

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Fisiopatologia

**Caracterização e avaliação da capacidade  
protetora dos peptídeos imunogênicos de  
*Sporothrix brasiliensis***

José Roberto Fogaça de Almeida

Tese para obtenção do Título de DOUTOR  
Orientador: Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

**São Paulo**

2017

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Fisiopatologia

**Caracterização e avaliação da capacidade  
protetora dos peptídeos imunogênicos de  
*Sporothrix brasiliensis***

José Roberto Fogaça de Almeida

Versão Original

Tese para obtenção do Título de DOUTOR  
Orientador: Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

**São Paulo**

2017

José Roberto Fogaça de Almeida

Caracterização e avaliação da capacidade protetora dos peptídeos  
imunogênicos de *Sporothrix brasiliensis*

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção de Título de DOUTOR

Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida  
orientador/presidente

---

1o. examinador

---

2o. examinador

---

3o. examinador

---

4o. examinador

São Paulo, 2017.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Análise Clínicas e Toxicológicas na Faculdade de São Paulo, com auxílios financeiros concedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## **Dedicatória**

*Aos meus pais **Julia** e **Wilson**, e à minha irmã **Juliana**.*

*As pessoas mais importantes da minha vida. Muito obrigado por tudo!*

*A **Grasi**, a mulher da minha vida!*

*Com certeza o melhor presente que ganhei na vida acadêmica*

*E vou levar pra toda vida.*

## **Agradecimentos**

*Primeiramente a **Deus**, por me fornecer saúde, força e sabedoria o suficiente para chegar até aqui.*

*Agradeço ao **Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida** a quem admiro e respeito. Agradeço pela oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa e pela confiança e orientação no desenvolvimento desta tese. Muito obrigado.*

*Agradeço à **Profª. Drª Karen Spadari Ferreira** aos conselhos e por ceder seu espaço laboratorial e materiais para a realização de experimentos desse trabalho.*

*Agradeço à **Profª. Drª. Adelaide José Vaz** “in memoriam” pela aprendizagem, pelo incentivo e ajuda em seguir a carreira acadêmica.*

*Agradeço ao meu amor **Grasielle Pereira Jannuzzi** que sempre esteve ao meu lado nos momentos mais felizes e mais difíceis, me encorajando quando necessário e me animando quando eu mais precisava. Também agradeço pela ajuda em todos os experimentos realizados nesse trabalho, pelos conselhos e a agradável companhia durante todos os meus dias. Muito obrigado minha colega de trabalho, minha amiga e mulher da minha vida, te amo.*

*Agradeço aos meus pais **Julia e Wilson** a minha irmã **Juliana** pelo amor incondicional, pela dedicação e apoio em todas as fases da minha vida. Muito obrigada por tudo.*

*Agradeço a minha nova família **Dona Lucia, Fernando Jannuzzi e Marlen Pereira**. Obrigado pelo apoio incondicional e acolhimento.*

Agradeço aos amigos do DASA **Adriano Brito, Vinícius Castro e Dr<sup>a</sup>. Luci Maria Bezerra Correa** pela ótima companhia e exemplo de dedicação profissionalismo durante uma fase importante na minha vida. Foi com vocês que ingressei no mundo laboratorial e sem vocês não chegaria até aqui, muito obrigado.

Agradeço ao **Gilberto Hideo Kaihami** pela ajuda nos experimentos e pelos ensinamentos e conselhos. Obrigado principalmente pela ajuda no meu desenvolvimento acadêmico e lógico pelas eternas discussões sobre ciência e outros assuntos inúteis, dos temas mais variados e engraçados que possam existir. Um grande amigo pra toda vida, muito obrigado.

Agradeço à **Lavinia Maria Dal'Mas Romera** pela ajuda, pelos ensinamentos e por conseguir fazer qualquer momento do dia ser extremamente engraçado. Muito obrigado pelo convívio diário.

Gostaria de agradecer em especial ao **Lucas Gonçalves Ferreira** (Lucão), à **Suelen Silvana dos Santos** e **Leandro Carvalho Dantas Breda** por todo o auxílio, dedicação e paciência nas mais variadas dúvidas, experimentos e durante a execução de diversos protocolos. Obrigado pelas conversas, pelos momentos alegres, pelas “cachaças” e pela amizade.

Agradeço ao todos os meus amigos de laboratório, **Roney, Nicole, Luana, Gabriela, Larissa, Karla, Fábio, Miriam e Daniel** pelos ótimos momentos de descontração tornando o ambiente agradável para o trabalho.

Agradeço à **Renata Albuquerque**, a melhor técnica que um laboratório pode ter. Muito obrigado pela ajuda na citometria e pelos conselhos.

Agradeço à **Hadassa Cristhina** grande amiga do laboratório de microbiologia, pela companhia e pela ETERNA e divertida presença no laboratório de micologia.

*Agradeço ao pessoal do laboratório de parasitologia, **Rodolfo Ferreira** e **Kátia Sanches** pelo auxílio sempre que necessário.*

*Agradeço ao pessoal do laboratório de imunologia clínica, **Fernando Tessaro**, **Leonardo Mendes**, **Felipe Casagrande** e **Thais Soprani** pelo auxílio, descontração e bolos de aniversário muito obrigado.*

*Agradeço à **Marilisa**, **Edna** e **Suely** pela paciência, pelo bom humor e pela ajuda nas questões burocráticas durante todo o desenvolvimento do trabalho.*

*Agradeço em especial à **Claudinha** “in memoriam” pela boa companhia e pelo seu jeito alegre e agradável de levar a vida.*

*Agradeço a Universidade São Judas Tadeu e todos os amigos que fiz lá, **João Menezes**, **Felipe Scavuzzi**, **Armando Moreira**, **Ricardo Betiol**, **Fernando Évora**, **Kleber Silva** e **Rodrigo Teixeira**. Muito obrigado pela ajuda, ensinamentos e descontração do período da faculdade até hoje. Discussões eternas sobre política, futebol e banalidades, juntamente com as bebedeiras, deixam meus dias mais felizes. Muito obrigado meus amigos, sem vocês eu nunca seria um farmacêutico e não chegaria até aqui.*

*Agradeço ao **Santos Futebol Clube** meu time do coração, uma das poucas coisas que vou amar pra sempre!*

*“A vida é aquilo que acontece enquanto você está ocupado fazendo outros planos”*

***(John Lennon)***

## RESUMO

ALMEIDA, J. R. F. Caracterização e avaliação da capacidade protetora dos peptídeos imunogênicos de *Sporothrix brasiliensis*. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2017.

