis* / Tainne Poeta Batista. - Rio de Janeiro, 2023.
62 f.

Orientador: Fabianno Ferreira Dutra.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2023.

1. Esporotricose. 2. Imunidade Treinada. 3. Macrófagos. 4. B-glucanas. 5. *S. brasiliensis*. I. Ferreira Dutra, Fabianno, orient. II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

FOLHA DE APROVAÇÃO

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO
RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Taianne Poeta Batista**
DRE: 118032672

BANCA EXAMINADORA: Profa. Daniela Sales Alviano (Presidente)
Prof. Anderson Guimarães Baptista Costa
Prof. Rodrigo Tinoco
Profa. Juliana Echevarria Neves de Lima (Suplente)

Título da Monografia: **“Estudo da imunidade treinada em macrófagos no desenvolvimento da esporotricose associada ao fungo *Sporothrix brasiliensis*”**

Local: **Sala E1-044/ IMPG / CCS / UFRJ**
Data e hora de início: **10 de julho de 2023 às 14:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 10 de Julho de 2023.

<p>NOTA</p> <p><u>10,0</u></p> <hr/> <p><u>10,0</u></p> <hr/> <p><u>10,0</u></p> <hr/>	<p>Banca Examinadora:</p> <p><u>Daniela Sales Alviano</u> Prof. Daniela Sales Alviano</p> <hr/> <p><u>Anderson Guimarães Baptista Costa</u> Prof. Anderson Guimarães Baptista Costa</p> <hr/> <p><u>Rodrigo Tinoco</u> Prof. Rodrigo Tinoco</p> <hr/> <p><u>Prof. Juliana Echevarria Neves de Lima</u> Prof. Juliana Echevarria Neves de Lima</p>
<p>Aluno:</p>	<p><u>Taianne Poeta Batista</u> Taianne Poeta Batista</p>
<p>Orientador:</p>	<p><u>Fabianno Ferreira Dutra</u> Prof. Fabianno Ferreira Dutra</p>
<p>Coordenador de TCC</p>	<p><u>Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho</u> Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho</p>

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus por me permitir viver o sonho que eu tinha desde o ensino fundamental, que era fazer parte da UFRJ e entrar em um curso da área da saúde. Sem a certeza de que Deus me guiaria pelo caminho correto, eu não teria forças para concluir essa caminhada.

Ao meu orientador, Prof. Fabianno Dutra, por todo ensinamento transmitido, por me ajudar quando os experimentos ficavam pesados demais e por fazer parte da minha formação intelectual e profissional. Foi uma honra ter sido orientada pelo meu professor favorito da universidade e um dos responsáveis por fazer eu me apaixonar pela imunologia, junto a outros professores incríveis que a Imuno tem.

À minha mãe, Alexandra Silva Poeta, por ser meu exemplo de força e por me inspirar a seguir meu caminho. Ao meu pai, Genésio Batista, por ser o exemplo de fé e de positividade que preciso na minha vida. Às minhas irmãs, Thais e Tainá Poeta, e meus irmãos, Romário e Sávio Batista, vocês são parte de mim e meu amor por vocês é incondicional. Aos meus sobrinhos, Davi, Danilo, Alana, Cecília e neném que está por vir, vocês são a personificação do amor de Deus na minha vida. Isso é tudo por vocês.

Ao meu avô, Gilberto Mendes Poeta, que não está mais neste mundo, mas com certeza me acompanha. Antes de ser um sonho meu, era dele. E dele também é essa conquista. Espero que esteja orgulhoso, vovô. O senhor vai estar pra sempre nos meus pensamentos e no meu coração. Nosso laço, antes de sanguíneo, é um laço de amor. Laços sanguíneos podem se romper um dia, laços de amor são eternos.

Ao meu noivo, Thiago Carvalho, por estar comigo durante toda essa caminhada. Sem você me apoiando e me incentivando nos últimos meses, tudo teria sido muito mais difícil. Obrigada por estar comigo sempre, nossa história é o meu livro de romance favorito.

Aos meus amigos da graduação que tive a sorte de encontrar: Ana Clarisse, Camilla, Laenne, Marcelle e Marcos. Nosso grupo foi o meu conforto durante esses 4 anos e meio. Cada um do seu jeito fez essa caminhada ser mais leve. Em meio a loucura de provas, trabalhos, apresentações e tudo que acontece durante esse período doido das nossas vidas, quando as coisas ficavam difíceis e o choro queria sair, o que a gente mais fazia era rir. E cada risada aliviava as preocupações e nossos corações. Obrigada por quererem minha amizade, sou muito grata pela de vocês.

Às minhas amigas Jéssica Gonçalves e Anna Júlia Macedo, obrigada por sempre me incentivarem e mesmo de longe, demonstrarem a torcida que vocês têm por mim. Eu amo vocês e minha vida não seria a mesma sem tê-las comigo.

À todos que sempre torceram por mim, sempre mandando energias positivas e palavras de conforto, muito obrigada! A vida não é completa sem o carinho de quem mais gostamos. À Ana Paula Macedo, pois se ela não tivesse agido em um momento decisivo, eu nem sei se estaria aqui agora. À minha tia Sônia Macedo, por ter feito parte da minha criação e ter me ajudado muitas vezes.

À todos os professores do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, por todo conhecimento transmitido. Por diversas vezes, durante alguma aula, eu agradecia ao universo por me permitir estar ali dentro da sala de aula, aprendendo coisas incríveis com professores incríveis e que amam o que fazem.

E também à mim, por mesmo cheia de inseguranças e durante a luta com a ansiedade, ter conseguido fazer o que por muitas vezes achei que não seria capaz. A UFRJ nos faz crescer não só intelectualmente, mas também como pessoa. Pude aprender e vivenciar coisas incríveis e isso me me mudou não só no âmbito do conhecimento. A ciência foi uma paixão que não estava esperando. Eu costumo dizer que não fui eu quem escolhi a Micro, a Micro que me escolheu.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo fomento necessário para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Devemos acreditar que somos talentosos para algumas coisas, e que essa coisa, a qualquer custo, deve ser alcançada. – Marie Curie

RESUMO

TAIANNE POETA BATISTA

ESTUDO DA IMUNIDADE TREINADA EM MACRÓFAGOS NO DESENVOLVIMENTO DA ESPOROTRICOSE ASSOCIADA AO FUNGO *Sporothrix brasiliensis*

Orientador: Fabianno Dutra

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

A esporotricose é uma micose subcutânea causada pelos fungos do gênero *Sporothrix*, sendo *S. brasiliensis* a espécie de maior relevância clínica. No Brasil, a esporotricose ocorre majoritariamente de forma zoonótica, tendo o gato (*Felis catus*) papel principal na transmissão da doença a humanos. O Rio de Janeiro é endêmico para a esporotricose, sendo atualmente a região que reporta o maior número de casos no mundo. Seu tratamento de longa duração leva à abandonos de animais doentes, o que acaba aumentando a transmissão para outros animais e o aumento no número de casos. Com isso, é necessário o desenvolvimento de novas terapias e métodos de prevenção da doença. A imunidade treinada é um processo de reprogramação epigenética e metabólica que as células da imunidade inata desencadeiam a partir de um estímulo primário e, em um segundo estímulo, conseguem responder mais rápida e eficientemente. De acordo com a literatura, a imunidade treinada induzida por vacinas vivas como a BCG e por β -glucanas causa um efeito benéfico na contenção de doenças infecciosas, tornando-a um alvo terapêutico interessante. Devido a isso, nosso objetivo foi estudar o papel da imunidade treinada, analisando a capacidade de macrófagos na produção de citocinas e de eliminar o *S. brasiliensis*, além de analisar o desenvolvimento da esporotricose após a administração de duas formas de β -glucanas: curdlana e *beta-glucan peptide* (BGP). Em nossos experimentos *ex vivo*, os macrófagos peritoneais de animais injetados com ambas as β -glucanas demonstraram uma maior capacidade de produzir TNF e IL-6, além de apresentarem maior capacidade de fungicida. O efeito não foi o mesmo em macrófagos de medula, indicando que a administração das β -glucanas não foi suficiente para estimular os progenitores mielóides. Nos experimentos *in vivo*, notamos uma tendência em animais pré-tratados pela via intraperitoneal com as β -glucanas de retardar o desenvolvimento das lesões, mas isso não impediu o posterior desenvolvimento delas, com características semelhantes às dos animais controle. Em contrapartida, a administração local (subcutânea) de BGP pareceu ser eficiente em limitar o desenvolvimento da esporotricose. Em conclusão, os resultados demonstram que a utilização da β -glucana pode ser estudada como terapia adjuvante da esporotricose.

Palavras-chave: Esporotricose; *S. brasiliensis*; Imunidade Treinada; Macrófagos; β -glucanas.

ABSTRACT**TAIANNE POETA BATISTA****ESTUDO DA IMUNIDADE TREINADA EM MACRÓFAGOS NO DESENVOLVIMENTO DA ESPOROTRICOSE ASSOCIADA AO FUNGO *Sporothrix brasiliensis*****Orientador:** Fabianno Dutra**Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis caused by fungi of the genus *Sporothrix* and *S. brasiliensis* being the species with the highest clinical conversion. In Brazil, sporotrichosis occurs mainly in a zoonotic way, with the cat (*Felis catus*) having a main role in the transmission of the disease to humans. Rio de Janeiro is endemic for sporotrichosis, currently being the region that reports the highest number of cases in the world. Its long-term treatment leads to abandonment of sick animals, which ends up increasing transmission to other animals and an increase in the number of cases. Therefore, it is necessary to develop new therapies and methods to prevent the disease. Trained immunity is a process of epigenetic and metabolic reprogramming that innate immunity cells trigger from a primary stimulus and, in a second stimulus, they become able to respond more quickly and efficiently. According to the literature, the trained immunity induced by live vaccines such as BCG and by molecules like β -glucans causes a reinforced effect in the containment of infectious diseases, making it an interesting therapeutic target. Thus, our objective was to study the role of trained immunity, analyzing the ability of macrophages to produce cytokines and to eliminate *S. brasiliensis*, in addition to analyzing the development of sporotrichosis after the administration of two forms of β -glucans: curdlan and beta-glucan peptide (BGP). In our *ex vivo* experiments, peritoneal macrophages from animals injected with both β -glucans produced a greater ability to produce TNF and IL-6, in addition to having a greater fungicide capacity. The effect was not the same in bone marrow-derived macrophages, indicating that the administration of β -glucans was not sufficient to stimulate myeloid progenitors. In *in vivo* experiments, we noticed a tendency in animals pre-treated intraperitoneally with β -glucans to delay the development of lesions, but this did not prevent their further development, with characteristics similar to those of control animals. In contrast, local (subcutaneous) administration of BGP appears to be efficient in limiting the development of sporotrichosis. In conclusion, the results demonstrate that the use of β -glucan can be studied as an adjuvant therapy for sporotrichosis.

Key-words: Sporotrichosis; *S. brasiliensis*; Trained Immunity; Macrophages; β -glucans.

RESUMO PARA LEIGOS

TAIANNE POETA BATISTA

ESTUDO DA IMUNIDADE TREINADA EM MACRÓFAGOS NO DESENVOLVIMENTO DA ESPOROTRICOSE ASSOCIADA AO FUNGO *Sporothrix brasiliensis*

Orientador: Fabianno Dutra

Resumo para Leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

A esporotricose é conhecida popularmente como a “doença do jardineiro” ou “doença do gato”, conhecida por causar lesões profundas, geralmente com presença de pus, que não cicatrizam. No Brasil, principalmente no Rio de Janeiro, a doença é transmitida principalmente através do gato, que se contamina através do contato com o meio ambiente – especialmente solos e vegetais com alta quantidade de materiais em decomposição. Os responsáveis por causar a infecção são os fungos do gênero *Sporothrix*. O nosso sistema imune é constituído de células que são capazes de combater uma ampla gama de microrganismos, porém, quando esses microrganismos são capazes de ultrapassar os mecanismos de combate dessas células, eles se tornam capazes de estabelecer a doença. É que o que acontece no caso dos fungos causadores da esporotricose, eles possuem mecanismos capazes de burlar seu reconhecimento pelas células da imunidade do hospedeiro. O tratamento da doença é de longa duração e leva à abandonos de animais doentes, o que acaba aumentando a transmissão para outros animais e o aumento no número de casos. Com isso, é necessário o desenvolvimento de novas terapias e métodos de prevenção da doença. Existe um fenômeno em nossas células imunes que as tornam mais eficazes na espota aos patógenos. Esse fenômeno é chamado de “Imunidade Treinada” e pode ser induzida por vacinas e moléculas purificadas presentes em microrganismos, como a β -glucana – um carboidrato presente na superfície de fungos, principalmente. Em nosso trabalho, o objetivo foi investigar o efeito da β -glucana na ativação do sistema imune no desenvolvimento da esporotricose em camundongos. Analisamos a capacidade de macrófagos – um tipo de célula do sistema imune – na eliminação do fungo e na indução da inflamação frente ao fungo. Também estudamos o efeito da β -glucana de diminuir o desenvolvimento das lesões na pele formadas no local da injeção do fungo. Nossos resultados demonstraram uma maior capacidade de macrófagos treinados em matar o fungo e gerar inflamação. Também foi possível observar uma redução no desenvolvimento das lesões cutâneas de animais tratados com β -glucana no local da infecção. Em conclusão, quando analisados juntos, os resultados sugerem que a indução do fenômeno de imunidade treinada tem potencial para ser usada como terapia adjuvante da esporotricose. Contudo, mais estudos serão necessários para confirmar esse potencial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência da esporotricose zoonótica ao longo dos anos.....	2
Figura 2. Macro e micromorfologia da fase de hifa de <i>Sporothrix brasiliensis</i>	3
Figura 3. Mapa da distribuição mundial das espécies de <i>Sporothrix</i> e sua prevalência em cada região	4
Figura 4. Manifestações clínicas da esporotricose	6
Figura 5. Memória imunológica clássica vs. Imunidade treinada	11
Figura 6. Evolução do sistema imunológico	12
Figura 7. Marcas epigenéticas em células treinadas.....	15
Figura 8. Protocolo de tratamento com curdlana para treinamento de células inatas	24
Figura 9. Produção das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-6 por macrófagos peritoneais de camundongos tratados ou não com curdlana	25
Figura 10. Produção das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-6 por macrófagos derivados de medula de camundongos tratados ou não com curdlana	26
Figura 11. Protocolo de tratamento com BGP para treinamento de células inatas	26
Figura 12. Produção de TNF por macrófagos peritoneais e de medula de animais tratados ou não com BGP.....	27
Figura 13. Capacidade de <i>killing</i> de macrófagos peritoneais de animais tratados com curdlana ou BGP ou não.....	28
Figura 14. Análise do efeito da administração das β -glucanas no desenvolvimento de lesões	29
Figura 15. Análises pareadas de animais que receberam ou não as β -glucanas até 35° dia pós infecção.....	30
Figura 16. Determinação da quantidade de fungo nos órgãos de animais tratados com β -glucanas ou não	31
Figura 17. Análise do efeito da administração de BGP local no desenvolvimento de lesões .	33
Figura 18. Determinação da quantidade de fungo nos órgãos de animais tratados com BGP local ou não	34

Figura 19. Determinação da quantidade de fungo nos órgãos de animais tratados com BGP *subcutânea* ou não. 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Manifestações clínicas da esportricose	5
Tabela 2. Evidências da indução da memória imune inata.....	13

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Esporotricose: histórico e epidemiologia	1
1.2 <i>Sporothrix</i> sp	3
1.3 Manifestações clínicas da esporotricose.....	5
1.4 Resposta imunológica associada à esporotricose	7
1.5 Imunidade treinada	10
2 JUSTIFICATIVA	17
3 OBJETIVO	18
3.1 Objetivo Geral	18
3.2 Objetivos Específicos	18
4 MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Animais.....	19
4.2 Cultura de <i>Sporothrix brasiliensis</i>	19
4.3 Cultura de BCG	19
4.4 Modelo murino de esporotricose	20
4.5 Análise quantitativa da disseminação da infecção	20
4.6 Treinamento <i>in vivo</i> de macrófagos e progenitores mielóides	20
4.7 Ensaio de eliminação de <i>S. brasiliensis</i> por macrófagos treinados	21
4.8 Análise da produção de citocinas por macrófagos treinados.....	22
4.9 Análise estatística	22
5 RESULTADOS	24
5.1 Produção de citocinas por macrófagos peritoneais e derivados de medula treinados <i>in vivo</i>	24
5.2 Capacidade de macrófagos treinados em eliminar <i>S. brasiliensis</i>	28
5.3 Análise de desenvolvimento de lesões e disseminação da doença após administração de β - glucana.....	29
6 DISCUSSÃO	35
7 CONCLUSÃO.....	40
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 Esporotricose: histórico e epidemiologia

A esporotricose foi relatada pela primeira vez nos Estados Unidos em 1896 pelo estudante de medicina Benjamin Schenck, a partir de um paciente portador de lesões no braço. Logo o agente foi isolado e identificado como pertencente ao gênero *Sporotrichum*, sendo nomeado *Sporotrichum schenckii* (Schenck, 1898). Posteriormente, também nos Estados Unidos, Hektoen e Perkins (1900) reportaram um novo caso e propuseram uma nova classificação, desta vez incluindo o microrganismo ao gênero *Sporothrix*, devido às características reprodutivas observadas. No Brasil, a esporotricose foi descrita pela primeira vez por Lutz e Splendore (1907), relatando a doença em humanos e ratos.

Os fungos do gênero *Sporothrix* têm como habitat natural o solo, especialmente solos com matéria vegetal em decomposição e outros materiais como madeira e até mesmo prevalência em certos tipos de árvores (Vismer e Eicker, 1994). Relacionando este fato com o modo de transmissão natural da esporotricose que ocorre a partir da implantação traumática do fungo na pele, situação na qual a pele do indivíduo é lesionada através de algum material contaminado com o patógeno, a esporotricose ficou conhecida popularmente como a "doença do jardineiro". Portanto, trabalhadores do campo como jardineiros, floristas e agricultores dispõem de maiores chances de contrair a doença (Orofino-Costa *et al.*, 2017). Existem relatos de indivíduos que contraíram a forma pulmonar da doença através da inalação de conídios, embora seja muito raro (Mehta *et al.* 2004; Singhai *et al.* 2012). A partir da década de 90, casos de esporotricose transmitidos a humanos através de animais começaram a aparecer com mais frequência e em alguns países, inclusive no Brasil, a esporotricose passou a ter uma maior incidência fora dos campos, estando associada a casos zoonóticos principalmente relacionados a indivíduos que possuem contato com animais (Macêdo-Sales *et al.*, 2018).

No Brasil, a transmissão da esporotricose ocorre majoritariamente de forma zoonótica. É transmitida especialmente pelo gato devido as suas características comportamentais, em situações que permitem a implantação do fungo na pele do indivíduo, visto que apresentam alta carga fúngica em suas lesões e o costume de se esfregarem, morder e arranhar seus cuidadores (Schubach *et al.*, 2001, 2002; Macêdo-Sales *et al.*, 2018). A maior ocorrência tanto de casos humanos quanto felinos se

encontra na região Sudeste, em especial no Rio de Janeiro, sendo considerada uma doença endêmica no estado desde o ano de 1998. Anteriormente, nos anos de 1987 a 1998, apenas 13 casos de esporotricose humana haviam sido relatados (Barros *et al.*, 2001). Porém, a partir do ano de 1998, houve um grande aumento nos números de casos, e até 2011, mais de 4.000 casos foram registrados pela Fiocruz (Silva *et al.*, 2012). Nos últimos anos, segundo dados da Gerência de Doenças Transmitidas por Vetores e Zoonóticas (GERDTVZ), entre 2019 e 2020 foram relatados mais de 2.600 casos da doença no estado do Rio de Janeiro (2021). A grande prevalência da esporotricose no Rio de Janeiro, com o relato de casos ainda em ascensão com o passar dos anos, configura um hiperendemismo. No entanto, como a doença não é de notificação compulsória, é possível que o número de casos seja ainda maior. Além do Rio de Janeiro, estados como São Paulo e Rio Grande do Sul também reportam casos de esporotricose com frequência (Figura 1) (Montenegro *et al.*, 2014; Sanchotene *et al.*, 2015; Gremião *et al.*, 2020).

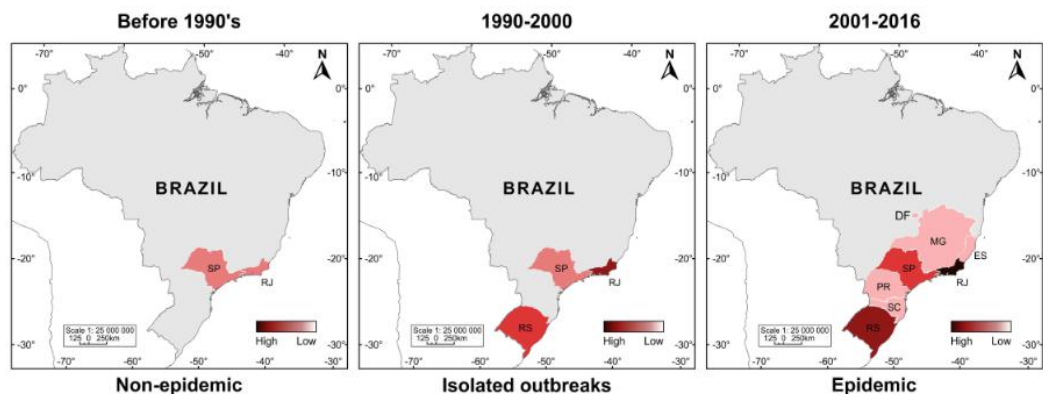


Figura 1 – Incidência da esporotricose zoonótica ao longo dos anos. Antes dos anos 90, casos de esporotricose não eram frequentes e normalmente eram associados ao contato com o meio ambiente não sendo considerada uma epidemia. A partir dos anos 90, surtos isolados de esporotricose foram relatados. Dos anos 2001 a 2016, seguindo até aos dias atuais, o Brasil enfrenta uma epidemia da doença sendo os estados que mais relatam casos o Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo. Fonte: Gremião *et al.*, 2017.

As doenças endêmicas são doenças que ocorrem constantemente em uma dada região e apresentam certas características que as enquadram como tal. Por exemplo, doenças endêmicas apresentam região geográfica restrita, são causadas normalmente por fungos dimórficos e comumente a porta de entrada é através da via respiratória/pulmonar (Chakrabarti *et al.*, 2015). A esporotricose apesar de ser classificada como uma doença endêmica, apresenta características que são próprias em

relação as outras doenças endêmicas, como o fato de ser distribuída mundialmente e estar presente em praticamente todos os continentes, além de ser a única doença causada por um fungo dimórfico que não utiliza a via pulmonar como principal forma de entrada, e ainda, sua ecologia, epidemiologia e manifestações clínicas variam de acordo com a localização geográfica (Chakrabarti *et al.*, 2015). Nos últimos 20 anos a doença tem sido estudada como uma infecção fúngica emergente muito importante especialmente na América Latina. Sendo assim, esforços para a compreensão da fisiopatologia, prevenção e tratamento da doença estão sendo feitos.

1.2 *Sporothrix* spp.

O gênero *Sporothrix* é pertencente ao filo Ascomycota, à classe Sordariomycetes, à ordem Ophiostomatales e à família Ophiostomataceae e são os patógenos mais relevantes dentro de sua ordem (Guarro, Gené e Stchigel, 1999). São fungos dimórficos os quais se apresentam na forma de hifas em temperatura ambiente (25-27°C) e transitam para a morfologia leveduriforme aos 37°C. A Figura 2 demonstra sua aparência na fase de micélio, podendo ou não haver a produção de melanina de acordo com o tempo de cultura (Fig. 2A). Em sua aparência microscópica são características hifas hialinas septadas e conidiósforos em formato de “buquê” ou “em magarida” (Fig. 2B) (Orofino-Costa *et al.*, 2017). É possível observar diferenças na morfologia dos conídios de diferentes espécies bem como características fenotípicas de metabolismo distintas, o que pode ser utilizado como método de identificação presuntiva no diagnóstico (Marimon *et al.* 2007; de Meyer *et al.* 2008;).

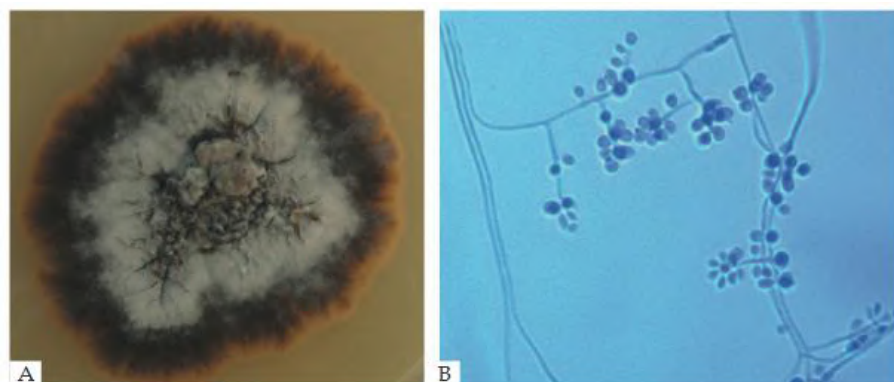


Figura 2 - Macro e micromorfologia da fase de hifa de *Sporothrix brasiliensis*. A. Macromorfologia da fase de micélio. B. Micromorfologia de hifas e conídios. Fonte: Orofino-Costa *et al.*, 2017.

Até os anos 2000, acreditava-se que a espécie *Sporothrix schenckii* era a única espécie a estar envolvida no desenvolvimento da esporotricose em animais e seres humanos. Marimon e colaboradores (2007) descreveram então três novas espécies, *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. mexicana*. Deste modo, deu-se origem ao complexo *Sporothrix* que conta atualmente com 5 principais espécies de relevância clínica: *S. schenckii sensu stricto*, *S. globosa*, *S. brasiliensis*, *S. luriei* e *S. mexicana*. Desde então diversos estudos demonstraram que diferentes regiões do mundo têm prevalência de dada espécie. Como mostrado na Figura 3, *S. schenckii* é distribuída mundialmente e *S. brasiliensis* é uma espécie predominante no Brasil, sendo até 2017 encontrado apenas neste país. Atualmente *S. brasiliensis* já foi relatado nos países vizinhos Argentina e Paraguai (García Duarte *et al.*, 2017; Córdoba *et al.*, 2018). *S. globosa*, além de também ser mundialmente distribuída, é a espécie predominante na Ásia (Chakrabarti *et al.*, 2015).



Figura 3 - Mapa da distribuição mundial das espécies de *Sporothrix* e sua prevalência em cada região. *S. brasiliensis* é a espécie predominante no Brasil, sendo responsável pela grande maioria dos casos, porém já foi encontrada também na Argentina e Paraguai. *S. schenckii* está presente principalmente no continente americano, enquanto *S. globosa* prevalece no continente asiático. As porcentagens indicam a predominância de cada espécie em dado continente. Fonte: Chakrabarti *et al.*, 2015.

As diferentes espécies de *Sporothrix* apresentam algumas particularidades de espécie para espécie. Arrillaga-Moncrieff e colaboradores (2009) demonstraram que as diferentes espécies possuem níveis de virulência distintos. No estudo, *S. brasiliensis* foi relatada como a espécie mais virulenta, seguido de *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. albicans* – esta última atualmente reconhecida como *S. pallida* (de Meyer *et al.*,

2008). Outros estudos corroboram com esse achado relatando que a expressão de melanina e urease são maiores em *S. brasiliensis* que em *S. schenckii* (Almeida-Paes *et al.*, 2015). *S. brasiliensis* parece, ainda, ter uma capacidade de disseminação maior do que *S. schenckii* e *S. globosa* (Fernandes *et al.*, 2013). Além disso, a susceptibilidade a antifúngicos também parece variar de acordo com a espécie, com a menor responsividade vista em *S. pallida*, *S. globosa* e *S. mexicana* (Marimon *et al.*, 2008). Isolados de *S. brasiliensis* recentes demonstraram MICs (MIC, do inglês *Minimal Inhibitory Concentration*) maiores em comparação com estudos mais antigos, indicando que a resistência a antifúngicos neste gênero pode vir a ser um problema futuramente (Marimon *et al.*, 2008; Borba-Santos *et al.*, 2015; Waller *et al.*, 2021). Com isso, o diagnóstico e identificação correta da espécie envolvida na infecção pode ser crucial para um tratamento eficiente (Marimon *et al.*, 2008).

Com as informações apresentadas até o momento, fica claro que as diferentes espécies do complexo *Sporothrix* apresentam características distintas que podem ter um papel na interação com o hospedeiro. Deste modo, são necessários mais estudos que esclareçam a relação entre as espécies e os diferentes tipos de manifestações observadas na clínica, tendo em vista que esta correlação ainda não está bem estabelecida (Almeida-Paes *et al.*, 2015).

1.3 Manifestações clínicas da esporotricose humana

A doença se manifesta de diferentes formas, podendo acometer tanto indivíduos imunocompetentes quanto imunocomprometidos. Entre as formas mais comuns da doença estão as formas localizada e linfocutânea (Lopes-Bezerra, Schubach e Costa, 2006). Porém, existem outras diversas formas clínicas, como infecções sistêmicas, que podem afetar locais distantes do sítio primário de infecção, bem como atingir mucosas e causar imunoreatividade (Tabela 1) (Orfino-Costa *et al.*, 2017).

Tabela 1 - Manifestações clínicas da esporotricose. Adaptado de ORFINO-COSTA *et al.*, 2017.

Pele	Linfocutânea Cutânea localizada Inoculação múltipla
Membrana Mucosa	Ocular Nasal

	Outras
Sistêmica	Osteoarticular Cutânea disseminada Pulmonar Neurológica Sepse
Imunoreativa	Eritrema nodular Eritrema multiforme Síndrome de Sweet Artrite reativa
Regressão espontânea	

A forma linfocutânea da doença atinge cerca de 60 a 80% dos pacientes (Conceição-Silva e Morgado, 2018). É descrita como uma lesão que começa a ser visível de 2 a 4 semanas após a inoculação do fungo através de um trauma sofrido na pele. Nesse período, a lesão tem uma característica papulonodular e eventualmente começa a ulcerar. Posteriormente, com o acometimento de regiões mais profundas da pele, o fungo ganha acesso aos vasos linfáticos e outras lesões aparecem, seguindo o caminho dos mesmos (Figura 4A-B) (Orfino-Costa *et al.*, 2017).

A forma localizada acomete cerca de 25% dos indivíduos que desenvolvem a esporotricose (Conceição-Silva e Morgado, 2018). Nesta manifestação, as lesões são similares às lesões da forma linfocutânea, também com aspecto papulonodular e com ulcerações. Porém, neste caso as lesões permanecem localizadas no local de inoculação primária do fungo, não formando outras novas (Figura 4C) (Orfino-Costa *et al.*, 2017).





Figura 4 - Manifestações clínicas da esporotricose. (A) Forma linfocutânea da doença, onde as feridas seguem o caminho dos vasos linfáticos. (B) Caso da doença em criança, também na forma linfocutânea. (C) Lesão característica da forma localizada da doença, a qual o paciente desenvolve uma lesão única no local de inoculação do fungo. Fonte: Adaptado de Orfino-Costa *et al.*, 2017.

Existem ainda pacientes que apresentam múltiplas lesões, porém sem envolvimento sistêmico. Neste caso, o indivíduo contrai a doença através de múltiplos traumas, desenvolvendo lesões em locais distintos, não sendo considerada esporotricose disseminada (Orfino-Costa *et al.*, 2017).

As formas extracutâneas, como a forma disseminada, pulmonar e osteoarticular podem acometer de 5 a 10% dos pacientes (Conceição-Silva e Morgado, 2018). De fato, existe a associação entre o desenvolvimento das formas extracutâneas principalmente com indivíduos imunocomprometidos, como pacientes com HIV, diabetes e alcoolismo (Aguinaga *et al.*, 2014; Moreira, Freitas e Lamas, 2015). A forma pulmonar pode ser contraída raramente de maneira primária através da inalação de conídios de um ambiente contaminado com o fungo ou de maneira secundária quando o fungo ganha acesso à corrente sanguínea do indivíduo a partir de uma lesão primária (Orfino-Costa *et al.*, 2017). Outras formas extracutâneas que podem acometer principalmente indivíduos imunocomprometidos são as formas cutânea disseminada, pulmonar, neurológica e osteoarticular, todas tendo inicialmente o acometimento cutâneo com posterior disseminação para esses locais (Orfino-Costa *et al.*, 2017).

Como mencionado acima, sabemos que existe a associação do desenvolvimento de formas extracutâneas com indivíduos imunocomprometidos. Porém, indivíduos imunocompetentes também apresentam quadros distintos da doença. Devido a isso, fatores como o estado imunológico do paciente, a profundidade do trauma de inoculação, virulência da espécie e a carga fúngica do inóculo podem estar envolvidos nas diferentes manifestações clínicas (Almeida-Paes *et al.*, 2015).

1.4 Resposta imunológica associada à esporotricose

Em geral, a resposta imunológica associada a fungos se dá principalmente pela imunidade inata, especialmente pelos fagócitos. A parede celular fúngica constitui a principal fonte de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (ou PAMPs, do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) que são reconhecidos pelos Receptores de Reconhecimento de Padrões (ou PRRs, do inglês *Pattern Recognition Receptors*) presentes nas células da imunidade inata. O reconhecimento de PAMPs pelos PRRs de células imunes inatas induz a fagocitose desses microrganismos, eliminando-os. Porém, algumas características das células fúngicas podem tornar esse mecanismo não tão eficaz, como o fato de a parede celular conter variadas moléculas glicosiladas e hidrofóbicas, outras que mascaram moléculas mais imunogênicas, capacidade de formar cápsulas polissacarídicas, além de seu tamanho variável – fungos possuem diferentes morfologias de acordo com a espécie, como as formas de hifas e leveduras. Essas características podem dificultar a interação fungo-fagócito e conseqüentemente, o desenvolvimento uma resposta imunológica mais robusta (Erwig e Gow, 2016). Ademais, as diferenças na composição da parede celular de espécies fúngicas influencia diretamente no reconhecimento das células fúngicas pelas células inatas, o que implica em diferenças na resposta imune que é gerada (Erwig e Gow, 2016).

Além da linha de frente que a imunidade inata provém, células como as células dendríticas e os macrófagos são importantes para fazer a conexão entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa. Essas células, que chamamos de Células Apresentadoras de Antígenos (APCs, do inglês *Antigen Presenting Cells*), apresentam antígenos aos linfócitos T, sendo de suma importância a diferenciação destes nas subpopulações Th1 e Th17, que irão executar uma resposta efetora específica contra fungos (Conceição-Silva e Morgado, 2018). Porém, o desenvolvimento da esporotricose é controlada principalmente pela imunidade celular, visto que a imunidade humoral participa apenas em estágios avançados da doença (Carlos *et al.*, 2009). Dito isto, uma resposta celular bem modulada é imprescindível. A exacerbação dessa resposta pode resultar em maior destruição tecidual, como descrito por Gaze e colaboradores (2006), enquanto outro estudo associou a forma linfocutânea, que normalmente acomete tecidos adjacentes, com uma maior prevalência de neutrófilos, células CD4+ e maior produção de Óxido Nítrico Sintase (NOS, do inglês *Nitric Oxide Synthase*) quando comparada com a forma localizada, que normalmente é a manifestação mais controlada da doença (Morgado *et al.*, 2011).

O reconhecimento de *S. schenckii* via PRRs induz a produção de citocinas como TNF, IL-1 β , IL-6, IL-18 e IL-12. Essas condições levam à uma alta produção de IFN γ , que aumenta a atividade de apresentação de antígenos às células T e, em presença de IL-12, ocorre a fixação da resposta imune do tipo 1 – modulada por células Th1, que induzem uma resposta pró-inflamatória através da produção de citocinas e recrutamento de células efetoras (Ruiz-Baca *et al.*, 2021). Como mencionado anteriormente, um mecanismo efetor eficiente é a produção de ROS pelas células fagocíticas, que no ambiente fagolisossômico – em um cenário de resolução positivo – leva à eliminação do fungo. Desta maneira, células imunes como macrófagos e neutrófilos são importantes, levando em consideração que são os principais tipos celulares que produzem estas moléculas. Kajiwara e colaboradores (2004) demonstram a importância de ROS em modelos experimentais de esporotricose, onde camundongos deficientes em NADPH oxidase – parte importante no mecanismo de geração de ROS – demonstraram dificuldades em controlar a infecção por *S. schenckii*, levando à disseminação e subsequente morte. Em outros casos, dependendo da espécie envolvida na infecção, a produção aumentada de ROS pode causar um maior dano tecidual, como observado na infecção por *S. brasiliensis* (Mario *et al.*, 2017). Outro potencial fungicida são as Espécies Reativas de Nitrogênio (RNS, do inglês *Reactive Nitrogen Species*), porém, Maia e colaboradores (2006) demonstraram que camundongos deficientes em NOS apresentaram uma maior resistência em desenvolver a doença, sugerindo que talvez a ativação do sistema de NO esteja envolvido na imunossupressão causada no microambiente em estágios mais avançados da doença, entre as 4^a e 6^a semanas.