A esporotricose é uma doença crônica que envolve o tecido subcutâneo afetando seres humanos e animais, causada pelo fungo termodimórfico *Sporothrix* spp.. A esporotricose é endêmica na América latina, principalmente no Brasil que teve o maior surto zoonótico já registrado, ocorrendo na cidade do Rio de Janeiro. A espécie *Sporothrix brasiliensis* é a mais diagnosticada no surto e a mais virulenta entre as espécies de *Sporothrix* spp., causando formas mais graves da doença. A esporotricose em gatos é endêmica, fatal e um dos principais fatores pelo alto número de casos no Rio de Janeiro. O tratamento é longo e não vem sendo o suficiente para conter o número de casos da doença. Uma vacina contra a esporotricose poderia mudar esse paradigma no Brasil. O presente trabalho obteve o proteoma da cepa *S. brasiliensis* 5110 por meio de uma eletroforese 2D, e caracterizou e identificou as possíveis proteínas imunogênicas do fungo por espectrometria de massa. Por meio de programas de predição, foi avaliado e sintetizado 7 sequências de aminoácidos, das proteínas identificadas com maiores chances de se acoplar a molécula MHC de classe II. Apenas 3 foram capazes de induzir proliferação *in vitro*, os peptídeos ZR3, ZR4 e ZR8, que foram utilizados como vacina na esporotricose subcutânea e avaliados sua eficácia por meio da carga fúngica, diâmetro das lesões, perfil celular e níveis de citocinas. Neste trabalho concluímos que o peptídeo ZR8 foi o melhor candidato à vacina na esporotricose, pois foi capaz de diminuir o diâmetro das lesões, aumentar os níveis de citocinas protetoras (IFN- $\gamma$ , IL-17A e IL-1 $\beta$ ) e aumentar o número de células TCD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>, sendo assim induzindo uma resposta imunológica protetora na esporotricose subcutânea.

Palavras chaves: Vacina; *Sporothrix brasiliensis*; Esporotricose, Imunoproteômica.

## ABSTRACT

ALMEIDA, J. R. F. Characterization and evaluation of the protective capacity of the immunogenic peptides of *Sporothrix brasiliensis*. Thesis (Phd in Science). Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, in 2017.

Sporotrichosis is a chronic disease, which involves the subcutaneous tissue affecting humans and animals caused by the thermodynamorphic fungus *Sporothrix* spp. Sporotrichosis is endemic in Latin America, mainly in Brazil that had the largest zoonotic outbreak ever recorded, occurring in the city of Rio de Janeiro. The *Sporothrix brasiliensis* is the species more diagnosed in the outbreak and most virulent, causing severe forms of the disease. Sporotrichosis in cats is endemic, fatal and the main factors due to the high number of cases of the disease in Rio de Janeiro. The treatment is long, and has not been enough to contain the number of cases of sporotrichosis. A vaccine against sporotrichosis could change this paradigm in Brazil. The present work obtained the proteome of *S. brasiliensis* 5110 strain by 2D electrophoresis, and characterized and identified possible immunogenic proteins by mass spectrometry. By prediction programs were evaluated and synthesized 7 peptide sequence from antigenic proteins that have the highest chances of coupling to the MHC class II molecule. From these 7 peptides only 3 were able to induce proliferation *in vitro*, called ZR3, ZR4 and ZR8 peptides, that were used as a vaccine in subcutaneous sporotrichosis and evaluated their efficacy through fungal load, lesion diameter, cell profile and cytokine levels. We conclude that ZR8 peptide was the best candidate for sporotrichosis vaccine, since it was able to decrease the lesion diameter, increase the levels of protective cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-17A and IL-1 $\beta$ ) and increase the number of CD4<sup>+</sup> T cells and CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> inducing a protective immune response in subcutaneous sporotrichosis.

Key words: Vaccine; *Sporothrix brasiliensis*; Sporotrichosis; Immunoproteomics.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                                                                                                          | 17 |
| 1.1 <i>Sporothrix</i> spp. ....                                                                                                                                             | 17 |
| 1.2 Esporotricose.....                                                                                                                                                      | 19 |
| 1.3 Virulência do <i>Sporothrix</i> spp. ....                                                                                                                               | 23 |
| 1.4 Interação fungo-hospedeiro .....                                                                                                                                        | 25 |
| 1.5 Vacina .....                                                                                                                                                            | 27 |
| 1.6 Justificativa.....                                                                                                                                                      | 28 |
| 2. OBJETIVOS.....                                                                                                                                                           | 30 |
| 2.1 Objetivo geral .....                                                                                                                                                    | 30 |
| 2.2 Objetivos específicos.....                                                                                                                                              | 30 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                                                                 | 31 |
| 3.1 Protocolo imunoproteômico para a caracterização, identificação e avaliação dos peptídeos da cepa <i>S. brasiliensis</i> 5110 .....                                      | 31 |
| 3.2 Microrganismo e condições de cultura.....                                                                                                                               | 32 |
| 3.3 Camundongos .....                                                                                                                                                       | 32 |
| 3.4 Extração das proteínas da cepa <i>S. brasiliensis</i> 5110.....                                                                                                         | 32 |
| 3.5 Obtenção do soro policlonal .....                                                                                                                                       | 33 |
| 3.6 Eletroforese 2D das proteínas da cepa <i>S. brasiliensis</i> 5110 e <i>western blot</i> utilizando o soro policlonal .....                                              | 33 |
| 3.7 Sequenciamento dos peptídeos.....                                                                                                                                       | 34 |
| 3.8 Seleção dos peptídeos por meio do acoplamento na molécula de MHC de classe II .....                                                                                     | 34 |
| 3.9 Proliferação celular .....                                                                                                                                              | 35 |
| 3.10 Imunização com leveduras de <i>S. brasiliensis</i> 5110 morto por calor .....                                                                                          | 35 |
| 3.11 Vacinação e infecção dos camundongos.....                                                                                                                              | 36 |
| 3.12 Perfil celular induzido pelos peptídeos.....                                                                                                                           | 37 |
| 3.13 Níveis de citocinas.....                                                                                                                                               | 38 |
| 3.14 Análise estatística.....                                                                                                                                               | 39 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....                                                                                                                                             | 40 |
| 4.1 Proteoma da cepa <i>S. brasiliensis</i> 5110 e as proteínas .....                                                                                                       | 40 |
| 4.2 Identificação das proteínas da cepa <i>S. brasiliensis</i> 5110 e a predição dos peptídeos na molécula de MHC de classe II .....                                        | 43 |
| 4.3 Os peptídeos ZR3, ZR4 e ZR8 foram capazes de promover proliferação em células sensibilizadas com a cepa <i>S. brasiliensis</i> 5110 .....                               | 47 |
| 4.4 Imunização com leveduras mortas por calor da cepa <i>S. brasiliensis</i> 5110 induz uma resposta protetora e diminui a carga fúngica na esporotricose disseminada. .... | 51 |
| 4.5 Indução de uma resposta protetora por peptídeos imunogênicos na esporotricose subcutânea .....                                                                          | 55 |