Como abordado anteriormente, acredita-se que a patogênese da esporotricose se desenvolva de acordo com diferentes variáveis, como a espécie envolvida na infecção, o estado imunológico do paciente, o tamanho do inóculo e a profundidade do trauma. Dentro deste contexto, discute-se principalmente o papel das diferentes espécies no tipo de resposta orquestrada pelo paciente (Mario *et al.* 2017; Batista-Duarte *et al.* 2018; Villalobos-Duno *et al.* 2021). Estudos já demonstraram que *S. schenckii* e *S. brasiliensis* possuem diferenças em suas paredes celulares, gerando diferenças no reconhecimento dessas espécies por Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMCs, do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*), resultando em uma resposta mais inflamatória, como demonstrado pelo aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, em resposta a *S. schenckii* do que a *S. brasiliensis*. Estes achados poderiam estar relacionados com o fato de que *S. schenckii* normalmente causa lesões mais bem

controladas na forma localizada e *S. brasiliensis* lesões mais severas com raros casos de auto-resolução (Martínez-Álvarez *et al.*, 2017). Por outro lado, Kischkel e colaboradores (2022) demonstraram que *S. brasiliensis* induziu uma maior resposta inflamatória em comparação com *S. schenckii* e que este achado estaria associado à maior destruição tecidual que *S. brasiliensis* causa. Os autores apontam que esta diferença relatada pode estar atribuída às condições de cultura do fungo e à etnia dos doadores das PBMCs.

Ainda neste contexto, Batista-Duarte e colaboradores (2018) sugeriram que a maior destruição tecidual e disseminação causada por *S. brasiliensis* seria por um desbalanço na resposta celular, na qual um equilíbrio inicial de Th1 e Th17 é requerido para um controle eficiente da infecção. Neste caso, *S. brasiliensis* induz uma resposta que reduz a quantidade de células Th1 enquanto aumenta a quantidade de Th17 e Tregs, tornando ineficaz o controle da inflamação.

Diante deste cenário, o esclarecimento acerca das respostas desenvolvidas pelo hospedeiro contra a infecção por *Sporothrix* spp. ainda não é bem estabelecida e mais estudos sobre a interação entre o sistema imune e as diferentes espécies no desenvolvimento da esporotricose ainda é necessário.

1.5 Imunidade Treinada

O sistema imunológico, constituído por células de reconhecimento e defesa, é dividido em duas especialidades: imunidade inata e imunidade adaptativa. Quando entramos em contato com um patógeno, o reconhecimento imediato é feito pelas células da imunidade inata, como os neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, de maneira específica em um contexto de especificidade molecular para estruturas conservadas em diversos microrganismos— bactérias, fungos, protozoários e vírus. Essas células irão trabalhar para o controle e eliminação do patógeno enquanto a imunidade adaptativa, quando necessária, auxilia no desenvolvimento de uma resposta mais eficiente para a eliminação total do microrganismo, que demora cerca de 4 a 14 dias para ser efetivamente iniciada. A resposta imune adaptativa é montada através do processo chamado de “sinapse imunológica”, quando células dendríticas, após a fagocitose do patógeno e os estímulos recebidos do microambiente, migram para os locais onde se encontram os linfócitos T e B virgens – população de células da imunidade adaptativa – e estimulam a ativação e diferenciação das células antígeno específicas, neste caso para um epítipo específico de certa estrutura do invasor em questão. Sendo assim, as

células T se tornam capazes de auxiliarem outras células aumentando suas funções efetoras ou matando especificamente células infectadas e as células B são induzidas a produzirem anticorpos. Ao retorno da homeostase, permanecem células de memória que estarão preparadas para lidar com um possível segundo encontro com o mesmo patógeno de forma mais rápida (Abbas e Lichtman, 2015).

Neste cenário, a imunidade inata teria uma resposta imediata, sem especificidade antigênica e sem capacidade de memória imunológica enquanto a imunidade adaptativa teria uma resposta demorada, altamente específica e detentora de memória imunológica que as tornam capazes de se “lembrar” de encontros anteriores, tornando-as, assim, capazes de realizar uma resposta mais eficiente na segunda vez em comparação com a primeira. Porém, nas últimas décadas, dados na literatura sugerem que células da imunidade inata também são capazes de desenvolver memória, consequentemente respondendo melhor em casos de reinfecção ou infecções secundárias (Figura 5) (Kurtz, 2005).

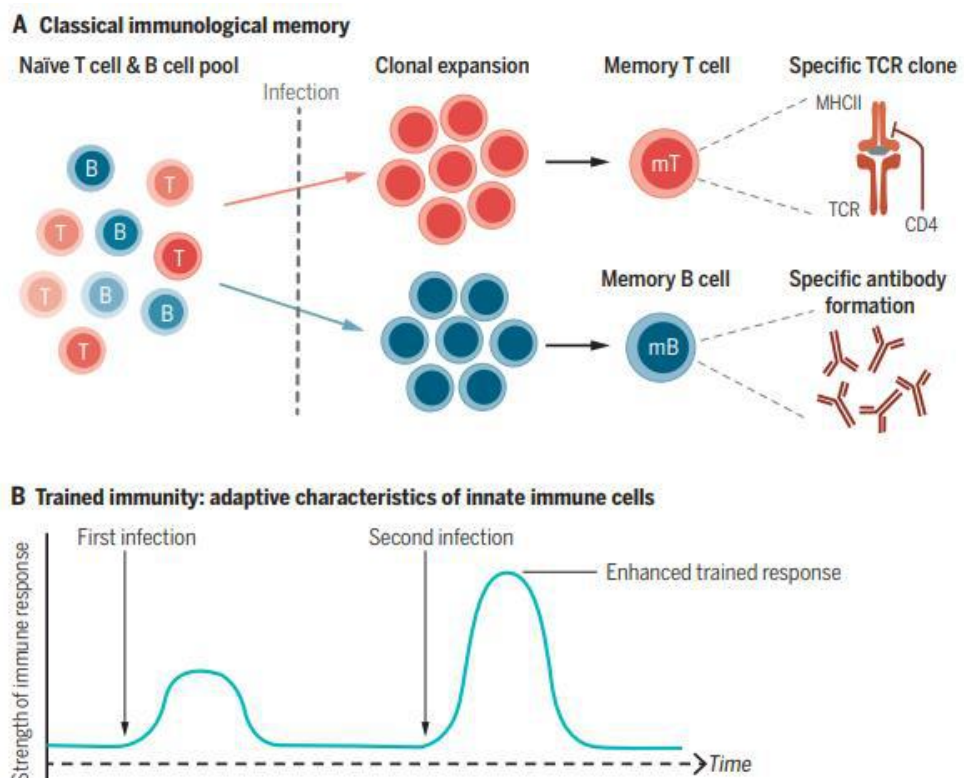


Figura 5 - Memória imunológica clássica vs Imunidade treinada. **A.** Memória imunológica clássica, baseada no reconhecimento altamente específico de antígenos por linfócitos T e B, que sofrem expansão clonal. Após a eliminação da infecção, esses linfócitos sofrem contração, sobrevivendo apenas os de memória, que em um segundo encontro são capazes de gerarem uma resposta mais rápida e consequentemente mais eficiente. **B.** A imunidade treinada após um estímulo/infecção primária consegue, em um segundo encontro, responder de forma mais rápida e eficiente de modo similar à imunidade

adaptativa, porém os mecanismos por trás desta “memória” são completamente distintos entre os dois processos. Fonte: Netea *et al.*, 2016.

O sistema imune adaptativo como conhecemos em mamíferos apareceu em seres vivos há cerca de 450 milhões de anos nos primeiros animais vertebrados mandibulados, os peixes. Animais invertebrados possuem então apenas sistemas inatos, como presença de receptores Toll-like, sistema complemento, sistema de fagocitose e peptídeos antimicrobianos, enquanto plantas possuem mecanismos inatos como o reconhecimento de invasores e produção de moléculas tóxicas (Figura 6) (Yatim e Lakkis, 2015).

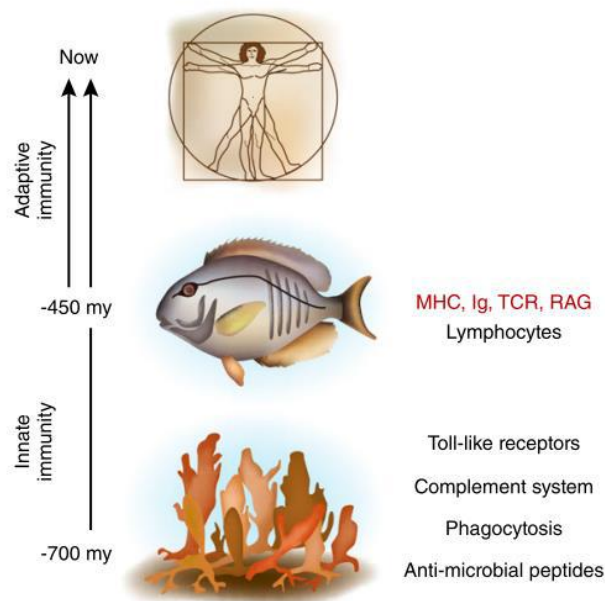


Figura 6 - Evolução do sistema imunológico. Nossos ancestrais mais antigos contavam apenas com a proteção inata, sem as especialidades da imunidade adaptativa como o Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC), Imunoglobulinas (Igs), linfócitos e genes de recombinação somática, que surgiu apenas há 450 milhões de anos em vertebrados mandibulados. Fonte: Yatim e Lakkis, 2015.

Dito isto, pensar em uma memória atribuída ao sistema imune inato não é descartável, levando em consideração que seres providos apenas de sistemas inatos conseguem lidar melhor com o invasor em respostas secundárias, como o Sistema de Resistência Adquirido (SAR) em plantas (Durrant e Dong, 2004), a proteção contra infecções secundárias e reinfecções em insetos a partir de um estímulo primário podendo ser LPS ou pré-desafios com bactérias (Moret e Siva-Jothy, 2003; Pham *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2010), ou mesmo em vertebrados a partir de um desafio primário ou até através da vacinação (Tabela 2) (Bistoni *et al.*, 1986; Wout, Poell e Furth, 1992; Garly *et al.*, 2003; Netea *et al.*, 2011).

Tabela 2 - Evidências da indução da memória imune inata. Diversos estudos já demonstraram uma memória associada à imunidade inata, onde a partir de infecções primárias com agentes infecciosos ou moléculas não-próprias, como o LPS, o organismo ganha proteção contra infecções secundárias ou reinfecções. Adaptado de Netea *et al.*, 2011.

Organismo	Modelo experimental	Efeito biológico
Plantas		
Variedade de plantas	Vírus, bactérias, fungos	Proteção contra reinfecção
Invertebrados		
Larva-da-farinha	LPS ^a ou desafio bacteriano	Proteção contra infecção secundária
<i>Drosophila</i>	Desafio com <i>S. pneumoniae</i>	Proteção contra <i>S. pneumoniae</i>
<i>Anopheles gambiae</i>	Desafia com <i>Plasmodium</i>	Proteção contra <i>Plasmodium</i>
Vertebrados		
Camundongos	BCG ^b	Proteção contra candidíase
Camundongos	Vacinação com <i>Candida</i>	Proteção independente de células T e B
Humanos	BCG	Proteção não específica contra infecções secundárias

^aLPS - Lipopolissacarídeo;

^bBCG - Bacilo Calmette-Guérin.

Segundo Netea e colaboradores (2011), os fenômenos descritos acima não poderiam ser considerados um tipo de resposta inata, pois necessitam de um estímulo primário para ser gerado e nem um tipo de resposta adaptativa, já que não depende de especificidade antigênica obtida através de recombinação somática. A partir destas observações, foi proposto o termo “Imunidade Treinada” para nos referirmos ao tipo memória imunológica das células inatas.

Por definição, a imunidade treinada é um processo pelo qual as células imunes inatas conseguem, assim como as células da imunidade adaptativa, responder de maneira mais rápida e robusta em um estímulo secundário. Porém, enquanto a imunidade adaptativa requer tempo e especificidade antigênica para sua resposta ser montada, a imunidade treinada age de maneira rápida e sem especificidade – ambas trabalham para uma

resposta mais eficaz em eventuais infecções secundárias ou reinfecções, embora a partir de mecanismos distintos (Netea *et al.*, 2020).

Diversos estudos já demonstraram que a exposição a agentes derivados de microrganismos, como β -glucanas, dipeptídeos muramil, CpG e flagelina, desencadeiam uma resposta secundária mais robusta em um desafio secundário, com uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias (Di Luzio e Williams, 1978; Krahenbuhl *et al.*, 1981; Muñoz *et al.*, 2010; Marakalala *et al.*, 2013; Ribes *et al.*, 2014). Em 2020, em um estudo publicado por Ciarlo e colaboradores, foi demonstrado claramente que a imunidade treinada induzida por zymosan – uma β -glucana – confere proteção contra diferentes infecções bacterianas em modelos murinos, como pneumonia, enterite e peritonite. Outra forte indutora da imunidade treinada amplamente estudada é a vacina BCG. A vacina BCG é feita à base da bactéria *Mycobacterium bovis*, uma cepa bovina atenuada capaz de gerar proteção contra o agente etiológico da tuberculose em humanos, *M. tuberculosis*. Existem diversas evidências de que a BCG possui capacidade de proteção heteróloga, ou seja, diferente da proteção específica que uma vacina induz, agindo através da imunidade treinada contra fungos, bactérias e protozoários (Wout, Poell e Furth, 1992; Kleinnijenhuis *et al.*, 2012; Arts *et al.*, 2018; Walk *et al.*, 2019).

Nos últimos 20 anos, os estudos acerca dos mecanismos responsáveis pelo estabelecimento do estado de treinamento das células inatas levaram à conclusão de que a base para tal feito são reprogramações epigenéticas e mudanças metabólicas na célula treinada (Netea *et al.*, 2020). A regulação gênica de uma célula é de extrema importância para uma boa execução de suas funções. A expressão dos genes é regulada por diversos mecanismos, dentre os quais está a alteração de histonas que tornam mais acessíveis ou inacessíveis os genes da região na qual ela se encontra. A estimulação de células imunes inatas altera a expressão de genes relacionados à resposta inflamatória a partir do remodelamento das regiões necessárias para a expressão desses genes (Smale, Tarakhovsky e Natoli, 2014). O processo de imunidade treinada induz marcações nas histonas, chamadas de marcas epigenéticas, sendo as principais a monometilação e trimetilação da lisina 4 da histona 3 (H3K4me1 e H3K4me3, respectivamente) e a acetilação da lisina 27 da histona 3 (H3K27ac) (Figura 7). Essas modificações levam ao acesso mais rápido dos genes inflamatórios em casos de reestimulação, tornando as células mais eficazes em expressá-los (Saeed *et al.*, 2014). Paralelamente às reprogramações epigenéticas, ocorrem também mudanças metabólicas indispensáveis

para o estabelecimento do estado de célula treinada. Estudos demonstram que o reconhecimento de certas moléculas – indutoras da imunidade treinada – regulam positivamente diferentes vias metabólicas como a glicólise, o ciclo do ácido tricarbóxico (ou ciclo de Krebs) e o metabolismo de ácidos graxos, onde alguns intermediários dessas vias como fumarato e acetil coenzima A, são necessários para o funcionamento de enzimas envolvidas na remodelação das histonas – responsáveis pela formação das marcas epigenéticas (Mulder *et al.*, 2019).

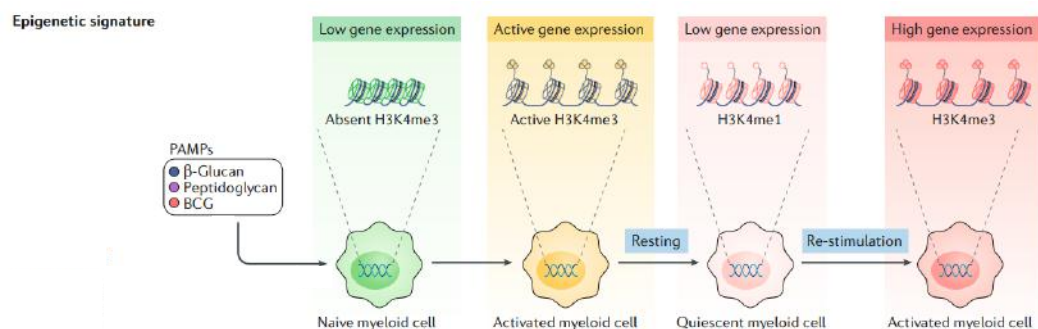


Figura 7 - Marcas epigenéticas em células treinadas. Na célula quiescente, a cromatina na região de genes inflamatórios está bastante condensada. A partir do momento em que essa célula é ativada, acontecem remodelações nos nucleossomos, onde histonas são modificadas para que os genes sejam acessados. Neste momento, a principal marca epigenética é a H3K4me3. Após a célula voltar a um estado de repouso, parte da marca epigenética de sua ativação permanece, desta vez na forma de H3K4me1. Desta maneira, em uma situação de reestimulação, essa célula consegue acessar mais rapidamente os genes, produzindo-os de maneira mais rápida e robusta. Adaptado de Mulder *et al.*, 2019.

Ao que diz respeito à duração deste tipo de memória, diferentemente da memória desenvolvida pelo sistema imune adaptativo, que confere uma proteção de longa duração, a imunidade treinada confere uma proteção de curta duração. Ainda não se sabe ao certo o tempo que esses estímulos permanecem surtindo efeito, porém estudos já relataram efeitos de alguns meses a um ano (Kleinnijenhuis *et al.*, 2012; Quintin *et al.*, 2012; Ciarlo *et al.*, 2020). Apesar de monócitos terem um tempo de vida curto para que estes efeitos fossem vistos por longos períodos de tempo, indivíduos vacinados com BCG apresentaram monócitos treinados na circulação após 3 meses da administração. Estes achados implicam que os efeitos da imunidade treinada também ocorrem na medula óssea estimulando progenitores mielóides, gerando monócitos em um estado já treinado (Kleinnijenhuis *et al.*, 2012; Netea *et al.*, 2016). Um estudo feito por Mitroulis e colaboradores (2018) demonstra claramente este efeito na medula óssea, onde foram

observadas uma maior quantidade de progenitores multipotentes e células-tronco de longo prazo após a administração de β -glucana.

Diante disto, o uso da imunidade treinada como alternativa terapêutica contra doenças infecciosas e inflamatórias é um assunto que está sendo amplamente estudado, além de seu possível papel em doenças autoimunes e neurodegenerativas. O estudo acerca dos mecanismos da imunidade treinada e seu potencial terapêutico pode levar ao desenvolvimento de novas gerações de vacinas que combinem memória imune inata e adaptativa, de novas estratégias de tratamento em doenças como câncer e sepse e para o entendimento das consequências deletérias desse processo em certas doenças (Netea *et al.*, 2020).

2 JUSTIFICATIVA

Diante do que foi abordado na introdução, há uma preocupação crescente com o aumento do número de casos de esporotricose no estado do Rio de Janeiro e adjacências. O tratamento da esporotricose humana e felina, que pode levar meses para ser concluído, eleva seu custo e conseqüentemente causa o abandono do uso das terapias indicadas, levando em consideração que os mais atingidos são indivíduos de classe baixa. Além disso, devido ao mesmo motivo, o abandono de animais infectados também é uma realidade. Este atual cenário pode contribuir ainda mais para a situação de epidemia e endemia da região, pois o animal infectado poderá continuar transmitindo para outros animais, perpetuando também o ciclo de transmissão zoonótica. Desta maneira, se torna necessário o desenvolvimento de terapias alternativas para o tratamento da doença a fim de diminuir o tempo do tratamento e a situação de epidemia do estado. Neste contexto, a imunidade treinada poderia ser uma alternativa adjuvante ao tratamento e até mesmo possuir um efeito na prevenção da doença através da contenção mais eficiente da carga fúngica, como demonstrado em estudos nos últimos anos. Tomando como base a literatura, nossa hipótese é que macrófagos podem ser treinados e esse processo beneficiaria o hospedeiro na contenção da esporotricose. Além dos motivos descritos acima, nosso trabalho também poderá enriquecer a literatura acerca do estudo da imunidade treinada como tratamento e profilaxia de doenças infecciosas.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Estudar o papel da imunidade treinada no modelo de esporotricose experimental e o papel de macrófagos nesse contexto.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar o efeito microbicida e a produção de citocinas *in vitro* por macrófagos peritoneais e derivados da medula treinados *in vivo*;
- Analisar o efeito da β -glucana no modelo de esporotricose experimental murino.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos ou fêmeas, que ficaram mantidos no biotério localizado no Laboratório de Inflamação e Imunidade pertencente ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Todos os animais foram mantidos em microisoladores previamente esterilizados, à temperatura constante de 25°C, com ciclos de 12 horas luz/escurecimento e acesso livre à água e ração. Os experimentos foram realizados de acordo com os procedimentos indicados pelo Comitê de Ética Para Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ (protocolo 106/22).

4.2 Cultura de *Sporothrix brasiliensis*

A cepa *S. brasiliensis* ATCC 5110 foi utilizada para todos os experimentos. Para a obtenção de conídios, o fungo foi cultivado em ágar Sabouraud à temperatura ambiente por 5 dias. Os conídios foram coletados a partir da adição de 5 mL de PBS Tween 0,05% e subsequente raspagem da superfície do meio utilizando *Cell Scraper*. O volume coletado foi passado por um filtro de nylon de 40 µm durante a passagem para um tubo cônico de 50 ml utilizando pipeta volumétrica. O coletado foi dividido em eppendorfs de 1,5 mL e centrifugados a 13000 RPM por 5 minutos. Após a primeira centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os pellets foram suspensos em 1 mL de PBS, de forma que ao final todos os pellets fossem suspensos juntos em apenas um eppendorf. Foram feitas mais 2 lavagens e suspensões com PBS. Após as lavagens, foi feita a contagem de conídios na câmara de Neubauer para a quantificação de conídios/mL.

Para a obtenção das leveduras, o fungo foi cultivado em 10 mL de meio líquido *Brain Heart Infusion* (BHI) à 37°C por 72h em tubos cônicos de 50 ml a 150 RPM. Quando necessário, a cultura foi passada diversas vezes em uma agulha de 27,5G e centrifugada por 2 min a 100 g para remover hifas. Após esse processo, foi feita a centrifugação da cultura e as lavagens, como descrito anteriormente, para posterior contagem.

4.3 Imunidade treinada no modelo murino de esporotricose

Para avaliar o efeito da imunidade no desenvolvimento da esporotricose, animais foram pré-tratados com duas formas diferentes de β-glucana: Curdlana (InvivoGen) ou

Beta Glucan Peptide (BGP, InvivoGen). Animais que foram pré-tratados com curdlana receberam 2 injeções intraperitoneais contendo 1 mg em 500 μ L, sendo a primeira 7 dias antes da infecção e a segunda, 3 dias antes. Para a análise com BGP, animais foram pré-tratados com uma injeção intraperitoneal contendo 1 mg em 500 μ L 7 dias antes da infecção. Além do protocolo de treinamento através da via intraperitoneal, animais também receberam uma injeção local de 200 μ L contendo 1 mg de BGP na região dorsal sacral a fim de avaliar o efeito local do treinamento no desenvolvimento da doença. Independentemente da via de treinamentos, 7 dias após a primeira injeção das β -glucanas, os camundongos foram infectados por injeção subcutânea com 10^7 conídios em 200 μ L de PBS na região dorsal sacral. Os animais foram acompanhados por um período de 35 dias após a infecção, onde foram medidas as lesões cutâneas e avaliada a disseminação da infecção pela formação de nódulos na cauda e lesões macroscópicas no fígado e baço. As amostras destes tecidos foram coletadas para a quantificação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

4.4 Análise quantitativa da disseminação da infecção

Para a análise quantitativa da infecção foram coletados o fígado, baço e a pele da região de inoculação do fungo aos 14 e 35 dias. Os órgãos foram colocados em eppendorfs contendo PBS para posterior maceração. Em placa de 96 poços, foram adicionados 20 μ L da amostra que foi macerada em 180 μ L de PBS para a realização de diluição seriada até 1:100.000 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}). O plaqueamento foi feito em ágar Sabouraud através da técnica de *Drop Plate*, onde pipetamos 10 μ L em triplicata de cada poço. Após o plaqueamento, as placas foram mantidas à temperatura ambiente por 3 dias e foi feita a contagem das colônias para o cálculo de UFC por tecido.

4.5 Tratamento in vivo com β -glucanas

O treinamento *in vivo* de macrófagos peritoneais foi induzido a partir da injeção intraperitoneal de β -glucanas. Para os experimentos com curdlana (InvivoGen), os animais foram injetados 2 vezes com 1 mg diluído em 500 μ L de PBS com intervalo de 3 dias e as células foram coletadas 7 dias após a primeira injeção. Para os experimentos com BGP (*Beta-glucan peptide*, InvivoGen), os animais foram injetados 1 vez com 1 mg diluído em 500 μ L de PBS e as células foram coletadas após 7 dias. Animais controle receberam, pela mesma via, 500 μ L de PBS. Após esses estímulos, os animais foram eutanasiados para coleta de macrófagos peritoneais (MPs) e da medula óssea para

obtenção dos progenitores mielóides, que foram diferenciados em macrófagos (macrófagos derivados de medula, MDMs).

Os protocolos de injeção de β -glucanas descritos acima foram usados nos experimentos para avaliar o efeito da imunidade treinada na fisiopatologia do nosso modelo de esporotricose murino. Adicionalmente, animais também receberam uma injeção subcutânea de 200 μ L de PBS contendo 1 mg de BGP na região dorsal sacral (mesmo local da inoculação do fungo) para posterior infecção a fim de avaliar o efeito local do treinamento no desenvolvimento da doença. O grupo controle desse experimento foi injetado da mesma forma com 200 μ L de PBS.

4.6 Cultura de células treinadas

Os macrófagos peritoneais (MPs) foram coletados através do lavado peritoneal com 5 mL de meio de cultura RPMI gelado inserido na cavidade peritoneal e extraído após massagem da região. Os MPs coletados foram dispostos em tubos cônicos de 15 mL e centrifugados a 400g por 5 minutos a 4°C. Em seguida, foram suspensos em 2 mL de meio RPMI com 10% de soro fetal bovino (SFB) para a contagem e o plaqueamento das células. Em uma placa de 96 poços foram plaqueadas 2×10^5 células por poço para a realização dos experimentos de *killing* (ensaio de eliminação de *S. brasiliensis* por macrófagos treinados, descrito no tópico 4.7) e da produção das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-6 (descrito no tópico 4.8).

A obtenção dos MDMs foi feita paralelamente à coleta dos MPs. Para isso, foram coletados os fêmures e as tíbias dos animais. As extremidades proximal e distal dos ossos foram seccionadas a fim de desobstruir o canal necessário para ser feita a lavagem com seringas contendo 3 mL de meio RPMI, sendo o tecido coletado despejado em tubos cônicos de 15 mL. Após a lavagem, foi feita a homogeneização do tecido utilizando pipetador. Em seguida, foi realizada a contagem das células totais para o plaqueamento de 5×10^6 células por placa de petri [placas *optilux* não tratadas para cultivo de células, Becton Dickinson (BD)]. A diferenciação dos progenitores mielóides foi induzida em 10 mL de meio de diferenciação, que consiste em meio RPMI contendo 10% de SFB e 20% de meio condicionado de células L929, além de penicilina e estreptomicina. As placas, em seguida, foram mantidas em estufa à 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Após 3 dias, foi adicionado mais 10 mL do meio descrito anteriormente e após mais 4 dias, o sobrenadante das placas foi descartado a fim de utilizarmos apenas as células aderentes. As placas foram incubadas com 5 mL de RPMI

gelado por 10 minutos a 4°C para facilitar a liberação dos macrófagos com o auxílio de uma micropipeta de 1 ml. Os macrófagos coletados foram dispostos em tubos cônicos de 15 mL, que foram centrifugados a 400g por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação, as células foram contadas e plaqueadas (2×10^5 céls/poço) em placa de 96 poços para os mesmos experimentos descritos para os MPs.

4.7 Ensaio de eliminação de *S. brasiliensis* por macrófagos treinados

Após o plaqueamento dos macrófagos, os mesmos foram estimulados com conídios de *S. brasiliensis* com a MOI (do inglês, *multiplicity of infection*) de 0,1 fungos por macrófagos. Para determinar o valor absoluto de fungos, foram dispostos poços sem a adição dos macrófagos. Após a realização da cultura de interação, as placas foram centrifugadas a 300g por 5 min antes de serem mantidas por 6 horas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após esse tempo, o sobrenadante foi coletado e armazenado somente para adicionarmos 50 µL de água MilliQ por 10 minutos nos poços a fim de lisar os macrófagos para a contagem de fungos totais. Após os 10 minutos, o sobrenadante e o lisado celular foram misturados. Em uma nova placa de 96 poços, foram realizadas as diluições seriadas até 1:100.000 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}). O plaqueamento das amostras foi feito como descrito no item 4.4. O cálculo de eliminação dos fungos foi realizado a partir do valor absoluto de UFC dos poços sem macrófagos e a fórmula utilizada foi $[1 - (A/B)] \times 100$, onde a letra A representa a quantidade total de fungos do poço com macrófagos e B a quantidade de fungos do poço sem macrófagos. O resultado foi apresentado como % de eliminação do fungo.

4.8 Análise da produção de citocinas por macrófagos treinados

Após o plaqueamento dos macrófagos, foram adicionados diferentes estímulos: duas concentrações de LPS (10 ng/mL) como controle positivo da resposta de células treinadas e três MOIs de conídios ou leveduras de *S. brasiliensis* (1, 3 e 10). Após a adição dos estímulos, as placas foram mantidas por 6 horas em estufa à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após este período, o sobrenadante foi coletado para realização da técnica de ELISA tipo sanduíche. As citocinas analisadas foram TNF e IL-6 e os kits para dosagem da Peprotech. O ensaio foi feito de acordo com as instruções do fabricante e a quantificação obtida através da leitura de densidade óptica.

4.9 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm SEM e as diferenças estatísticas avaliadas através do Teste T de Student ($p < 0.05$). As análises foram feitas através do programa GraphPad Prism 9.0.

5 RESULTADOS

5.1 Produção de citocinas por macrófagos peritoneais e derivados de medula treinados *in vivo*

Segundo dados da literatura, β -glucanas são capazes de induzir a imunidade treinada tornando monócitos/macrófagos capazes de produzirem maiores quantidades de citocinas pró-inflamatórias após sua administração (Quintin *et al.*, 2012). Esse efeito pode ser visto tanto localmente, como, por exemplo, em macrófagos peritoneais após a administração de injeção intraperitoneal, quanto de maneira sistêmica, atingindo a medula óssea e estimulando um aumento no número de progenitores mieloides comuns e liberando monócitos na corrente sanguínea em um estado pré-treinado (Ciarlo *et al.*, 2020; Ding *et al.*, 2022). Neste trabalho, utilizamos dois tipos comerciais de β -glucanas: curdlana, que é uma β -1,3-glucana, insolúvel e particulada e a BGP, uma molécula solúvel, devido a ligação de β -(1,3 \rightarrow 1,4 \rightarrow 1,6)-glucana a um peptídeo. A partir disso, nos perguntamos se MPs e MDMs de animais que receberam injeções de curdlana ou BGP na cavidade peritoneal demonstrariam uma maior produção de citocinas em resposta a estímulos secundários *ex vivo*. O protocolo seguido para o tratamento com curdlana está exemplificado na Figura 8. Em nossos experimentos, o LPS foi utilizado como controle positivo da imunidade treinada, visto que em inúmeros trabalhos da literatura é utilizado para tal finalidade.

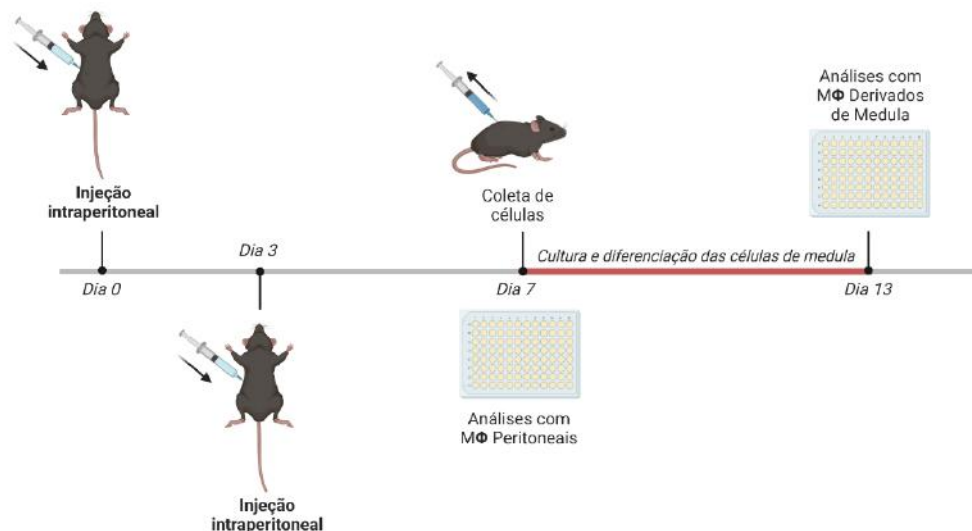


Figura 8. Protocolo de tratamento com curdlana para treinamento de células inatas. Camundongos C57BL/6 receberam duas injeções intraperitoneais (dias 1 e 3) com 1 mg de curdlana em 500 μ L de PBS. No dia 7, foi realizado o lavado intraperitoneal a fim de coletar os macrófagos para posterior análises. Paralelamente a isso, também foi coletada a medula óssea dos animais. As células provenientes da medula foram plaqueadas para diferenciação durante 6 dias e estimuladas para a análises da resposta inflamatória. Legenda: Macrófagos (M Φ). Criado em *BioRender.com*.

A Figura 9 demonstra a produção de citocinas por MPs de animais injetados ou não com curdlana na cavidade peritoneal em resposta ao LPS e a diferentes MOIs de conídios de *S. brasiliensis* (1:1, 3:1 e 10:1). Neste tipo celular, a produção de TNF foi significativamente maior nas células dos animais que receberam curdlana nos estímulos com LPS e nos MOIs 1 e 3, mas não no MOI 10 (Fig. 9A). Níveis mais altos também foram vistos quando analisamos a produção de IL-6 nas células de animais treinados comparados a de animais controle, apresentando uma maior quantidade da citocina em todos os MOIs testados (Fig. 9B).

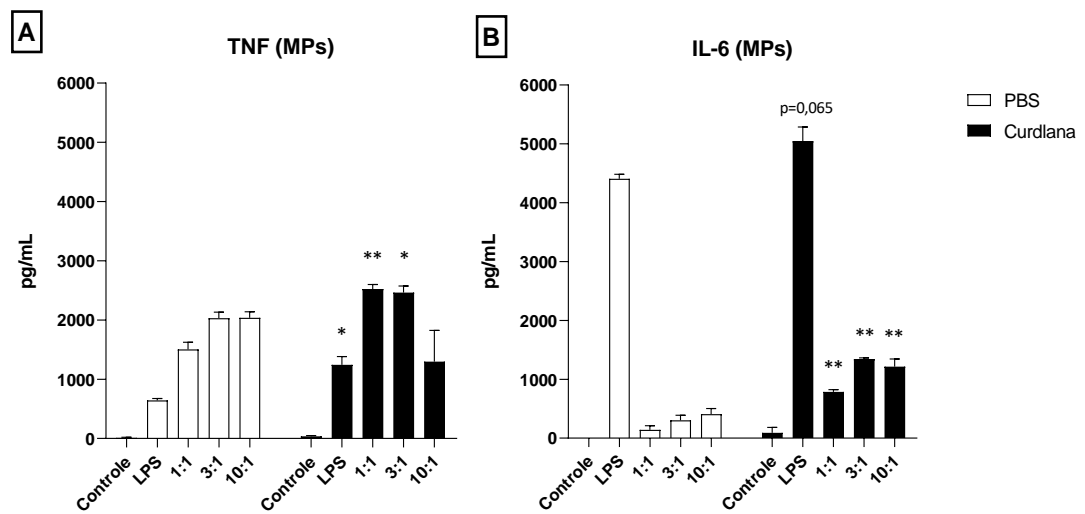


Figura 9. Produção das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-6 por macrófagos peritoneais de camundongos tratados ou não com curdlana. Macrófagos peritoneais foram plaqueados em placa de 96 poços para os estímulos com LPS (10ng/mL) e três MOIs de conídio (1, 3 e 10) de *S. brasiliensis*. O sobrenadante foi coletado 6h após os estímulos para a dosagem de **A**) TNF e **B**) IL-6 através da técnica de ELISA. Legenda: lipopolissacarídeo (LPS); Macrófagos peritoneais (MPs). A análise estatística foi feita com teste t de student não-pareado, $p < 0,05$. (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,005$.

Para observar os efeitos sistêmicos da curdlana, MDMs também foram estimulados. Não observamos diferenças significativas na produção de TNF nem de IL-6 entre as condições frente aos estímulos utilizados (Figura 10A-B). Estes resultados sugerem que o tratamento com curdlana induziu o treinamento de macrófagos locais, porém não afetou a biologia de progenitores mielóides da medula óssea, pois não foi observado o mesmo efeito em macrófagos derivados dessas células.