|                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.6 Os peptídeos ZR3 e ZR8 induzem uma resposta imunológica protetora na esporotricose..... | 60 |
| 4.7 Os peptídeos ZR3 e ZR8 induzem uma resposta imunológica protetora na esporotricose..... | 65 |
| 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....                                                                | 69 |
| 6. CONCLUSÕES.....                                                                          | 73 |
| 7. BIBLIOGRAFIA.....                                                                        | 74 |
| 8. ANEXOS.....                                                                              | 86 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Protocolo para a caracterização, identificação e avaliação da eficácia dos peptídeos candidatos à vacina na esporotricose. ....                      | 31 |
| <b>Figura 2.</b> Protocolo de vacinação e infecção com a cepa <i>S. brasiliensis</i> 5110. ....                                                                       | 37 |
| <b>Figura 3.</b> Infecção subcutânea com a cepa <i>S. brasiliensis</i> 5110. ....                                                                                     | 37 |
| <b>Figura 4.</b> Estratégia de gate. ....                                                                                                                             | 38 |
| <b>Figura 5.</b> Eletroforese 2D do proteoma da cepa <i>S. brasiliensis</i> 5110 corado por coomassie blue e prata. ....                                              | 41 |
| <b>Figura 6.</b> Proteínas da cepa <i>S. brasiliensis</i> 5110. ....                                                                                                  | 42 |
| <b>Figura 7.</b> Os 16 spots selecionados para o sequenciamento. ....                                                                                                 | 44 |
| <b>Figura 8.</b> Ensaio de proliferação celular utilizando os peptídeos imunogênicos da cepa <i>S. brasiliensis</i> 5110. ....                                        | 49 |
| <b>Figura 9.</b> Níveis das citocinas no sobrenadante do ensaio de proliferação celular. ....                                                                         | 50 |
| <b>Figura 10.</b> Carga fúngica na esporotricose disseminada após a imunização com leveduras da cepa <i>S. brasiliensis</i> 5110 mortas por calor. ....               | 53 |
| <b>Figura 11.</b> Níveis de citocinas induzidas pela imunização com leveduras da cepa <i>S. brasiliensis</i> 5110 mortas por calor na esporotricose disseminada. .... | 54 |
| <b>Figura 12.</b> O efeito dos peptídeos imunogênicos no peso e no diâmetro das lesões na esporotricose subcutânea. ....                                              | 56 |
| <b>Figura 13.</b> Fotos das lesões subcutâneas no 15º dia de infecção. ....                                                                                           | 57 |
| <b>Figura 14.</b> Carga fúngica na esporotricose subcutânea em camundongos vacinados com os peptídeos imunogênicos. ....                                              | 58 |
| <b>Figura 15.</b> Fotos das lesões secundárias no 35º dia de infecção. ....                                                                                           | 59 |
| <b>Figura 16.</b> Número total de células CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> na esporotricose subcutânea, após a vacinação com os peptídeos imunogênicos. ....        | 61 |
| <b>Figura 17.</b> Número total de células CD3 <sup>+</sup> /CD19 <sup>+</sup> na esporotricose subcutânea, após a vacinação com os peptídeos imunogênicos. ....       | 62 |
| <b>Figura 18.</b> Número total de células CD3 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> na esporotricose subcutânea, após a vacinação com os peptídeos imunogênicos. ....        | 63 |
| <b>Figura 19.</b> Número total de células CD11b <sup>+</sup> /GR1 <sup>+</sup> na esporotricose subcutânea, após a vacinação com os peptídeos imunogênicos. ....      | 64 |
| <b>Figura 20.</b> Concentração de IFN- $\gamma$ na lesão, baço e linfonodo dos camundongos vacinados com os peptídeos imunogênicos na esporotricose subcutânea. ....  | 66 |
| <b>Figura 21.</b> Concentração de IL-17A na lesão, baço e linfonodo dos camundongos vacinados com os peptídeos imunogênicos na esporotricose subcutânea. ....         | 67 |
| <b>Figura 22.</b> Concentração de IL-1 $\beta$ na lesão, baço e linfonodo dos camundongos vacinados com os peptídeos imunogênicos na esporotricose subcutânea. ....   | 68 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> <i>As proteínas identificadas no genoma do S. brasiliensis 5110.</i> ..... | 45 |
| <b>Tabela 2.</b> <i>Os peptídeos selecionados para síntese.</i> .....                       | 46 |

## LISTA DE ABREVIações

|                                                                                   |                                                                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| <b>°C</b> – Graus Celsius                                                         | <b>MHC</b> – Complexo principal de histocompatibilidade               |
| <b>APC</b> – <i>Allophycocyanin</i>                                               | <b>Min</b> – Minutos                                                  |
| <b>APC</b> – Célula apresentadora de antígeno                                     | <b>NN</b> – <i>Neural network-based method</i>                        |
| <b>BHI</b> – <i>Brain Heart Infusion</i>                                          | <b>NO</b> – Óxido nítrico                                             |
| <b>BSA</b> – Albumina sérica bovina                                               | <b>NOD</b> – <i>Nod-like receptors</i>                                |
| <b>CD</b> – <i>Cluster of differentiation</i>                                     | <b>PAMP</b> – Padrões moleculares associados a patógenos              |
| <b>CFSE</b> – <i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>                        | <b>PBS</b> – Solução salina em tampão fosfato                         |
| <b>CHAPS</b> – 3-((3- <i>cholamidopropyl dimethylammonio</i> )-1-propanesulfonate | <b>PBS-T</b> – Solução salina em tampão fosfato com 0,05% de Tween 20 |
| <b>cm</b> – Centímetro                                                            | <b>PE</b> – <i>Phycoerythrin</i>                                      |
| <b>DTT</b> – 1,4 ditiotreitól                                                     | <b>PerCP</b> – <i>Peridinin Chlorophyll Protein Complex</i>           |
| <b>ECL</b> – <i>Enhanced chemiluminescence</i>                                    | <b>PHA</b> – Phitohemaglutinina                                       |
| <b>ELISA</b> – <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>                           | <b>pI</b> – Ponto isoeletrico                                         |
| <b>FACS</b> – <i>Flourescence-activated cell sorting</i>                          | <b>PRR</b> – Receptor de reconhecimento padrão                        |
| <b>FITC</b> – Isotiocianato de fluoresceína                                       | <b>SDS</b> – <i>Dodecil sulfato de sódio</i>                          |
| <b>FMO</b> – <i>Fluorescence-minus-one</i>                                        | <b>SMM</b> – <i>Stabilization matrix alignment method</i>             |
| <b>FSC</b> – <i>Forward scatter</i>                                               | <b>SPF</b> – <i>Specific pathogen free</i>                            |
| <b>g</b> – Gramas                                                                 | <b>SSC</b> – <i>Side scatter</i>                                      |
| <b>GP70</b> – Glicoproteína de 70 KDa                                             | <b>TCD4</b> – Linfócito T auxiliar                                    |
| <b>GR1</b> – Marcador para Ly-6G/Ly-6C                                            | <b>TCD8</b> – Linfócito T citotóxico                                  |
| <b>H</b> – Horas                                                                  | <b>Th1</b> – Linfócitos T <i>helper</i> classe 1                      |
| <b>HEPES</b> – Ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineetanesulfonico                | <b>Th17</b> – Linfócitos T <i>helper</i> classe 17                    |
| <b>HRP</b> – <i>Horseradish peroxidase</i>                                        | <b>Th2</b> – Linfócitos T <i>helper</i> classe 2                      |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b> – <i>Interferon-<math>\gamma</math></i>            | <b>TLR</b> – Receptor do tipo toll                                    |
| <b>IL</b> – Interleucina                                                          | <b>TNF-<math>\alpha</math></b> – Fator de necrose tumoral             |
| <b>L</b> – Litros                                                                 | <b>TOF</b> – <i>Time of flight</i>                                    |
| <b>M</b> – Molar                                                                  | <b>Treg</b> – Célula T reguladora                                     |
| <b>mA</b> – Miliampère                                                            | <b>UFC</b> – Unidades Formadoras de Colônias                          |
| <b>mAb</b> – <i>Monoclonal antibody</i>                                           | <b>V</b> – Volts                                                      |
| <b>MALDI</b> – <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>                 |                                                                       |