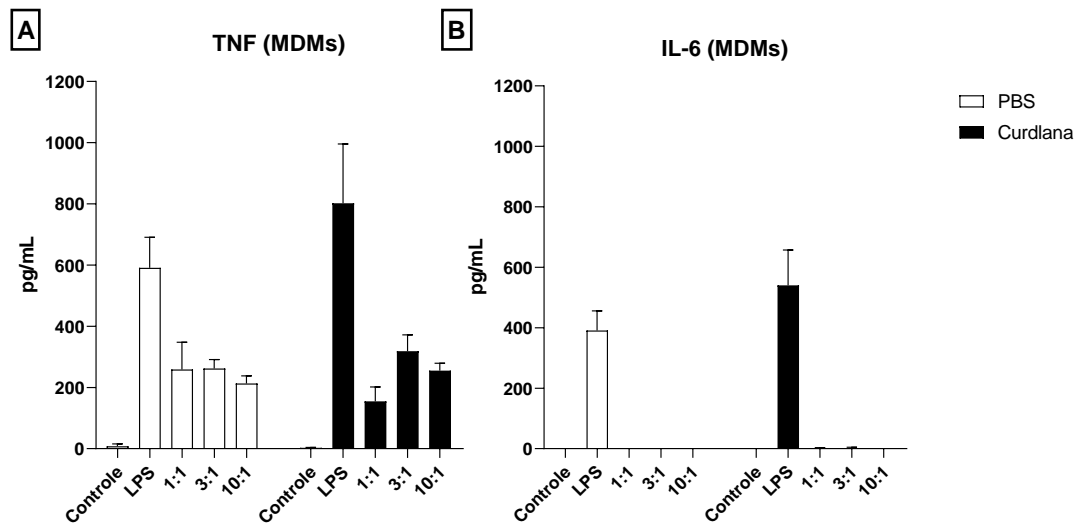


Figura 10. Produção das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-6 por macrófagos derivados de medula de camundongos tratados ou não com curdlana. Macrófagos derivados de medula foram plaqueados em placa de 96 poços para os estímulos com LPS (10ng/mL) e três MOIs de conídio (1, 3 e 10) de *S. brasiliensis*. O sobrenadante foi coletado 6h após os estímulos para a dosagem de **A)** TNF e **B)** IL-6 através da técnica de ELISA. Legenda: lipopolissacarídeo (LPS); Macrófagos derivados de Medula (MDMs). A análise estatística foi feita com teste t de student não-pareado, $p < 0,05$.

Em relação ao uso da BGP como método de indução da imunidade treinada, o protocolo que pode ser visualizado na Figura 11 foi seguido. As análises pós-tratamentos seguiram o mesmo padrão do protocolo do tratamento com curdlana. Porém, para os experimentos com BGP, os animais receberam apenas uma injeção intraperitoneal.

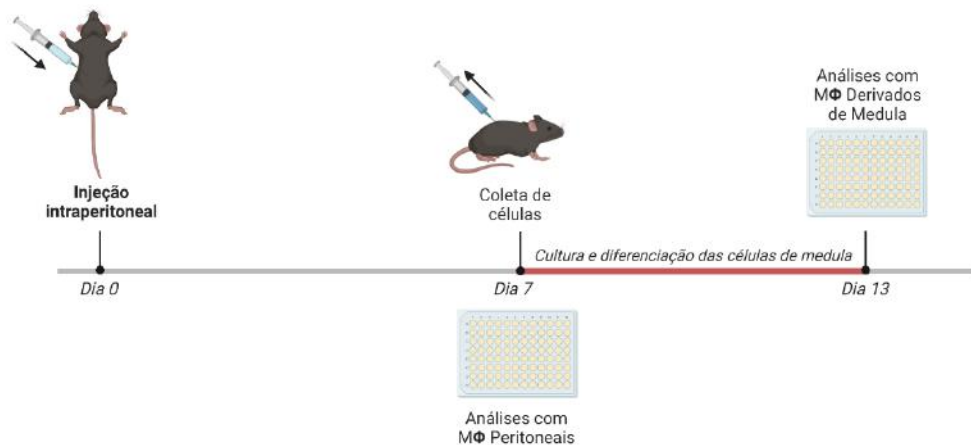


Figura 11. Protocolo de tratamento com BGP para treinamento de células inatas. Camundongos C57BL/6 receberam uma injeção intraperitoneal com 1 mg de BGP em 500 μ L de PBS. No dia 7, foi realizado o lavado intraperitoneal a fim de coletar os macrófagos para posterior análises. Paralelamente a isso, também foi coletada a medula óssea dos animais. As células provenientes da medula foram plaqueadas para diferenciação durante 6 dias e estimuladas para a análises da resposta inflamatória. Legenda: Macrófagos (MΦ). Criado em *BioRender.com*.

MPs de animais injetados com BPG demonstraram uma capacidade maior do que os MPs dos animais controles em produzirem TNF em resposta ao LPS e aos conídios nas diferentes MOI utilizadas (Fig. 12A). Diante das leveduras, as células produziram quantidades muito baixas de citocinas e não houve diferença entre os grupos. No que diz respeito aos MDMs, não foi observada nenhuma diferença na produção de TNF entre os dois grupos, incluindo o estímulo com LPS (Fig. 12B). Juntos, estes resultados indicam que a BPG induziu a imunidade treinada somente de maneira local, já que os MDMs não apresentaram diferenças na produção de citocinas como os MPs.

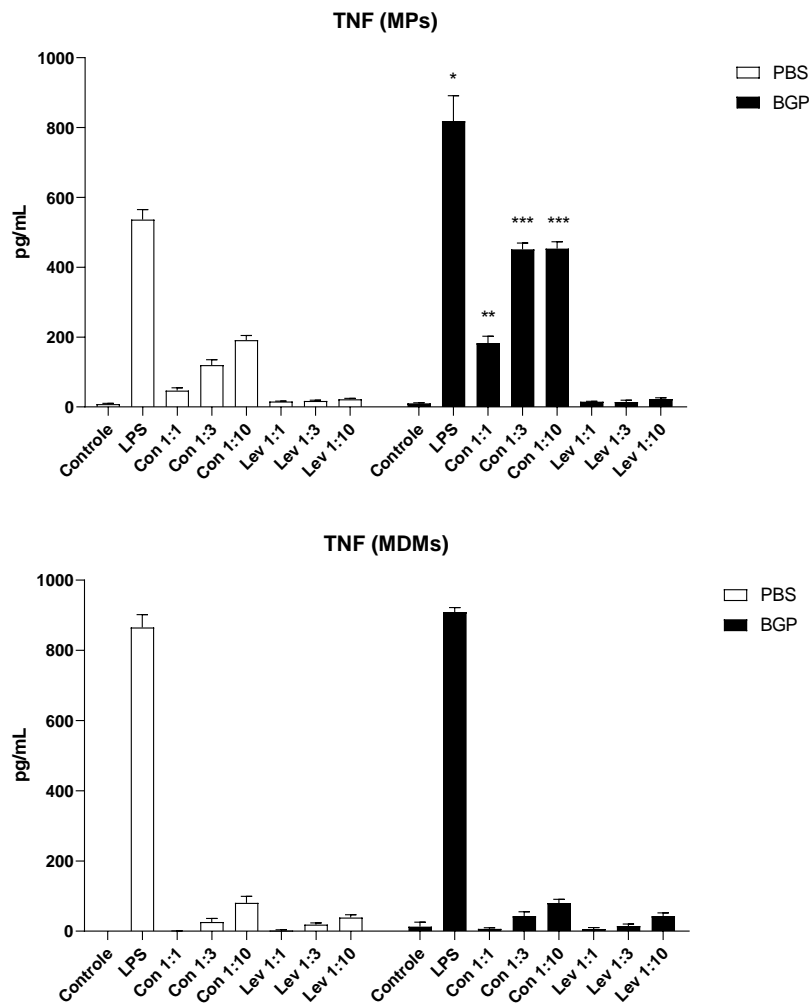


Figura 12. Produção de TNF por macrófagos peritoneais e de medula tratados ou não com BGP. Macrófagos peritoneais e derivados de medula foram plaqueados em placa de 96 poços para os estímulos com LPS (10ng/mL) e três MOIs de conídio ou levedura (1, 3 e 10) de *S. brasiliensis*. O sobrenadante foi coletado 6h após os estímulos para a dosagem de TNF através da técnica de ELISA. Legenda: lipopolissacarídeo (LPS); Macrófagos peritoneais (MPs); Macrófagos derivados de medula (MDMs); Conídio (Con); Levedura (Lev). A análise estatística foi feita com teste t de student não-pareado, $p < 0,05$.

5.2 Capacidade de macrófagos treinados em eliminar *S. brasiliensis*

Como a imunidade treinada aumenta a resistência de camundongos e de seres humanos contra doenças infecciosas e pode aumentar a eliminação fúngica pelos macrófagos (Quintin *et al.*, 2012; Arts *et al.*, 2018), procuramos analisar também a capacidade fungicida contra o *S. brasiliensis*. Para isso, macrófagos foram incubados com conídios como descrito no item 4.8. O gráfico mostrado a seguir (Figura 13A) é a junção de dois experimentos individuais que totalizam 3 animais por grupo. Os MPs de animais tratados com curdlana apresentaram um maior índice de eliminação em comparação aos animais controles (Fig. 13A). Não houve significância estatística entre as condições pois a diferença na capacidade fungicida dos macrófagos entre os dois experimentos foi muito grande, porém a tendência em ambos permaneceu a mesma. No primeiro experimento, macrófagos treinados eliminaram 95% dos conídios contra 57% pelas células controle. No segundo experimento, a média na eliminação dos fungos aumentou de 13% para 33% devido ao estímulo com curdlana. Quando os animais receberam BGP como método de treinamento, os MPs demonstraram uma maior capacidade de eliminação do fungo em comparação com o grupo controle (Fig. 13B). Com isso, os resultados demonstram que o treinamento com β -glucana pode aumentar a ação de mecanismos microbicidas de macrófagos, embora não saibamos qual mecanismo está envolvido no efeito observado.

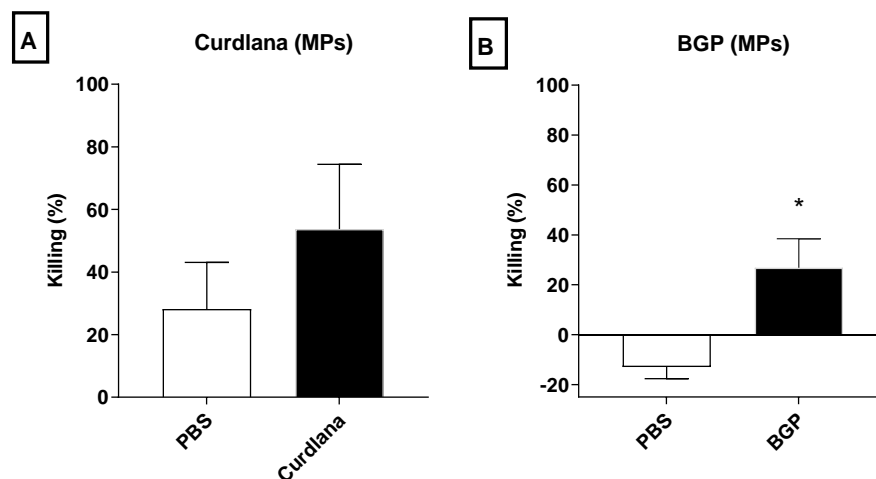


Figura 13. Capacidade de killing de macrófagos peritoneais de animais tratados com curdlana ou BGP ou não. Macrófagos peritoneais treinados ou não com as β -glucanas foram incubados por 6h com MOI 0,1 de conídios de *S. brasiliensis*. **A)** Killing por macrófagos treinados ou não com curdlana. O gráfico demonstra a junção de dois experimentos independentes (n=3). **B)** Killing por macrófagos treinados ou não com BGP. O gráfico demonstra o resultado de um experimento único (n=3). A análise estatística foi feita com teste t de student não-pareado, $p < 0,05$. Legenda: Macrófagos peritoneais (MPs) e β -glucan peptide (BGP). (*): $p < 0,05$.

5.3 Análise do desenvolvimento de lesões e disseminação da doença após administração de β -glucana

De acordo com a literatura, a indução da imunidade treinada torna os hospedeiros mais resistentes a doenças infecciosas (Wout *et al.*, 1992; Ciarlo *et al.*, 2012; Stothers *et al.*, 2021). Para averiguar esse efeito durante o desenvolvimento da esporotricose, animais receberam injeções das β -glucanas segundo o protocolo mostrado na Figura 14 e como descrito anteriormente nos itens 4.3 e 4.4. As análises das lesões foram avaliadas semanalmente por 35 dias (Figura 14).

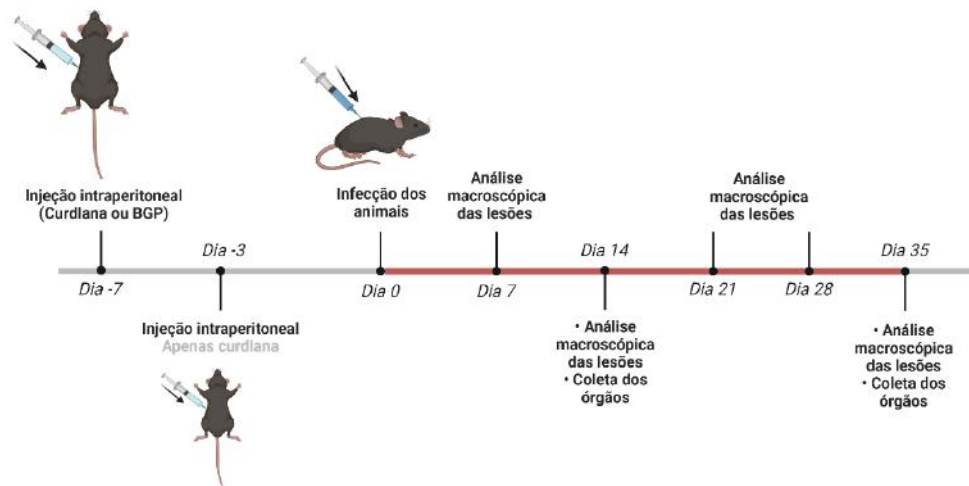


Figura 14. Protocolo de treinamento in vivo para análise do efeito das β -glucanas no desenvolvimento da esporotricose experimental. Animais receberam injeções de curdlana ou BGP, como indicado na figura. Após 7 dias, os animais foram infectados com 10^7 conídios de *S. brasiliensis* na região dorsal sacral. As análises da evolução das lesões foram feitas semanalmente até 35 dias pós infecção e as análises de disseminação foram feitas aos 14 e 35 dias pós infecção. A análise estatística foi feita com teste t de student não-pareado, $p < 0,05$.

No experimento utilizando curdlana, foi possível observar uma tendência de lesões menores nos animais tratados com curdlana após 7 e 14 dias de infecção. Porém, não há diferença significativa entre as condições em nenhum período da infecção (Fig. 15A). Este resultado não foi esclarecedor acerca do efeito da curdlana no desenvolvimento da esporotricose e o experimento precisa ser repetido. Quando utilizamos BGP como método de indução da imunidade treinada, foi possível observar que animais tratados com BGP apresentaram lesões significativamente menores até o 7º dpi (Fig. 15B). Aos 14, 21, 28 e 35 dpi o tamanho das lesões em ambos os grupos se assemelharam (Fig. 15B). Estes resultados indicam que a BGP retardou o desenvolvimento das lesões em pelo menos uma semana.

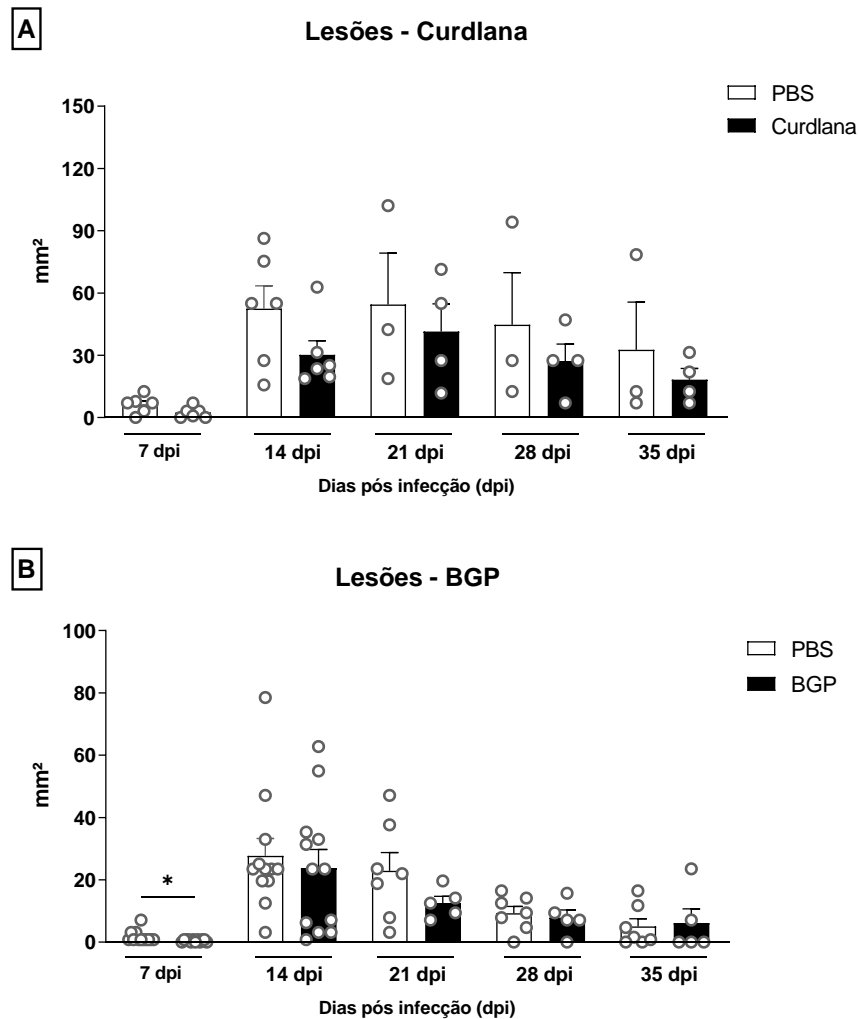


Figura 15. Análise do efeito da administração das β -glucanas no desenvolvimento de lesões. Animais receberam via intraperitoneal 1 mg de curdlana ou BGP e após 7 dias foram infectados com 10^7 conídios de *S. brasiliensis*. A avaliação das lesões foi feita semanalmente. **A)** Tamanho das lesões de animais que receberam curdlana (n=7) ou não (n=6). **B)** Tamanho das lesões de animais que receberam BGP (n=12) ou não (n=12). Em ambos os experimentos, animais precisaram ser eutanasiados para a determinação da quantidade de fungos em alguns órgãos. Devido a isso, o número de animais diminuiu a partir do dia 21. A análise estatística foi feita com teste t de student não-pareado, $p < 0,05$. (*): $p < 0,05$.

Para visualizar melhor o efeito das β -glucanas, organizamos gráficos de análises pareadas e construímos gráficos apenas com animais que tiveram suas lesões avaliadas durante 35 dias, já que parte dos animais foi eutanasiada após 14 dias de infecção para contagem de UFCs. Nas figuras 16A e 16B a tendência de atraso no surgimento das lesões fica mais evidente. Enquanto no experimento com curdlana 3 animais apresentaram lesões bem menores do que as dos animais controles, a maioria dos animais injetadas com BGP não apresentou lesões. Em seguida é possível observar uma mudança no tempo de crescimento das lesões, até o ponto em que se inicia a regressão.

Os animais dos grupos controles demonstraram que as lesões cresceram até o dia 14 (linhas azuis e vermelhas) (Fig. 16C-D). Por outro lado, a maioria dos animais injetados com as β -glucanas apresentaram um perfil diferente, pois as lesões cresceram até o dia 21 antes de regredirem (linhas pretas) (Fig. 16E-F). Nossa interpretação é de que o tratamento com β -glucanas atrasa o desenvolvimento das lesões, mas não impede a progressão que é similar aos dos grupos controles.

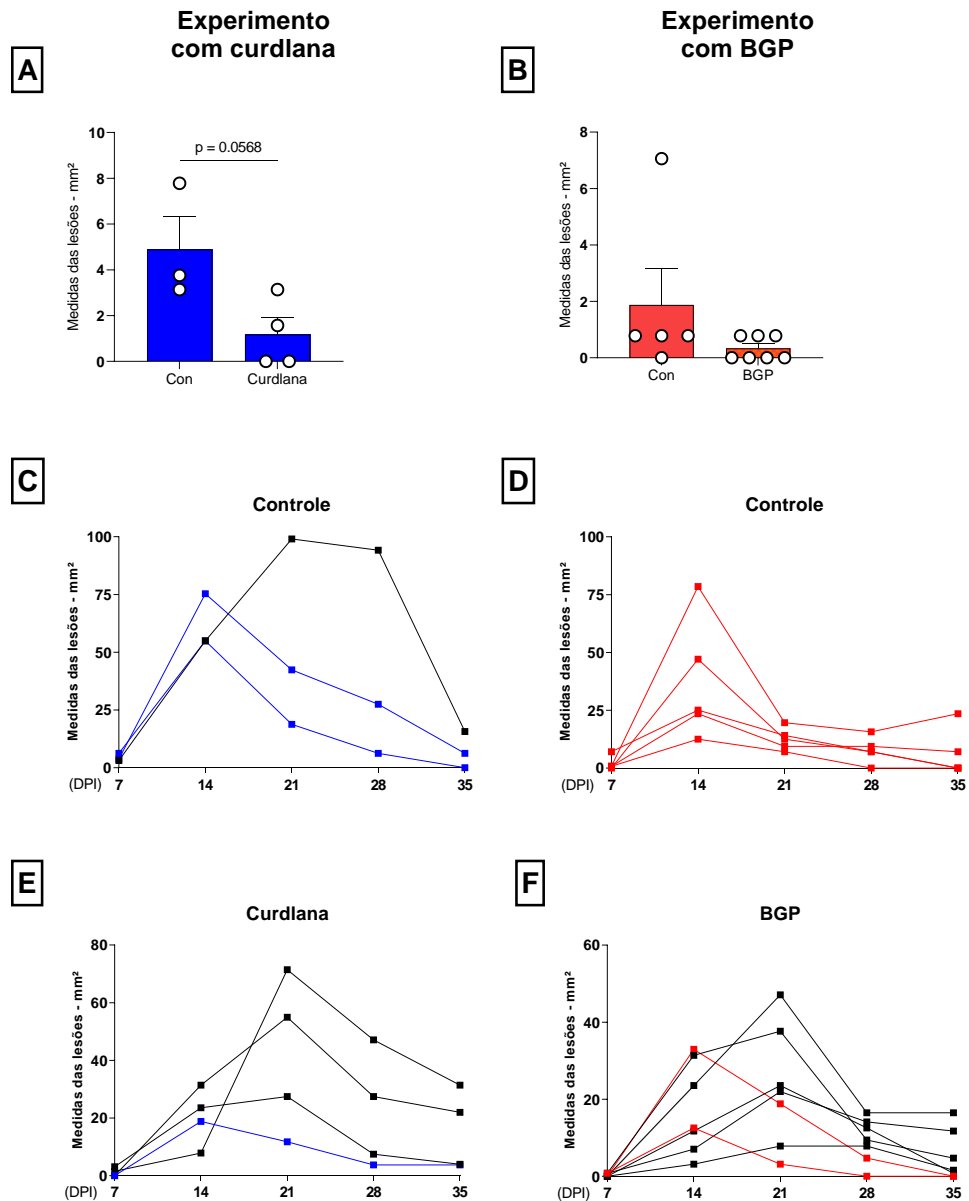


Figura 16. Análises pareadas de animais que receberam ou não as β -glucanas até o 35º dia pós infecção. Análise do tamanho das lesões de animais que seguiram até o final do experimento (35º dia). As cores indicam os experimentos feitos com as diferentes β -glucanas: azul para curdlana e vermelho para BGP. **A-B)** Tamanho das lesões dos animais aos 7 dias pós infecção. **C-F)** Análise pareada do tamanho das lesões dos animais que receberam ou não o tratamento, durante os 35 dias pós infecção. Em seus respectivos gráficos, as linhas coloridas significam lesões crescidas até o 14º dia e linhas pretas significam lesões que cresceram até o 21º dia. A análise estatística foi feita com teste t de student não-pareado, $p < 0,05$.

As análises da quantidade de fungos de animais treinados ou não foram feitas através da determinação de UFC no tecido total do animal aos 14 e 35 dpi. Animais que receberam curdlana como método de treinamento demonstraram ter uma menor carga fúngica no fígado e baço até o 14º dia após a infecção em comparação aos animais do grupo controle (Fig. 17A). Isso pode ser observado pela ausência na detecção de UFC na maioria dos animais analisados. Além disso, apesar da pequena quantidade de animais analisada, é possível observar uma tendência na redução da quantidade de fungos na pele (Fig. 17A). Porém este efeito não se manteve até o final do experimento, visto que ao 35º dia após a infecção a carga fúngica entre ambas as condições ficou similar. Este resultado parece reforçar os resultados das medidas das lesões, sugerindo que a curdlana retarda o desenvolvimento da doença, mas um novo experimento com mais animais deve ser feito para confirmar essa ideia.

Quando animais receberam BGP, observamos que animais treinados não foram capazes de controlar melhor a quantidade de fungos no sítio primário da infecção até o 14º dia (Fig. 17B). Além disso, a maioria dos animais de ambos os grupos não apresentaram disseminação da infecção nesse experimento, impedindo a análise desse parâmetro. Aos 35 dias após a infecção, os animais que receberam BGP apresentaram alta disseminação para o baço, ao contrário dos animais do grupo controle onde não detectamos UFCs (Fig. 17B). Por outro lado, a detecção e contagem de UFCs nos outros tecidos foi similar. Juntos, os resultados das lesões e contagem de UFCs não foram esclarecedores acerca do efeito da BGP, administrada pela via intraperitoneal.

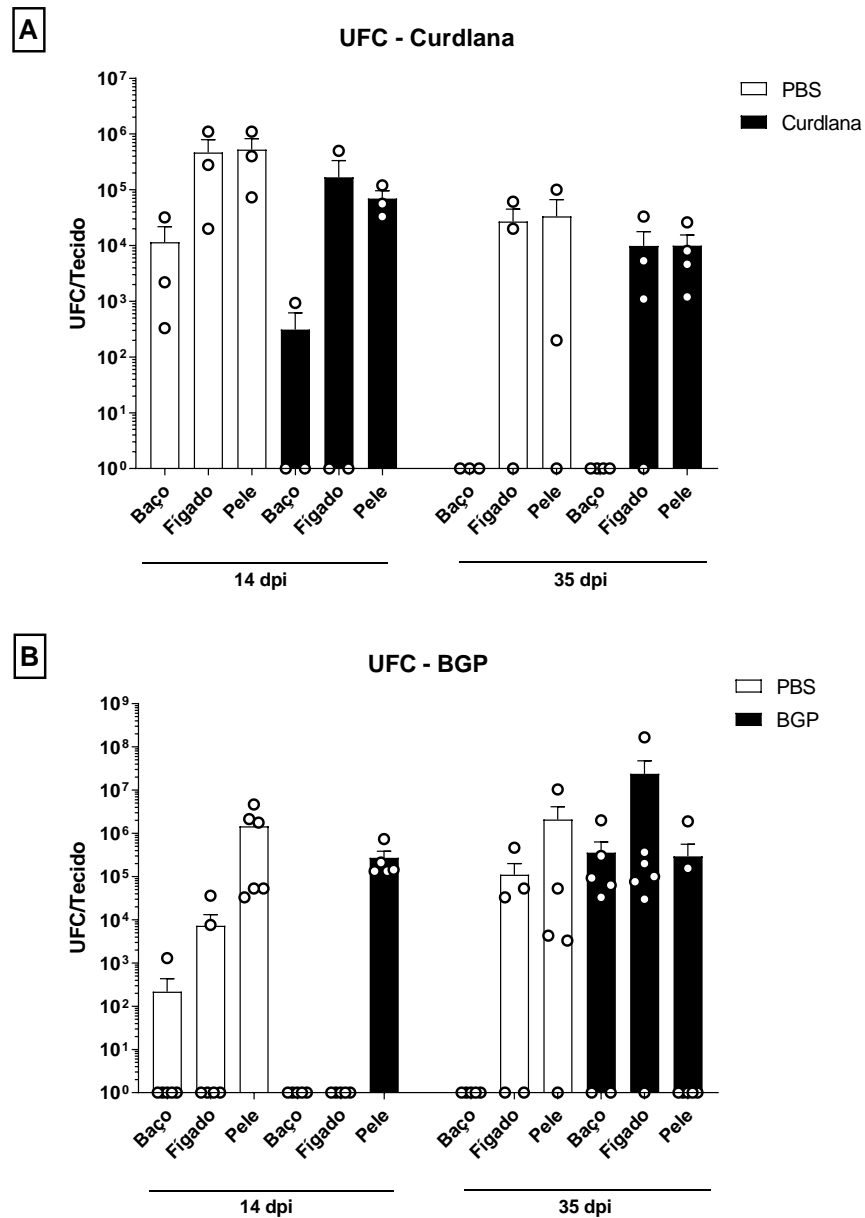


Figura 17. Determinação da quantidade de fungo nos órgãos de animais tratados com β -glucanas ou não. Após a coleta dos órgãos, foi realizada a diluição seriada das amostras e em seguida plaqueadas para a determinação da UFC/Tecido em ágar Sabouraud. **A)** Determinação da UFC na pele (sítio primário da inoculação), baço e fígado de animais tratados ou não com curdlana. **B)** Determinação da UFC na pele, baço e fígado de animais tratados ou não com BGP. A análise estatística foi feita com teste t de student não-pareado, $p < 0,05$.

Até então, conseguimos notar que ambas as β -glucanas demonstraram efeito localmente e não foram suficientes para desencadear uma resposta sistêmica de modo a causar efeito em macrófagos derivados da medula. Além disso, os protocolos de treinamento não foram capazes de impedir o desenvolvimento e a progressão das lesões, embora tenham retardado esse aspecto do modelo. Como a BGP é solúvel e apresentou um efeito local significativo em MPs, decidimos testar os efeitos da administração

subcutânea da molécula. Para isso, animais receberam uma injeção subcutânea, na mesma região onde é realizada a inoculação dos conídios de *S. brasiliensis* – uma semana antes de serem infectados. Animais tratados com BGP apresentaram lesões menores em comparação com os animais controle aos 14 e 21 dpi (Fig. 18). Juntos, os resultados descritos até aqui sugerem que a injeção local de BGP tem um efeito protetor maior contra o desenvolvimento das lesões cutâneas quando comparado à injeção peritoneal. Por outro lado, quando analisamos a disseminação da doença e quantidade de fungo no sítio primário de infecção, não notamos nenhuma diferença significativa entre os grupos aos 14 dpi (Fig. 19).

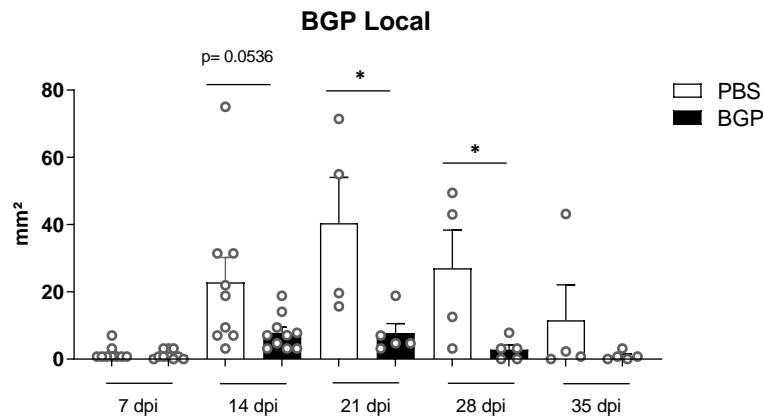


Figura 18. Análise do efeito da administração de BGP local no desenvolvimento de lesões. Animais receberam 1 mg de BGP em 200 μ L de PBS na região dorsal sacral. A infecção dos animais foi realizada com a injeção de 10^7 conídios em 200 μ L PBS 7 dias depois, no mesmo local do pré-tratamento. A análise estatística foi feita com teste t de student não-pareado, $p < 0,05$. (*): $p < 0,05$.

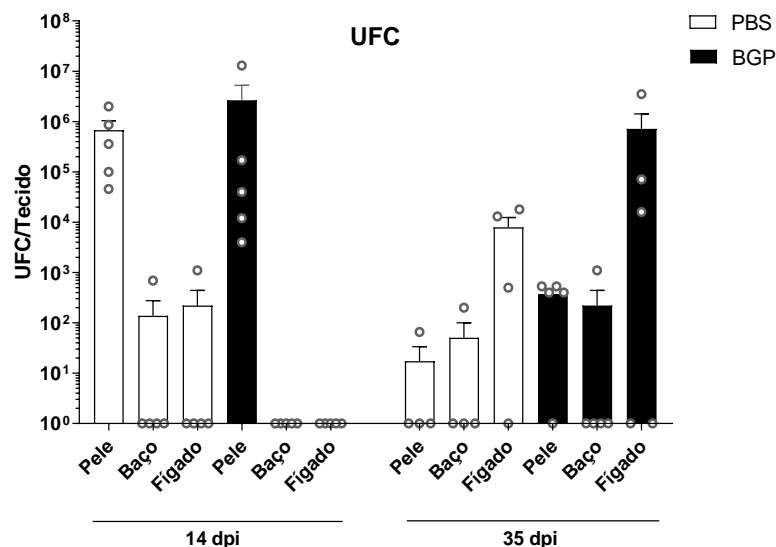


Figura 19. Determinação da quantidade de fungo nos órgãos de animais tratados com BGP subcutânea ou não. Após a coleta dos órgãos aos 14 e 35 dias pós infecção, foi realizada a diluição seriada das amostras e em seguida plaqueadas para a determinação da UFC/Tecido em ágar Sabouraud. A análise estatística foi feita com teste t de student não-pareado, $p < 0,05$. Legenda: Dias pós infecção (DPI); *Beta-glucan peptide* (BGP).

6 DISCUSSÃO

Os fungos são organismos ambientais e, originalmente, não evoluíram como patógenos, e sim como decompositores. Devido a isso, a grande maioria dos fungos não possuem mecanismos de virulência. Dentre as estimadas 5 milhões de espécies, pouquíssimas são consideradas patógenos primários capazes de causar doença em seres humanos imunocompetentes, estando *Sporothrix* spp. entre elas. A esporotricose tem se tornado um problema de saúde no Rio de Janeiro desde 1998, quando se iniciou a epidemia que posteriormente levou ao cenário hiperendêmico que vemos nos dias de hoje. Devido ao seu elevado tempo de tratamento, o controle da esporotricose animal é difícil. Além disso, vacinas contra doenças fúngicas não são tão atraentes para empresas farmacêuticas, já que essas doenças atingem majoritariamente uma parcela pequena da população – os pacientes que têm o sistema imune comprometido. Porém, os fungos do gênero *Sporothrix* – em especial a espécie *S. brasiliensis*, que, em geral, apresenta maior quantidade de cepas mais virulentas do que de outras espécies do gênero – são patógenos primários que atingem indivíduos imunocompetentes e somando-se a isso, o fato de ser uma zoonose relacionada à animais que apresentam contato direto com o ser humano no cotidiano pode atribuir à doença um apelo maior do que normalmente se vê em uma doença fúngica. Com casos de esporotricose se espalhando para outros municípios, a doença tende a atingir mais animais e seres humanos se não for controlada, tornando-se um problema emergencial de saúde. Diante disto, buscar uma nova terapia de controle e tratamento é necessário. Neste contexto, a imunidade treinada pode ter um efeito importante na contenção das doenças fúngicas, auxiliando no tratamento e na prevenção, tendo em vista que a imunidade celular tem papel principal na proteção do hospedeiro contra patógenos fúngicos (Erwig & Gow, 2016).

Em nossos experimentos *in vitro* pudemos observar claramente o efeito do treinamento em macrófagos de animais que receberam curdlana e BGP. Porém apenas os MPs demonstraram terem passado pelo treinamento, ao modo que MDMs não produziram maiores quantidades de citocinas frente aos estímulos, especialmente em resposta aos conídios. Segundo estudos, algumas populações de macrófagos como MDMs não são tão responsivos a fungos. Essa população não apresenta uma produção significativa de citocinas pró-inflamatórias em resposta à β -glucanas, por exemplo – uma das moléculas mais presentes na parede celular fúngica – estando associada a uma forma de mecanismo de controle da resposta inflamatória (Rosas *et al.*, 2015). Esses achados podem explicar a baixa produção de citocinas por MDMs em comparação com MPs, principalmente IL-6, em

resposta aos conídios de *S. brasiliensis*. Vale a pena ressaltar que em trabalhos publicados na literatura, a administração de β -glucana leva à reprogramação dos progenitores mieloides e, conseqüentemente, às características de células treinadas (Mitroulis *et al.*, 2018; Ding *et al.*, 2023), o que não observamos em nosso trabalho. Acerca disso, existem discussões sobre a funcionalidade de diferentes β -glucanas e de diferentes efeitos observados, estando essas alterações associadas ao tamanho e o peso molecular, a solubilidade, a ramificação e a origem da molécula (Quintin, 2019; Castro, Calder & Roche, 2021). Até o momento não temos uma explicação do porquê não termos conseguido reproduzir este efeito, tendo em vista que existem trabalhos na literatura que utilizam tanto BGP quanto outras β -glucanas particuladas, como WGP e zymosan (Mitroulis *et al.*, 2018; Ciarlo *et al.*, 2020; Ding *et al.*, 2023).

Ainda em nossos experimentos *in vitro*, também foi analisado a resposta de macrófagos às diferentes morfologias de *S. brasiliensis*: seus conídios e leveduras. É bastante conhecido na literatura que as diferenças na parede celular fúngica podem causar diferentes respostas pelas células do sistema imune. Essa diferença pode ocorrer entre diferentes espécies ou também em uma mesma espécie que transite em diferentes morfologias, como acontece em fungos dimórficos. Como *Sporothrix* é um fungo dimórfico, os conídios – que são produzidos por estruturas de reprodução em suas hifas – e as leveduras podem possuir diferenças na parede celular, impactando na produção de citocinas. Uma molécula importante para o reconhecimento fúngico pelos fagócitos é a β -1,3-glucana, que pode ser mascarada por outras moléculas, dificultando seu reconhecimento (Erwig e Gow, 2016). Em nossos experimentos utilizando conídios e leveduras de *S. brasiliensis* foi observado que os conídios induziram níveis mais altos de TNF pelos macrófagos peritoneais, enquanto as leveduras induziram muito pouco. De acordo com Martínez-Álvarez e colaboradores (2017), os conídios e leveduras de *S. brasiliensis* possuem diferenças na conformação de suas respectivas paredes celulares. Uma dessas diferenças é que os conídios parecem possuir a β -1,3-glucana exposta na superfície da parede celular, enquanto as leveduras parecem ter a β -1,3-glucana mascarada por outras moléculas. Além disso, as leveduras de *S. schenckii* demonstraram ter algumas moléculas como melanina, ácido siálico, ergosterol, entre outros, que dificultam seu reconhecimento (Ruiz-Baca *et al.*, 2021). Essas diferenças podem facilitar o reconhecimento dos conídios e dificultar no caso das leveduras, levando a desigualdades na produção de citocinas, como observamos em nossos resultados.