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 *Sporothrix* spp.

Esporotricose é uma micose subcutânea crônica que afeta humanos e animais. É causada pelo fungo termodimórfico *Sporothrix* spp. e é considerada a micose subcutânea mais frequente na América latina (DÍAZ, 1989).

O primeiro relato da esporotricose foi feito por Benjamin Robinson Schenck, em 1898 no *Johns Hopkins Hospital* em Baltimore (Estados Unidos), o fungo foi isolado a partir de nódulos ulcerosos no dedo e no antebraço de um paciente de 36 anos. O patologista Erwin Smith concluiu que o fungo pertencia ao gênero *Sporotrichum* (SCHENCK, 1898). O segundo relato da esporotricose foi em um menino que sofreu uma lesão no dedo com um martelo em 1900, nesse caso foi proposto a denominação atual do fungo *Sporothrix schenckii* (*S. schenckii*) (HEKTOEN; PERKINS, 1900). No Brasil, a esporotricose foi relatada por LUTZ; SPLENDORE (1907) que descreveram a doença em humanos e em ratos, demonstrando a presença de corpos asteróides nos tecidos que foram úteis para o diagnóstico histopatológico da esporotricose.

O *Sporothrix* spp. é um fungo que apresenta dimorfismo térmico, a forma miceliana (saprófita) e a forma de levedura (parasitária) (HOWARD, 1961). Esta transição, induzida por temperatura, é uma importante adaptação morfológica para a infecção em mamíferos (OROFINO-COSTA et al., 2017).

A forma miceliana é encontrada na natureza ou quando cultivado a 25°C. Microscopicamente observa-se um composto de hifas hialinas, septadas, ramificadas, com 1 à 2 µm de largura. Essas hifas contêm conidióforos finos que no ápice possuem uma pequena vesícula com denticulos, capazes de produzir conídios de 2 a 4 µm organizados em grupos parecidos com “flores de margaridas”, uma característica importante do *Sporothrix* spp. (LACAZ et al., 1998; LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006; ALMEIDA, R., 2008).

Quando presente no tecido do hospedeiro o fungo apresenta-se na forma de levedura. Essa forma é encontrada próxima aos granulomas, geralmente em formato alongado, fusiforme, semelhante a um charuto. Microscopicamente é observado formas arredondadas ou ovais, com 2 à 6 µm de diâmetros com pequenas células em brotamento (MENDONÇA et al., 1976; KENYON; RUSSELL; MCMURRAY, 1984; LACAZ et al., 1998; SIDRIM; ROCHA, 2004; MEHTA et al., 2007; ALMEIDA, R., 2008).

Por mais de 100 anos o *S. schenckii* foi descrito como a única espécie responsável pela esporotricose. Entretanto, em 2006, por meio de análises filogenéticas

na sequência dos genes da calmodulina, foi possível determinar novas espécies de *Sporothrix* spp. (MARIMON et al., 2006; MARIMON et al., 2007).

Diferenças fenotípicas também foram observadas nas novas espécies, como características macroscópicas, assimilação de açúcares, presença de conídios sésseis, a capacidade de crescer a 37°C, resistência ao pH e virulência (FERNANDES, G. F. et al., 2009). De acordo com DE BEER; DUONG; WINGFIELD (2016), para facilitar futuros estudos dentro das espécies de *Sporothrix* spp., definiram seis complexos de espécies no gênero *Sporothrix*: 1- Complexo *S. gossypina*; 2- Complexo *S. stenoceras*; 3- Clado patogênico; 4- Complexo *S. inflata*; 5- Complexo *S. candida* e 6- Complexo *S. pallida*. Clinicamente as espécies também podem ser separados em clado patogênico (Agentes patogênicos em humanos), incluindo *Sporothrix brasiliensis* (*S. brasiliensis*), *S. schenckii*, *Sporothrix globosa* (*S. globosa*) e *Sporothrix luriei* (*S. luriei*) e clado ambiental (patógenos que raramente afetam humanos), que inclui os outros 5 complexos de *Sporothrix*, sendo espécies ambientais, estando presentes, principalmente, no solo, madeiras e matérias vegetais.

As espécies do clado patogênico são comuns em casos de esporotricose humana e animal, porém existem diferenças na forma de transmissão, virulência e na distribuição geográfica. *S. schenckii* e *S. globosa* são cosmopolitas e a transmissão ao hospedeiro é via ambiental, por meio da inoculação de conídios do fungo no tecido subcutâneo, presente em plantas ou solo contaminado (ZHANG, Y et al., 2015; RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2016). A espécie *S. globosa* é mais relatada nos casos de esporotricose na Ásia, principalmente na China, enquanto a espécie *S. schenckii* tem distribuição mundial, sendo a espécie mais encontrada em áreas endêmicas como Austrália e África do Sul (ZHANG, Y et al., 2015). Entre as espécies no clado patogênico, *S. luriei* é a menos virulenta, e a menos encontrada em casos de esporotricose humana (MARIMON et al., 2008). No Brasil *S. brasiliensis* é a espécie predominante, e a principal espécie na transmissão zoonótica da esporotricose (RODRIGUES et al., 2013; RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2016).