Os fagócitos possuem um papel importante na eliminação de *Sporothrix*. Dentre eles, o macrófago é a célula mais associada ao combate contra o patógeno (Ruiz-Baca *et al.*, 2021).

Devido a isso, analisamos o efeito do tratamento com β -glucanas na eliminação de conídios por macrófagos treinados ou não. Nossos resultados demonstraram que MPs pré-tratados com as β -glucanas apresentaram uma maior capacidade microbicida contra conídios de *S. brasiliensis*. Poucos trabalhos na literatura demonstram a capacidade de *killing* de macrófagos *in vitro* após passarem pelo treinamento (Quintin *et al.*, 2012). De acordo com a literatura, o treinamento com β -glucana não leva ao aumento da produção de ROS e NO em macrófagos, o que pode explicar a pequena diferença que vemos no *killing* (Bekkering *et al.*, 2016; Dos Santos *et al.*, 2019). Porém, o treinamento estimulado por β -glucana pode aumentar a expressão da citocina IL-32, que está associada com a indução da produção de peptídeos antimicrobianos (Dos Santos *et al.*, 2019). Outro fato é que tanto conídios quanto leveduras parecem precisar de componentes do soro para uma fagocitose mais eficaz (Ruiz-Baca *et al.*, 2021). Será interessante investigar o mecanismo pelo qual o efeito observado em nosso trabalho ocorre, bem como o papel da opsonização na fagocitose desse microrganismo em nossas condições. Também pretendemos investigar a atividade microbicida de macrófagos treinados contra a forma de levedura do fungo.

Como já abordado anteriormente, em nossos experimentos *in vitro*, observamos uma maior capacidade de produção das citocinas TNF e IL-6 nos macrófagos peritoneais e uma maior capacidade de *killing*. Embora tenhamos tido resultados positivos nos experimentos *in vitro*, não conseguimos observar um efeito tão claro do treinamento *in vivo* durante o desenvolvimento da esporotricose experimental murina. Aparentemente, animais que receberam o tratamento resistiram ao inóculo por mais tempo, tendo em vista que foi observado que demoraram mais que os animais controles para abrirem maiores lesões. O atraso das lesões corrobora com os resultados obtidos nos experimentos *in vitro* de *killing*, podendo ter o envolvimento de outros tipos celulares da imunidade inata que também podem passar pelo treinamento e que estão envolvidas na resposta contra a esporotricose, como neutrófilos e células NK (Kleinnijenhuis *et al.*, 2014; Kalafati *et al.*, 2023). Por não termos observado uma diferença significativa, devemos analisar estes dados levando em consideração dois fatos importantes: (1) o inóculo utilizado em nossos experimentos é alto (10^7 conídios), nos levando a pensar que talvez utilizando um inóculo menor, consigamos observar um efeito mais claro do treinamento já que em uma situação de infecção, dificilmente o hospedeiro receberá tamanha quantidade de fungo no momento de implantação e (2) a imunidade treinada age de maneira sistêmica e periférica, mas, em nossos resultados, não foi notado nenhum estímulo referente a células da medula óssea, indicando que o treinamento não foi suficiente para estimular os progenitores mielóides.

Levando isto em consideração, talvez a imunidade treinada tenha agido majoritariamente de maneira periférica, ajudando no controle dos fungos nos primeiros dias. Porém, sem novas células treinadas vindo da corrente sanguínea, o efeito pode não ter sido suficiente. Em relação ao efeito da curdlana e da BGP, precisamos de mais investigações, pois não observamos diferenças significativas na contagem de UFCs dos tecidos analisados. Além disso, *S. brasiliensis* é um patógeno que ainda não é muito bem caracterizado. Alguns trabalhos demonstram uma maior virulência em cepas de *S. brasiliensis* que ainda não é muito bem explicada (Mario *et al.*, 2017; Batista-Duharte *et al.*, 2018). A presença de algum mecanismo que iniba a ação de macrófagos – como alguns já mencionados anteriormente em *S. schenckii* – pode ser levado em consideração.

Diante da observação de que apenas os macrófagos peritoneais demonstraram maior capacidade de produção de citocinas frente aos estímulos *in vitro* após o treinamento através da injeção intraperitoneal de curdlana e BGP, procuramos analisar se a injeção subcutânea local da BGP teria algum efeito no desenvolvimento das lesões e na contenção da disseminação da doença. Neste, observamos lesões menores e estagnadas em animais que receberam o BGP local. Porém, não notamos diferença na quantidade de UFCs nos tecidos analisados e novos experimentos serão necessários para entendermos de que forma o tratamento local contribui para limitar o desenvolvimento das lesões.

Neutrófilos e Células NK também podem passar pelo fenômeno de treinamento, podendo ter um papel nos resultados do modelo *in vivo* realizado em nosso trabalho, já que também são células importantes para o combate contra *Sporothrix* (Ferreira *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2023). Os macrófagos são células amplamente estudadas na interação com *Sporothrix* spp., parecendo possuir um papel importante por fagocitar as leveduras e eliminá-las, além de estimular eficientemente o recrutamento de mais leucócitos para o sítio da infecção (Lin *et al.*, 2023). Os neutrófilos, além de também estarem associados com a eliminação de *Sporothrix*, parecem estar envolvidos com a gravidade das lesões (Zhang *et al.*, 2011). Além disso, estudos demonstram que as leveduras de *S. schenckii* são resistentes ao mecanismo de *killing* intracelular de neutrófilos (Schaffner *et al.*, 1986). Diante disso, será interessante analisar se a imunidade treinada teria um efeito capaz de reverter estes achados em neutrófilos. Porém, primeiramente, analisamos o papel do treinamento em macrófagos. Futuramente pretendemos realizar experimentos de depleção de macrófagos para analisar o papel específico dos macrófagos nos resultados observados *in vivo*, a fim de avaliar se os efeitos são dependentes desse tipo celular. Para isso, utilizaremos clodronato para depletar os macrófagos dos animais e injetar macrófagos treinados *in vitro*.

O tratamento da esporotricose é realizado através da administração de antifúngicos, sendo o de primeira escolha o itraconazol. Caso o paciente não possa realizar o tratamento com este, as escolhas alternativas são principalmente fluconazol ou anfotericina B. Também pode ser administrado iodeto de potássio em paralelo ao tratamento com o antifúngico (Lopez-Bezerra *et al.*, 2006). O tempo de tratamento pode variar conforme a gravidade da doença, podendo chegar a mais de 25 semanas e este, por ser bastante demorado, pode levar a desistências e abandonos – como já abordado anteriormente (Poester *et al.*, 2022). Devido a isso, seria interessante estudar a imunidade treinada como um tratamento adjuvante. O itraconazol, especialmente, possui diversas interações com outros medicamentos, o que pode ser um problema para pessoas que fazem uso de outros medicamentos. Além disso, antifúngicos apresentam alta toxicidade para o hospedeiro (Orofino-Costa *et al.*, 2017). Por isso, o uso da imunidade treinada como tratamento adjuvante pode ser interessante tanto para diminuir a dose diária de antifúngico quanto para acelerar o tratamento, dependendo do indivíduo e do grau da doença.

Em suma, a imunidade treinada pode surtir efeitos benéficos na resistência do hospedeiro contra a esporotricose. No entanto, vale ressaltar que este é um campo da imunologia que ainda está sendo esclarecido. A resposta desencadeada pela imunidade treinada pode variar de acordo com o patógeno que está sendo estudado e com o estímulo que é utilizado para induzi-la. Portanto, mais estudos acerca da imunidade treinada e seu papel no desenvolvimento da esporotricose são necessários para um melhor entendimento acerca das possibilidades de tratamento adjuvante e prevenção da doença.

7 CONCLUSÕES

- MPs apresentaram características de células treinadas, como observado a partir do aumento da produção de citocinas em resposta aos conídios de *S. brasiliensis*;
- O nosso protocolo de indução de imunidade treinada não foi suficiente para modular os progenitores mielóides, já que os MDM não apresentaram uma maior produção de citocinas em resposta ao LPS ou ao *S. brasiliensis*;
- A injeção das β -glucanas aumentou a atividade fungicida dos MPs;
- O pré-tratamento com as β -glucanas pela via intraperitoneal indicou uma tendência a um atraso no desenvolvimento das lesões, mas não observamos diferença estatística significativa na maioria das análises do tamanho das lesões;
- A administração local de BGP limitou o desenvolvimento das lesões e antecipou a resolução das feridas de forma significativa, embora não tenhamos observado redução na quantidade de fungos nos tecidos analisados;
- Nossos dados sugerem que a imunidade treinada pode ser estudada como terapia adjuvante contra a esporotricose, mas novos experimentos são necessários para o melhor entendimento do efeito das β -glucanas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S. (2015). *Imunologia Celular e Molecular*. 8ª ed. Rio de Janeiro, Elsevier, pp. 41.
- Aguinaga, Felipe de Carvalho, Beatriz Moritz Trope, Nurimar Conceição Fernandes, Delia Celsler Engel, e Marcia Ramos-e-Silva. 2014. "Sporotrichosis with Bone Involvement: An Alert to an Occupational Disease". *Case Reports in Dermatology* 6 (1): 114–18. <https://doi.org/10.1159/000362184>.
- Almeida-Paes, Rodrigo, Luã Cardoso de Oliveira, Manoel Marques Evangelista Oliveira, Maria Clara Gutierrez-Galhardo, Joshua Daniel Nosanchuk, e Rosely Maria Zancopé-Oliveira. 2015. "Phenotypic Characteristics Associated with Virulence of Clinical Isolates from the *Sporothrix* Complex". *BioMed Research International* 2015: 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/212308>.
- Arrillaga-Moncrieff, I., J. Capilla, E. Mayayo, R. Marimon, M. Marine, J. Genis, J. Cano, e J. Guarro. 2009. "Different Virulence Levels of the Species of *Sporothrix* in a Murine Model". *Clinical Microbiology and Infection* 15 (7): 651–55. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02824.x>.
- Arts, Rob J.W., Simone J.C.F.M. Moorlag, Boris Novakovic, Yang Li, Shuang-Yin Wang, Marije Oosting, Vinod Kumar, et al. 2018. "BCG Vaccination Protects against Experimental Viral Infection in Humans through the Induction of Cytokines Associated with Trained Immunity". *Cell Host & Microbe* 23 (1): 89–100.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.12.010>.
- Barros, Mônica Bastos de Lima, Rodrigo de Almeida Paes, e Armando Oliveira Schubach. 2011. "Sporothrix Schenckii and Sporotrichosis". *Clinical Microbiology Reviews* 24 (4): 633–54. <https://doi.org/10.1128/CMR.00007-11>.
- Batista-Duharte, Alexander, Damiana Téllez-Martínez, Cleverton Roberto de Andrade, Deivys Leandro Portuondo, Juliana Aparecida Jellmayer, Marisa Campos Polesi, e Iracilda Zeppone Carlos. 2018. "Sporothrix Brasiliensis Induces a More Severe Disease Associated with Sustained Th17 and Regulatory T Cells Responses than Sporothrix Schenckii Sensu Stricto in Mice". *Fungal Biology* 122 (12): 1163–70. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.08.004>.
- Bekkering, Siroon, Bastiaan A. Blok, Leo A. B. Joosten, Niels P. Riksen, Reinout van Crevel, e Mihai G. Netea. 2016. "In Vitro Experimental Model of Trained Innate Immunity in Human Primary Monocytes". Editado por H. F. Rosenberg. *Clinical and Vaccine Immunology* 23 (12): 926–33. <https://doi.org/10.1128/CVI.00349-16>.
- Bistoni, F, A Vecchiarelli, E Cenci, P Puccetti, P Marconi, e A Cassone. 1986. "Evidence for Macrophage-Mediated Protection against Lethal Candida Albicans Infection". *Infection and Immunity* 51 (2): 668–74. <https://doi.org/10.1128/iai.51.2.668-674.1986>.
- Borba-Santos, L. P., A. M. Rodrigues, T. B. Gagini, G. F. Fernandes, R. Castro, Z. P. de Camargo, M. Nucci, L. M. Lopes-Bezerra, K. Ishida, e S. Rozental. 2015. "Susceptibility of Sporothrix Brasiliensis Isolates to Amphotericin B, Azoles, and Terbinafine". *Medical Mycology* 53 (2): 178–88. <https://doi.org/10.1093/mmy/myu056>.
- Chakrabarti, A., A. Bonifaz, M. C. Gutierrez-Galhardo, T. Mochizuki, e S. Li. 2015. "Global Epidemiology of Sporotrichosis". *Medical Mycology* 53 (1): 3–14. <https://doi.org/10.1093/mmy/myu062>.
- Ciarlo, Eleonora, Tytti Heinonen, Charlotte Théroude, Fatemeh Asgari, Didier Le Roy, Mihai G Netea, e Thierry Roger. 2020. "Trained Immunity Confers Broad-Spectrum Protection Against Bacterial Infections". *The Journal of Infectious Diseases* 222 (11): 1869–81. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz692>.
- Córdoba, Susana, Guillermina Isla, Wanda Szusz, Walter Vivot, Alejandra Hevia, Graciela Davel, e Cristina E. Canteros. 2018. "Molecular Identification and Susceptibility Profile of Sporothrix Schenckii Sensu Lato Isolated in Argentina". *Mycoses* 61 (7): 441–48. <https://doi.org/10.1111/myc.12760>.
- Conceição-Silva, Fatima, e Fernanda Morgado. 2018. "Immunopathogenesis of Human Sporotrichosis: What We Already Know". *Journal of Fungi* 4 (3): 89. <https://doi.org/10.3390/jof4030089>.

De Marco Castro, Elena, Philip C. Calder, e Helen M. Roche. 2021. “B-1,3/1,6-Glucans and Immunity: State of the Art and Future Directions”. *Molecular Nutrition & Food Research* 65 (1): 1901071. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201901071>.

Di Luzio, N R, e D L Williams. 1978. “Protective Effect of Glucan against Systemic Staphylococcus Aureus Septicemia in Normal and Leukemic Mice”. *Infection and Immunity* 20 (3): 804–10. <https://doi.org/10.1128/iai.20.3.804-810.1978>.

Ding, Chuanlin, Rejeena Shrestha, Xiaojuan Zhu, Anne E. Geller, Shouzhen Wu, Matthew R. Woeste, Wenqian Li, et al. 2023. “Inducing Trained Immunity in Pro-Metastatic Macrophages to Control Tumor Metastasis”. *Nature Immunology* 24 (2): 239–54. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01388-8>.

Santos, Jéssica Cristina dos, Ana Marina Barroso de Figueiredo, Muriel Vilela Teodoro Silva, Branko Cirovic, L. Charlotte J. de Bree, Michelle S.M.A. Damen, Simone J.C.F.M. Moorlag, et al. 2019. “β-Glucan-Induced Trained Immunity Protects against Leishmania Braziliensis Infection: A Crucial Role for IL-32”. *Cell Reports* 28 (10): 2659–2672.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.004>.

Durrant, W.E., e X. Dong. 2004. “SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE”. *Annual Review of Phytopathology* 42 (1): 185–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421>.

Erwig, Lars P., e Neil A. R. Gow. 2016. “Interactions of Fungal Pathogens with Phagocytes”. *Nature Reviews Microbiology* 14 (3): 163–76. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.21>.

Ferreira, Lucas Souza, Deivys Leandro Portuondo, Marisa Campos Polesi, e Iracilda Zeppone Carlos. 2018. “Natural Killer Cells Are Pivotal for *in Vivo* Protection Following Systemic Infection by *Sporothrix Schenckii*”. *Immunology* 155 (4): 467–76. <https://doi.org/10.1111/imm.12986>.

Fernandes, Geisa Ferreira, Priscila Oliveira dos Santos, Anderson Messias Rodrigues, Alexandre Augusto Sasaki, Eva Burger, e Zoilo Pires de Camargo. 2013. “Characterization of Virulence Profile, Protein Secretion and Immunogenicity of Different *Sporothrix Schenckii Sensu Stricto* Isolates Compared with *S. Globosa* and *S. Brasiliensis* Species”. *Virulence* 4 (3): 241–49. <https://doi.org/10.4161/viru.23112>.

García Duarte, Jesús Manuel, Víctor Raúl Wattiez Acosta, Patricia María Laura Fornerón Viera, Arnaldo Aldama Caballero, Graciela Asunción Gorostiaga Matiauda, Victoria Beatriz Rivelli de Oddone, e José Guillermo Pereira Brunelli. 2017. “Sporotrichosis transmitted by domestic cat. A family case report”. *DEL NACIONAL* 9 (2): 67–76. <https://doi.org/10.18004/rdn2017.0009.02.067-076>.

Garly, May-Lill, Cesário Lourenco Martins, Carlitos Balé, Mamadu Aliu Baldé, Kathryn Louise Hedegaard, Per Gustafson, Ida M Lisse, Hilton C Whittle, e Peter Aaby. 2003. “BCG Scar and Positive Tuberculin Reaction Associated with Reduced Child Mortality in West Africa”. *Vaccine* 21 (21–22): 2782–90. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00181-6](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00181-6).

Gaze, S. T., W. O. Dutra, M. Lessa, H. Lessa, L. H. Guimaraes, A. R. de Jesus, L. P. Carvalho, P. Machado, E. M. Carvalho, e K. J. Gollob. 2006. “Mucosal Leishmaniasis Patients Display an Activated Inflammatory T-Cell Phenotype Associated with a Nonbalanced Monocyte Population”. *Scandinavian Journal of Immunology* 63 (1): 70–78. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2005.01707.x>.

Gremião, Isabella Dib Ferreira, Luisa Helena Monteiro Miranda, Erica Guerino Reis, Anderson Messias Rodrigues, e Sandro Antonio Pereira. 2017. “Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission”. *PLOS Pathogens* 13 (1): e1006077. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006077>.

Gremião, Isabella Dib Ferreira, Manoel Marques Evangelista Oliveira, Luisa Helena Monteiro de Miranda, Dayvison Francis Saraiva Freitas, e Sandro Antonio Pereira. 2020. “Geographic Expansion of Sporotrichosis, Brazil”. *Emerging Infectious Diseases* 26 (3): 621–24. <https://doi.org/10.3201/eid2603.190803>.