A espécie *S. schenckii* está relatada com infecções benignas na esporotricose e com virulência moderada em modelos animais, já a espécie *S. brasiliensis* é altamente virulenta e esta associada a casos graves da doença (CASTRO et al., 2013; FERNANDES, G. F. et al., 2013; FREITAS, D. F. et al., 2015a; FREITAS, D. F. et al., 2015b; PAIXÃO et al., 2015; CLAVIJO-GIRALDO et al., 2016). Diferentemente da espécie *S. schenckii*, as espécies *S. brasiliensis* e *S. globosa* estão mais adaptadas em infecções em mamíferos e menos suscetíveis ao antifúngico itraconazol (FISCHMAN et al., 2012; ISHIDA et al., 2014; ZHANG, Y et al., 2015; RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2016; GREMIÃO, I. D. F. et al., 2017).

## 1.2 Esporotricose

A esporotricose é uma micose subcutânea crônica, que em alguns casos pode evoluir para casos disseminados. A transmissão da doença está associada à inoculação de conídios ou leveduras no tecido subcutâneo por meio de um trauma envolvendo vegetais em decomposição ou arranhões de gatos doentes ou contaminados pelo fungo (OROFINO-COSTA et al., 2017). Por muito tempo a transmissão da doença foi relacionada estritamente a um trauma no tecido subcutâneo, porém já existem alguns relatos de transmissão pelas vias aéreas (ENGLAND; HOCHHOLZER, 1987; PADHYE et al., 1992; OROFINO-COSTA et al., 2013).

Algumas atividades como jardinagem, agricultura, horticultura, pescaria, caça, mineração entre outras, estão associadas com a esporotricose (DE LIMA BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011). No momento, devido à evidência da transmissão zoonótica, veterinários, técnicos de veterinária e proprietários de gatos são considerados uma nova categoria de risco para a aquisição da doença (DE LIMA BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011). Profissionais de laboratório, que manipulam culturas de *Sporothrix* spp., também pertencem ao grupo de risco (THOMPSON; KAPLAN, 1977; COOPER; DIXON; SALKIN, 1992).

No início do século, a esporotricose teve alta prevalência na França e nos Estados Unidos. Atualmente possui distribuição mundial, porém é mais relatada em países da América Latina (LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006). A esporotricose é a micose subcutânea mais frequente na América Latina, onde pode ser considerada endêmica (DÍAZ, 1989). Em áreas rurais do Peru, foram registrados 238 casos de esporotricose no ano 2000, 60% dos casos ocorreram em crianças menores de 15 anos de idade (PAPPAS et al., 2000). Na área montanhosa de Abancay no Peru teve a incidência de aproximadamente 60 casos por 10000 habitantes de 1995 a 1997 (BUSTAMANTE; CAMPOS, 2001). Nos Estados Unidos ocorreram microepidemias em épocas recentes, nos anos 80 durante um reflorestamento e nos anos 90 durante uma festa de Halloween, por meio de contato com feno contaminado (CONTROL, 1988; DOOLEY; BOSTIC; BECKIUS, 1997). Além do continente americano, outros países possuem regiões consideradas áreas endêmicas, como a Índia, Austrália, Japão e África do Sul (PAPPAS et al., 2000; BUSTAMANTE; CAMPOS, 2001). Na cidade de Johannesburg na África do Sul, entre 1941 e 1944, cerca de 3000 mineradores contrairam esporotricose pela presença do fungo nas vigas de madeira da estrutura da mina (HELM; BERMAN, 1947). Recentemente, temos surtos de esporotricose descritos na China envolvendo a colheita de cana e milho, sendo causado principalmente pela espécie *S. globosa* (SONG et al., 2013). No Brasil, a esporotricose é mais frequente nas regiões sul e sudeste, sendo São Paulo, Rio de Janeiro,

Paraná e Rio Grande do Sul os estados com maior incidência (SCHUBACH, A.; DE LIMA BARROS; WANKE, 2008; DE LIMA BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011).

A transmissão zoonótica da esporotricose ganhou grande importância depois de casos relatados no Brasil, que se diferencia de outros surtos que já ocorreram em outras partes do mundo, onde a fonte da infecção é o solo e matéria vegetal em decomposição. Alguns casos de transmissão da esporotricose por animais já foram descritos em outros países, envolvendo acidentes com cobras, aves, esquilos e a caça do tatu (SARAVANAKUMAR; ESLAMI; ZAR, 1996). Entretanto, no Brasil a transmissão da doença por gatos provocou uma epidemia de grande proporção no Rio de Janeiro (BARROS, MÔNICA BASTOS DE LIMA et al., 2004). Apesar de já ter sido registrado a transmissão da doença por cães, cavalos, esquilos e tatus, os gatos são os principais transmissores zoonóticos da esporotricose (KAUFFMAN et al., 2000; SCHUBACH, T. et al., 2003).

O maior surto zoonótico da esporotricose ocorreu no estado do Rio de Janeiro (SCHUBACH, A. O.; SCHUBACH; BARROS, 2005). De acordo com o Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fiocruz, entre 1998 e 2009 foram registrados mais de 2000 casos em seres humanos e 3000 casos em gatos (DE LIMA BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011). Em outro estudo, entre 1998 e 2001, cerca de 86% dos casos de esporotricose registrados foram de pacientes que tiveram contato profissional ou doméstico com gatos contaminados (BARROS, MÔNICA BASTOS DE LIMA et al., 2004). Por conta disso, a doença se tornou endêmica no estado do Rio de Janeiro. E atualmente, a situação da esporotricose no Estado do Rio de Janeiro é alarmante. Houve um aumento de 400% no número de casos de esporotricose felina em 2016, quando comparados a 2015, revelando a expansão significativa da doença. No ano de 2016 foram feitos cerca de 13500 atendimentos de casos com esporotricose, 10000 a mais do que o ano anterior (SUBSECRETARIA DE VIGILÂNCIA, FISCALIZAÇÃO SANITÁRIA E CONTROLE DE ZOONOSES DA PREFEITURA DO RIO DE JANEIRO, 2017). Desde 2013, a notificação da esporotricose é obrigatória no estado do Rio de Janeiro, mas não nos outros estados brasileiros (OROFINO-COSTA et al., 2017).

Outros estados brasileiros também demonstraram aumento no número de casos de esporotricose. Durante 2011-2014, foram notificados 163 casos de esporotricose felina em São Paulo, com cultura de *S. brasiliensis*. Verificou-se a predominância de casos na região sudeste, especificamente nos distritos de Itaquera e Itaim Paulista (MONTENEGRO et al., 2014). Esses dados são preocupantes e mostram que a esporotricose zoonótica, embora registrada em outros países, obteve uma magnitude imensa no Brasil, não registrada em nenhum outro lugar anteriormente.

De acordo com alguns autores, o comportamento felino é o responsável por ter tornado os gatos os grandes vetores na transmissão zoonótica da esporotricose. As fêmeas

costumam atrair os machos que brigam entre si. Nestas ocasiões, animais doentes transmitem o fungo pelo contato direto com as lesões ou pelos ferimentos produzidos por mordeduras ou arranhões (DA CRUZ, 2013; MONTENEGRO et al., 2014). Diferentemente de cachorros, que se fixam nos locais onde vivem, os gatos ocasionalmente transitam em locais diferentes, caçando pássaros ou ratos e se relacionando com outros gatos, depois retornam para casa (CHAVES et al., 2013). Um fator importante para o surto ser consequente nos gatos, é a questão socioeconômica. As pessoas, que residem em áreas negligenciadas, recolhem gatos (sadios e doentes) das ruas e abrigam em suas comunidades formando colônias numerosas, sem qualquer controle sanitário. Quando os animais vão a óbito, acabam sendo abandonados nas ruas ou enterrados em terrenos próximos, que permite a volta do fungo ao meio ambiente, favorecendo o contato com outros gatos selvagens (LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006; BARROS, MONICA BASTOS DE LIMA et al., 2010; FREITAS, D. F. S. et al., 2010; CHAVES et al., 2013). Foi demonstrado que 70% dos pacientes com suspeita de esporotricose haviam abandonado ou dado um destino inadequado ao seu gato doente (MCG, 2011).

SCHUBACH, T. et al. (2001) isolaram *Sporothrix* spp. das unhas e cavidades orais de 148 gatos domésticos com esporotricose e 84 gatos aparentemente saudáveis no estado do Rio de Janeiro, demonstrando que a transmissão pode ocorrer por meio de arranhões ou mordidas destes animais, que não necessariamente tenham uma lesão cutânea de esporotricose. Outro fator sobre a alta incidência da transmissão zoonótica pelos gatos pode ser justificado pelo possível inóculo de leveduras e não de conídios ou fragmentos de hifa. O fato de não haver a necessidade da transformação de hifa em levedura pode justificar as formas mais graves da doença (FERNANDES, K. et al., 2000).

O perfil epidemiológico da esporotricose é caracterizado principalmente por crianças, idosos e mulheres. Esses grupos geralmente têm contatos mais frequentes com gatos (OROFINO-COSTA et al., 2017). Existem diversas manifestações clínicas da esporotricose, vários fatores são capazes de influenciar as formas clínicas da doença, como a quantidade de inóculo, estado do sistema imune do hospedeiro, a virulência do isolado e profundidade da lesão. Podemos dividir as formas clínicas da esporotricose em forma cutânea (Fixa, linfocutânea e disseminada), mucosa, extracutânea e residuais/formas especiais (LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006).

Na forma cutânea, a infecção geralmente aparece após uma inoculação traumática do fungo no tecido subcutâneo. A lesão pode ser nodular ou ulcerada apenas no local de inoculação do fungo ou seguir uma trajetória linfática caracterizada por lesões nodulares que ulceram, constituindo a forma cutânea fixa ou a forma linfocutânea, respectivamente, sendo a forma linfocutânea a mais frequente na esporotricose (cerca de 80%) (STALKUP; BELL; ROSEN, 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004). A forma cutânea disseminada é observada

principalmente em pacientes imunossuprimidos, é caracterizada por lesões múltiplas que inicialmente aparecem como nódulos subcutâneos e então podem evoluir para pápulas, pústulas ou úlceras (SHAW; LEVINSON; MONTANARO, 1989; DONABEDIAN et al., 1994). Na forma mucosa, o fungo pode afetar a região da mucosa nasal, apresentando lesões no septo com a drenagem de secreções sanguinolentas. Na região da conjuntiva dos olhos, onde além de uma lesão granulomatosa, ocorre a secreção de um líquido seroso-purulento com vermelhidão nos olhos (HAMPTON; ADESINA; CHODOSH, 2002; SCHUBACH, A. O.; SCHUBACH; BARROS, 2005; DE LIMA BARROS et al., 2008). A forma extracutânea pode ser dividida em ósteo-articular, pulmonar, meníngea e generalizada. A esporotricose ósteo-articular, pode começar como uma artrite associada ou não a lesões cutâneas (COSTA et al., 2008). Os pulmões podem ser afetados por meio da inalação ou pela disseminação hematogênica do fungo. Os sintomas comuns são tosse e dispnéia (ENGLAND; HOCHHOLZER, 1987; PADHYE et al., 1992). Alguns fatores que prejudiquem a resposta imune, como alcoolismo, transplante de órgãos, diabetes *mellitus* e imunodeficiências podem levar o paciente a ter esporotricose no sistema nervoso central e manifestações sistêmicas, que são fatais (VILELA et al., 2007; FREITAS, D. F. S. et al., 2012). Em alguns casos, pacientes apresentam cura espontânea, enquanto outros desenvolvem hipersensibilidade como eritema nodoso, eritema multiforme e síndrome de *Sweet* devido a uma resposta imune exacerbada contra o fungo (OROFINO-COSTA et al., 2010; FREITAS, D. F. S. et al., 2012; ZHANG, YAQIN; PYLA, 2014).

A escolha do tratamento na esporotricose depende essencialmente da forma clínica e o estado imunológico do hospedeiro. Os medicamentos mais utilizados no tratamento da esporotricose são itraconazol, iodeto de potássio, terbinafina e anfotericina B (OROFINO-COSTA et al., 2017). O itraconazol é considerada o fármaco de escolha no tratamento, devido à sua eficácia, segurança e conveniência posológica (200 mg/dia via oral) (KAUFFMAN et al., 2007). O tratamento da esporotricose dura normalmente 6 meses. A anfotericina B pode ser utilizada no regime de manutenção da terapia, juntamente com itraconazol, sendo essa a melhor opção para o tratamento da esporotricose disseminada (KAUFFMAN et al., 2007). Relatos do uso da anfotericina B nos gatos são bem escassas, devido aos efeitos adversos causados (GREMIÃO, I. D. et al., 2015). O tratamento na esporotricose felina é muito complicado. O tratamento com Itraconazol é por via oral e os gatos são bem resistentes em ingerir medicamentos, ficando estressados e arranhando seus donos, transmitindo a doença. Pelo fato do tratamento ser longo, no mínimo 3 meses, muitos donos acabam desistindo do tratamento e abandonando o gato doente. As medidas epidemiológicas que ajudam no controle da transmissão zoonótica da esporotricose é castrar e tratar gatos doentes, bem como informar responsabilidade ao dono em cuidar do animal e o conhecimento da esporotricose. Gatos infectados que venham a falecer devem

ser incinerados, em vez de serem enterrados, evitando assim a difusão em *S. brasiliensis* no solo e na natureza (OROFINO-COSTA et al., 2017).