Guarro, Josep, Josepa Gené, e Alberto M. Stchigel. 1999. “Developments in Fungal Taxonomy”. *Clinical Microbiology Reviews* 12 (3): 454–500. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.3.454>.

- Hektoen, Ludvig, e C. F. Perkins. 1900. "REFRACTORY SUBCUTANEOUS ABSCESSSES CAUSED BY SPOROTHRIX SCHENCKII. A NEW PATHOGENIC FUNGUS". *Journal of Experimental Medicine* 5 (1): 77–89. <https://doi.org/10.1084/jem.5.1.77>.
- Kajiwara, Hideko, Mitsumasa Saito, Shouichi Ohga, Takeshi Uenotsuchi, e Shin-ichi Yoshida. 2004. "Impaired Host Defense against *Sporothrix Schenckii* in Mice with Chronic Granulomatous Disease". *Infection and Immunity* 72 (9): 5073–79. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.9.5073-5079.2004>.
- Kischkel, Brenda, Leila Lopes-Bezerra, Carlos P. Taborda, Leo A.B. Joosten, Jéssica C. dos Santos, e Mihai G. Netea. 2022. "Differential Recognition and Cytokine Induction by the Peptidorhamnomannan from *Sporothrix Brasiliensis* and *S. Schenckii*". *Cellular Immunology* 378 (agosto): 104555. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2022.104555>.
- Kleinnijenhuis, Johanneke, Jessica Quintin, Frank Preijers, Leo A. B. Joosten, Daniela C. Ifrim, Sadia Saeed, Cor Jacobs, et al. 2012. "Bacille Calmette-Guérin Induces NOD2-Dependent Nonspecific Protection from Reinfection via Epigenetic Reprogramming of Monocytes". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (43): 17537–42. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202870109>.
- Krahenbuhl, J L, S D Sharma, R W Ferraresi, e J S Remington. 1981. "Effects of Muramyl Dipeptide Treatment on Resistance to Infection with *Toxoplasma Gondii* in Mice". *Infection and Immunity* 31 (2): 716–22. <https://doi.org/10.1128/iai.31.2.716-722.1981>.
- Kurtz, Joachim. 2005. "Specific Memory within Innate Immune Systems". *Trends in Immunology* 26 (4): 186–92. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.02.001>.
- Lin, Peng, Jianfeng Zhang, Guinan Xie, Junchen Li, Chenqi Guo, Haiyue Lin, e Yu Zhang. 2023. "Innate Immune Responses to *Sporothrix Schenckii*: Recognition and Elimination". *Mycopathologia* 188 (1–2): 71–86. <https://doi.org/10.1007/s11046-022-00683-0>.
- Lopes-Bezerra, Leila M., Armando Schubach, e Rosane O. Costa. 2006. "*Sporothrix schenckii* and sporotrichosis". *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 78 (2): 293–308. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652006000200009>.
- Lutz, Adolpho, and Alfonso Splendore. "Sobre uma micose observada em homens e ratos: contribuição para o conhecimento das assim chamadas esporotricoses." *Revista Médica de São Paulo* 21 (1907): 443-450.
- Macêdo-Sales, Pâmella A., Simone R. L. S. Souto, Carolina A. Destefani, Ricardo P. Lucena, Ricardo Luiz D. Machado, Marcia R. Pinto, Anderson M. Rodrigues, Leila M. Lopes-Bezerra, Elisabeth M. S. Rocha, e Andréa Regina S. Baptista. 2018. "Domestic Feline Contribution in the Transmission of *Sporothrix* in Rio de Janeiro State, Brazil: A Comparison between Infected and Non-Infected Populations". *BMC Veterinary Research* 14 (1): 19. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1340-4>.
- Maia, Danielle Cardoso Geraldo, Micheli Fernanda Sassá, Marisa Campos Polesi Placeres, e Iracilda Zeppone Carlos. 2006. "Influence of Th1/Th2 Cytokines and Nitric Oxide in Murine Systemic Infection Induced by *Sporothrix Schenckii*". *Mycopathologia* 161 (1): 11–19. <https://doi.org/10.1007/s11046-005-0142-y>.
- Marakalala, Mohlopheni J., David L. Williams, Jennifer C. Hoving, Rolf Engstad, Mihai G. Netea, e Gordon D. Brown. 2013. "Dectin-1 Plays a Redundant Role in the Immunomodulatory Activities of β -Glucan-Rich Ligands in Vivo". *Microbes and Infection* 15 (6–7): 511–15. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2013.03.002>.
- Marimon, Rita, Josep Cano, Josepa Gené, Deanna A. Sutton, Masako Kawasaki, e Josep Guarro. 2007. "*Sporothrix Brasiliensis*, *S. Globosa*, and *S. Mexicana*, Three New *Sporothrix* Species of Clinical Interest". *Journal of Clinical Microbiology* 45 (10): 3198–3206. <https://doi.org/10.1128/JCM.00808-07>.
- Marimon, Rita, Carolina Serena, Josepa Gené, Josep Cano, e Josep Guarro. 2008. "In Vitro Antifungal Susceptibilities of Five Species of *Sporothrix*". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (2): 732–34. <https://doi.org/10.1128/AAC.01012-07>.

- Mario, Débora Nunes, Larissa Finger Schaffer, Luis Ricardo Peroza, Francielli Pantella Kunz de Jesus, Laura Bedin Denardi, Roselei Fachinetto, e Sydney Hartz Alves. 2017. "Sporothrix Brasiliensis Produces the Highest Levels of Oxidative Stress in a Murine Model among the Species of the Sporothrix Schenckii Complex". *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 50 (4): 554–57. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0171-2016>.
- Martínez-Álvarez, José A., Luis A. Pérez-García, Erika Mellado-Mojica, Mercedes G. López, Iván Martínez-Duncker, Leila M. López-Bezerra, e Héctor M. Mora-Montes. 2017. "Sporothrix Schenckii Sensu Stricto and Sporothrix Brasiliensis Are Differentially Recognized by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells". *Frontiers in Microbiology* 8 (maio): 843. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00843>.
- Mehta, Atul, Marie M. Budev, Justin Ranes, e Rabin Shrestha. 2004. "Primary Pulmonary Sporotrichosis: A Case Report". *Chest* 126 (4): 945S. <https://doi.org/10.1378/chest.126.2.518>.
- Meyer, Elsie M. de, Z. Wilhelm de Beer, Richard C. Summerbell, A.M. Moharram, G. Sybren de Hoog, Hester F. Visser, e Michael J. Wingfield. 2008. "Taxonomy and Phylogeny of New Wood- and Soil-Inhabiting *Sporothrix* Species in the *Ophiostoma Stenoceras-Sporothrix Schenckii* Complex". *Mycologia* 100 (4): 647–61. <https://doi.org/10.3852/07-157R>.
- Mitroulis, Ioannis, Klara Ruppova, Baomei Wang, Lan-Sun Chen, Michal Grzybek, Tatyana Grinenko, Anne Eugster, et al. 2018. "Modulation of Myelopoiesis Progenitors Is an Integral Component of Trained Immunity". *Cell* 172 (1–2): 147-161.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.034>.
- Montenegro, Hildebrando, Anderson Messias Rodrigues, Maria Adelaide Galvão Dias, Elisabete Aparecida da Silva, Fernanda Bernardi, e Zoilo Pires de Camargo. 2014. "Feline Sporotrichosis Due to Sporothrix Brasiliensis: An Emerging Animal Infection in São Paulo, Brazil". *BMC Veterinary Research* 10 (1): 269. <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0269-5>.
- Moreira, José A. S., Dayvison F. S. Freitas, e Cristiane C. Lamas. 2015. "The Impact of Sporotrichosis in HIV-Infected Patients: A Systematic Review". *Infection* 43 (3): 267–76. <https://doi.org/10.1007/s15010-015-0746-1>.
- Moret, Yannick, e Michael T. Siva-Jothy. 2003. "Adaptive Innate Immunity? Responsive-Mode Prophylaxis in the Mealworm Beetle, *Tenebrio Molitor*". *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 270 (1532): 2475–80. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2511>.
- Morgado, Fernanda N., Armando O. Schubach, Mônica B. L. Barros, e Fátima Conceição-Silva. 2011. "The *in Situ* Inflammatory Profile of Lymphocutaneous and Fixed Forms of Human Sporotrichosis". *Medical Mycology*, janeiro, 1–9. <https://doi.org/10.3109/13693786.2011.552532>.
- Mulder, Willem J. M., Jordi Ochando, Leo A. B. Joosten, Zahi A. Fayad, e Mihai G. Netea. 2019. "Therapeutic Targeting of Trained Immunity". *Nature Reviews Drug Discovery* 18 (7): 553–66. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0025-4>.
- Muñoz, Natalia, Laurye Van Maele, Juan M. Marqués, Analía Rial, Jean-Claude Sirard, e José A. Chabalgoity. 2010. "Mucosal Administration of Flagellin Protects Mice from *Streptococcus Pneumoniae* Lung Infection". *Infection and Immunity* 78 (10): 4226–33. <https://doi.org/10.1128/IAI.00224-10>.
- Netea, Mihai G., Leo A. B. Joosten, Eicke Latz, Kingston H. G. Mills, Gioacchino Natoli, Hendrik G. Stunnenberg, Luke A. J. O'Neill, e Ramnik J. Xavier. 2016. "Trained Immunity: A Program of Innate Immune Memory in Health and Disease". *Science* 352 (6284): aaf1098. <https://doi.org/10.1126/science.aaf1098>.
- Netea, Mihai G., Jessica Quintin, e Jos W.M. van der Meer. 2011. "Trained Immunity: A Memory for Innate Host Defense". *Cell Host & Microbe* 9 (5): 355–61. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.04.006>.
- Orofino-Costa, Rosane, Priscila Marques de Macedo, Anderson Messias Rodrigues, e Andréa Reis Bernardes-Engemann. 2017. "Sporotrichosis: An Update on Epidemiology, Etiopathogenesis, Laboratory

and Clinical Therapeutics”. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 92 (5): 606–20. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.2017279>.

Pham, Linh N, Marc S Dionne, Mimi Shirasu-Hiza, e David S Schneider. 2007. “A Specific Primed Immune Response in *Drosophila* Is Dependent on Phagocytes”. Editado por Kenneth Vernick. *PLoS Pathogens* 3 (3): e26. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030026>.

Poester, Vanice Rodrigues, Rossana Patricia Basso, David A. Stevens, Lívia Silveira Munhoz, Vanessa Brito De Souza Rabello, Rodrigo Almeida-Paes, Rosely Maria Zancopé-Oliveira, Mariza Zanchi, Jéssica Louise Benelli, e Melissa Orzechowski Xavier. 2022. “Treatment of Human Sporotrichosis Caused by *Sporothrix Brasiliensis*”. *Journal of Fungi* 8 (1): 70. <https://doi.org/10.3390/jof8010070>.

Quintin, Jessica, Sadia Saeed, Joost H.A. Martens, Evangelos J. Giamarellos-Bourboulis, Daniela C. Ifrim, Colin Logie, Liesbeth Jacobs, et al. 2012. “*Candida Albicans* Infection Affords Protection against Reinfection via Functional Reprogramming of Monocytes”. *Cell Host & Microbe* 12 (2): 223–32. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.06.006>.

Ribes, Sandra, Tanja Meister, Martina Ott, Sandra Redlich, Hana Janova, Uwe-Karsten Hanisch, Stefan Nessler, e Roland Nau. 2014. “Intraperitoneal Prophylaxis with CpG Oligodeoxynucleotides Protects Neutropenic Mice against Intracerebral *Escherichia Coli* K1 Infection”. *Journal of Neuroinflammation* 11 (1): 14. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-14>.

Rodrigues, Janneth, Fábio André Brayner, Luiz Carlos Alves, Rajnikant Dixit, e Carolina Barillas-Mury. 2010. “Hemocyte Differentiation Mediates Innate Immune Memory in *Anopheles Gambiae* Mosquitoes”. *Science* 329 (5997): 1353–55. <https://doi.org/10.1126/science.1190689>.

Rosas, Marcela, Kate Liddiard, Matti Kimberg, Inês Faro-Trindade, Jacqueline U. McDonald, David L. Williams, Gordon D. Brown, e Philip R. Taylor. 2008. “The Induction of Inflammation by Dectin-1 In Vivo Is Dependent on Myeloid Cell Programming and the Progression of Phagocytosis”. *The Journal of Immunology* 181 (5): 3549–57. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.5.3549>.

Ruiz-Baca, Estela, Armando Pérez-Torres, Yolanda Romo-Lozano, Daniel Cervantes-García, Carlos A. Alba-Fierro, Javier Ventura-Juárez, e Conchita Torriello. 2021. “The Role of Macrophages in the Host’s Defense against *Sporothrix Schenckii*”. *Pathogens* 10 (7): 905. <https://doi.org/10.3390/pathogens10070905>.

Saeed, Sadia, Jessica Quintin, Hindrik H. D. Kerstens, Nagesha A. Rao, Ali Aghajani-refah, Filomena Matarese, Shih-Chin Cheng, et al. 2014. “Epigenetic Programming of Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Trained Innate Immunity”. *Science* 345 (6204): 1251086. <https://doi.org/10.1126/science.1251086>.

Sanchotene, Karine Ortiz, Isabel Martins Madrid, Gabriel Baracy Klafke, Mariana Bergamashi, Paula Portella Della Terra, Anderson Messias Rodrigues, Zoilo Pires de Camargo, e Melissa Orzechowski Xavier. 2015. “*Sporothrix Brasiliensis* Outbreaks and the Rapid Emergence of Feline Sporotrichosis”. *Mycoses* 58 (11): 652–58. <https://doi.org/10.1111/myc.12414>.

Schaffner, A, C E Davis, T Schaffner, M Markert, H Douglas, e A I Braude. 1986. “In Vitro Susceptibility of Fungi to Killing by Neutrophil Granulocytes Discriminates between Primary Pathogenicity and Opportunism.” *Journal of Clinical Investigation* 78 (2): 511–24. <https://doi.org/10.1172/JCI112603>.

Schenk BR. On refractory subcutaneous abscess caused by a fungus possibly related to the *Sporotricha*. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1898;93:286-90.

Schubach, T. M. P., A. C. F. Valle, M. C. Gutierrez-Galhardo, P. C. F. Monteiro, R. S. Reis, R. M. Zancopé-Oliveira, K. B. F. Marzochi, e A. Schubach. 2001. “Isolation of *Sporothrix Schenckii* from the Nails of Domestic Cats (*Felis Catus*)”. *Medical Mycology* 39 (1): 147–49. <https://doi.org/10.1080/mmy.39.1.147.149>.

Schubach, Tânia Maria Pacheco, Armando de Oliveira Schubach, Tullia Cuzzi-Maya, Tânia Cristina Moita Blanco, Dilma Ferreira Monteiro, e Mônica Bas. s.d. “*Sporothrix Schenckii* Isolated from Domestic Cats with and without Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil”, 4.

- Silva, Margarete Bernardo Tavares da, Mônica Motta de Mattos Costa, Carla Carrilho da Silva Torres, Maria Clara Gutierrez Galhardo, Antonio Carlos Francesconi do Valle, Mônica de Avelar F. M. Magalhães, Paulo Chagastelles Sabroza, e Rosely Magalhães de Oliveira. 2012. “Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil”. *Cadernos de Saúde Pública* 28 (10): 1867–80. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2012001000006>.
- Singhai, Monil, Vinita Rawat, Pankaj Verma, Pawan Kumar Jha, Divya Shree, Rajeev Goyal, e Umesh. 2012. “Primary Pulmonary Sporotrichosis in a Sub-Himalayan Patient”. *Journal of Laboratory Physicians* 4 (01): 048–049. <https://doi.org/10.4103/0974-2727.98674>.
- Smale, Stephen T., Alexander Tarakhovsky, e Gioacchino Natoli. 2014. “Chromatin Contributions to the Regulation of Innate Immunity”. *Annual Review of Immunology* 32 (1): 489–511. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101303>.
- Stothers, Cody L., Katherine R. Burelbach, Allison M. Owen, Naeem K. Patil, Margaret A. McBride, Julia K. Bohannon, Liming Luan, et al. 2021. “ β -Glucan Induces Distinct and Protective Innate Immune Memory in Differentiated Macrophages”. *The Journal of Immunology* 207 (11): 2785–98. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100107>.
- Téllez-Martínez, Damiana, Alexander Batista-Duharte, Deivys Leandro Portuondo, e Iracilda Zeppone Carlos. 2019. “Prophylactic and Therapeutic Vaccines against Sporotrichosis. Feasibility and Prospects”. *Microbes and Infection* 21 (10): 432–40. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2019.05.003>.
- Villalobos-Duno, Héctor L., Laura A. Barreto, Álvaro Alvarez-Aular, Héctor M. Mora-Montes, Nancy E. Lozoya-Pérez, Bernardo Franco, Leila M. Lopes-Bezerra, e Gustavo A. Niño-Vega. 2021. “Comparison of Cell Wall Polysaccharide Composition and Structure Between Strains of *Sporothrix Schenckii* and *Sporothrix Brasiliensis*”. *Frontiers in Microbiology* 12 (setembro): 726958. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.726958>.
- Vismer, Hester F., e A. Eicker. 1994. “Growth of Human Pathogenic Isolates of *Sporothrix Schenckii* on Indigenous and Exotic Wood Species in South Africa”. *Mycological Research* 98 (1): 121–24. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80349-3](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80349-3).
- Walk, Jona, L. Charlotte J. de Bree, Wouter Graumans, Rianne Stoter, Geert-Jan van Gemert, Marga van de Vegte-Bolmer, Karina Teelen, et al. 2019. “Outcomes of Controlled Human Malaria Infection after BCG Vaccination”. *Nature Communications* 10 (1): 874. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08659-3>.
- Waller, Stefanie Bressan, Daiane Flores Dalla Lana, Priscilla Maciel Quatrin, Marcos Roberto Alves Ferreira, Alexandre Meneghello Fuentesfria, e Adelina Mezzari. 2021. “Antifungal Resistance on *Sporothrix* Species: An Overview”. *Brazilian Journal of Microbiology* 52 (1): 73–80. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00307-z>.
- Wout, J. W., R. Poell, e R. Furth. 1992. “The Role of BCG/PPD-Activated Macrophages in Resistance against Systemic Candidiasis in Mice”. *Scandinavian Journal of Immunology* 36 (5): 713–20. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1992.tb03132.x>.
- Yatim, Karim M., e Fadi G. Lakkis. 2015. “A Brief Journey through the Immune System”. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 10 (7): 1274–81. <https://doi.org/10.2215/CJN.10031014>.
- Zhang, Ya-Qin, Xue-Gang Xu, Ming Zhang, Ping Jiang, Xian-Yi Zhou, Zhong-Zhu Li, e Min-Fu Zhang. 2011. “Sporotrichosis: Clinical and Histopathological Manifestations”. *The American Journal of Dermatopathology* 33 (3): 296–302. <https://doi.org/10.1097/DAD.0b013e3181f5b622>.