### 1.3 Virulência do *Sporothrix* spp.

A virulência é a capacidade intrínseca que difere microrganismos patogênicos de não patogênicos. Em indivíduos com o sistema imunológico competente, a virulência é responsável pelo momento em que a relação entre o patógeno e o hospedeiro resulta em prejuízo ao hospedeiro, causando assim a doença. A virulência também pode ser medida através da mortalidade, induzida pelo patógeno ou pelo seu poder invasivo nos tecidos, do hospedeiro (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004). Nos últimos anos vários estudos têm demonstrado uma diversidade de fatores de virulência em fungos, tais como termotolerância, ergosterol, melanina e moléculas de adesão (HOGAN; KLEIN; LEVITZ, 1996).

Alguns fatores de virulência do *Sporothrix* spp. são bem conhecidos e semelhantes a outros fungos patogênicos, como por exemplo, a termotolerância. Foi demonstrado que alguns isolados de formas mais brandas da doença, forma cutânea fixa, são incapazes de crescer a 37°C, diferentemente de formas mais invasivas da esporotricose, como a forma linfocutânea e disseminada (TACHIBANA; MATSUYAMA; MITSUYAMA, 1999; TACHIBANA et al., 2001; MESA-ARANGO et al., 2002). O dimorfismo é uma característica importante na virulência de fungos patogênicos. A transição de hifa para levedura promove alterações na parede celular, expondo componentes antigenicos envolvidos na virulência do fungo (KLEIN; TEBBETS, 2007). O ergosterol, presente na membrana celular do fungo, é capaz de reagir com o peróxido de hidrogênio, produzido pelo macrófago, formando peróxido de ergosterol, sendo este um mecanismo de evasão do fungo (DA GRAÇA SGARBI et al., 1997). A melanina protege o fungo contra condições adversas, tais como, radiação UV, aumento da temperatura e espécies reativas de oxigênio (CASADEVALL, ARTURO, 2007). A melanina promove resistência do fungo contra a fagocitose (ROMERO-MARTINEZ et al., 2000). Foi demonstrado que o *S. schenckii*, com presença de melanina em sua parede, é capaz de ter uma grande capacidade invasiva e promover a formação de granulomas multifocais, ao contrário de uma cepa albina, com o mesmo perfil genotípico (DE LIMA BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011). A produção da melanina ocorre por meio de compostos fenólicos como a L-DOPA (ALMEIDA-PAES et al., 2009). Corroborando com isso, foi demonstrada uma possível modulação na produção de melanina pela composição do meio de cultura utilizado no cultivo do fungo, alterando assim o seu perfil de virulência (TEIXEIRA, P. A. C. et al., 2010). A espécie *S. brasiliensis* possui rápida melanização e altos níveis de pigmentação (ALMEIDA-PAES et al., 2015).

Em diversos trabalhos, foi observado que *S. brasiliensis* é a espécie mais virulenta dentro do gênero *Sporothrix* spp., (ARRILLAGA-MONCRIEFF et al., 2009; FERNANDES, et al., 2013; CASTRO et al., 2013; ALMEIDA-PAES et al., 2015; DE ALMEIDA et al., 2015; DELLA-TERRA et al., 2017). Em ensaios de mortalidade, uma infecção intravenosa com *S. brasiliensis* causou óbito nos camundongos em 25 dias (ISHIDA et al., 2014; MARIO et al., 2015). A espécie *S. brasiliensis* está associado com formas mais graves da doença, isso defende a teoria que formas clínicas mais severas da esporotricose podem ser ocasionadas por fatores de virulência intrínsecos do fungo (TACHIBANA; MATSUYAMA; MITSUYAMA, 1998; BRITO et al., 2007; TEIXEIRA, P. A. N. C. et al., 2009).

Um ponto importante na avaliação da virulência de um patógeno é a de adesão nas células do tecido hospedeiro, representando um avanço no processo de invasão, para que assim se estabeleça a doença (VARTIVARIAN, 1992). Os componentes da parede celular fúngica interagem com os componentes da matriz extracelular do hospedeiro, tal aderência está associada às adesinas, que se ligam principalmente a fibronectina, laminina e colágeno tipo 2 (LIMA, O. et al., 1999). A fibronectina e a laminina se ligam fortemente em leveduras do *S. schenckii*, diferentemente dos conídios do fungo (LIMA, O. C. et al., 2004). A expressão das adesinas é diretamente proporcional com a virulência (LIMA, O. et al., 1999; LIMA, O. C. et al., 2001; LIMA, O. C. et al., 2004; TEIXEIRA, P. A. N. C. et al., 2009). Proteinases produzidas extracelularmente, como por exemplo, as proteinases 1 e 2, apresentam a propriedade de hidrolisar o extrato córneo, ajudando na invasão do fungo no tecido do hospedeiro (TSUBOI et al., 1987).

Nosso laboratório identificou a principal proteína antigênica do *Sporothrix* spp., uma adesina a partir da cepa *S. schenckii* M-64, previamente isolada de um caso de esporotricose linfocutânea. Essa adesina é uma glicoproteína com a massa molecular de 70 kDa (GP70), estando presente na superfície e no exoantígeno do fungo (NASCIMENTO; ALMEIDA, 2005; NASCIMENTO et al., 2008). Foi identificada uma glicoproteína similar a identificada pelo nosso laboratório, que foi purificada e observado um *pI* (ponto isoelétrico) de 4,1 e cerca de 5,7% da sua massa molecular composta de N-glicanos (RUIZ-BACA et al., 2009).

Nosso grupo desenvolveu um modelo de tratamento da esporotricose, utilizando um anticorpo monoclonal, denominado mAbP6E7 (Anticorpo monoclonal P6E7), um anticorpo monoclonal contra uma proteína fúngica antigênica GP70 (NASCIMENTO et al., 2008). O mAbP6E7 é eficaz em modelos profilático e terapêuticos contra a esporotricose causada por *S. schenckii* e *S. brasiliensis* (NASCIMENTO et al., 2008; DE ALMEIDA, J. R. F. et al., 2015). Foi desenvolvido um anticorpo humanizado do mAbP6E7 recentemente, que foi capaz de aumentar a fagocitose em monócitos humanos e reduzir a carga fúngica em um

modelo murino de esporotricose (DE ALMEIDA, J. R. et al., 2017). Demonstrando que a GP70 é um importante alvo terapêutico no tratamento da esporotricose.

#### 1.4 Interação fungo-hospedeiro

A resposta imunológica do hospedeiro é essencial na progressão da esporotricose (MAIA et al., 2006; CARLOS et al., 2009). A resposta imunológica pode ser dividida em inata e adquirida. A resposta imune inata é a primeira linha de defesa do hospedeiro, onde os PRRs (Receptor de reconhecimento padrão) reconhecem os PAMPs (Padrões moleculares associados a patógenos) induzindo uma resposta rápida e essencial nas horas iniciais da infecção. Já a resposta adaptativa é uma resposta tardia mediada, principalmente, por linfócitos T e B que induzem uma resposta celular e humoral, respectivamente (ROMANI, 2011).

As APCs (Células apresentadoras de antígenos) como, macrófagos, células dendríticas e linfócitos B, são capazes de reconhecer e fagocitar o fungo. Para que ocorra o reconhecimento pelas células do hospedeiro, é necessário que os PAMPs, presente na superfície do fungo, sejam reconhecidos pelos PRRs, localizados na superfície das APCs, promovendo uma série de reações, como a fagocitose do fungo (BUZÁS et al., 2006). Após a fagocitose, as proteínas imunogênicas do fungo são processadas pelos fagócitos e apresentadas para os linfócitos T, gerando células efetoras e de memória contra o patógeno. A apresentação do antígeno ocorre pela molécula de MHC (Complexo principal de histocompatibilidade) de classe I e do MHC de classe II que primam linfócitos TCD8<sup>+</sup> e TCD4<sup>+</sup> respectivamente. Depois da ativação, as células TCD4<sup>+</sup> se diferenciam em Th1, Th2, Th17 (Linfócitos T *helper*) ou Treg (Linfócitos regulatórios) com produção de diferentes citocinas, gerando diferentes tipos de respostas (WÜTHRICH; DEEPE JR; KLEIN, 2012). A produção de determinadas citocinas é essencial para que ocorra a formação do granuloma, que é um componente essencial na defesa do hospedeiro contra o fungo (TACHIBANA; MATSUYAMA; MATSUYAMA, 1999; UENOTSUCHI et al., 2006). Os linfócitos TCD4<sup>+</sup> e os macrófagos, assim como a produção de IFN- $\gamma$  (*Interferon*), são necessários para a formação do granuloma (TACHIBANA; MATSUYAMA; MATSUYAMA, 1999). Apesar de existir poucos estudos relatando a importância das células TCD8<sup>+</sup> na esporotricose, sabe-se que, juntamente com os linfócitos TCD4<sup>+</sup>, essa célula está presente no granuloma (TACHIBANA; MATSUYAMA; MATSUYAMA, 1999; KOGA; DUAN; FURUE, 2002).

Os macrófagos desempenham papel essencial na resposta inata dentro da esporotricose. A ativação dos macrófagos induz a fagocitose e promove a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como, IL-6 (Interleucina), TNF- $\alpha$  (Fator de necrose tumoral)

e IL-1 $\beta$ , aumentando a atividade microbicida dos macrófagos por meio de ROS (Espécies reativas de oxigênio) como NO (Óxido nítrico), que é altamente citotóxica para o *S. schenckii* (CARLOS et al., 2003). Os conídios de *S. schenckii* induzem baixa produção de ROS favorecendo a transição dimórfica de conídios para leveduras (GUZMAN-BELTRAN et al., 2012). Os receptores de manose tem participação no reconhecimento do *S. schenckii*, promovendo uma resposta Th1 no decorrer da doença (GUZMAN-BELTRAN et al., 2012). O receptor de manose também está relacionado a uma resposta Th1 em outras doenças causadas por fungos (ROMANI, 2011). O papel da dectina-1 também foi investigado na esporotricose, onde o reconhecimento da  $\beta$ -1-3-glucana induz um aumento na produção de citocinas como IL-1 $\beta$  e IL-18 (GONÇALVES et al., 2017). O aumento de IL-1 $\beta$  e IL-18 na esporotricose esta relacionado à ativação da caspase-1, sugerindo a participação do inflamassoma e de receptores NOD (Domínio oligomerizado de nucleotídeo) (JELLMAYER et al., 2017).

Os TLRs (Receptores do tipo toll) fazem parte de uma família de receptores transmembrânicos conservados que contêm um domínio externo a membrana com sequências ricas em leucina particulares para cada TLR (PANDEY; KAWAI; AKIRA, 2015). Estudos recentes demonstraram que extratos lipídicos das leveduras de *S. schenckii* se ligam em TLR4 e essa interação leva indução de ROS (CARLOS et al., 2009; SASSÁ, MICHELI FERNANDA et al., 2012). Macrófagos provenientes de animais nocautes em TLR4 foram incapazes de produzir altos níveis de citocinas, tais como, IL-1 $\beta$ , IL-12 e TNF- $\alpha$  (SASSÁ, MICHELI F et al., 2009). KAJIWARA et al. (2004) defendem que o TLR4 é o principal receptor contra o *S. schenckii* na forma cutânea localizada, pois é capaz de induzir uma resposta Th1, com a produção de citocinas pró-inflamatórias.

Vários estudos relatam a importância da resposta imune celular na esporotricose, pacientes com alguma deficiência nesse tipo de resposta, apresentam formas mais graves da doença (FREITAS, D. F. et al., 2015b). Em modelo de esporotricose experimental, foi demonstrada que a transferência de timócitos para camundongos atímicos tornou esses camundongos resistentes a doença (PLOUFFE JR et al., 1979; DICKERSON; TAYLOR; DRUTZ, 1983). A ausência de uma resposta imune adaptativa aumenta a mortalidade na esporotricose experimental (KAJIWARA et al., 2004). Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> secretam diversas citocinas, como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17A que determinam a resistência do hospedeiro contra infecções fúngicas, como paracoccidiodomicose, coccidiodomicose, aspergilose e candidíase (WÜTHRICH et al., 2015; TRAVASSOS; TABORDA, 2017). A resposta do tipo Th1 é caracterizada pela liberação de IFN- $\gamma$ , um forte ativador de macrófagos, que é fundamental no controle da esporotricose (UENOTSUCHI et al., 2006; POULIOT et al., 2008).

As células Th17 estão envolvidas na ativação e no reparo das barreiras epiteliais, e por meio da secreção da IL-17A, são cruciais na defesa contra fungos (ROMANI, 2011). Na esporotricose, a depleção de citocinas secretada pelas células Th17 ocasionou o aumento da carga fúngica (FERREIRA et al., 2015). A IL-17A está associada ao recrutamento de neutrófilos, que são importantes no controle da esporotricose (KAJIWARA et al., 2004). Os neutrófilos são capazes de destruir o fungo logo após sua invasão no tecido hospedeiro, através da fagocitose e de liberação de ROS (CUNNINGHAM; BULMER; RHOADES, 1979; REX; BENNETT, 1990). Uma resposta imune mista Th1/Th17 é protetora na esporotricose (KAJIWARA et al., 2004; UENOTSUCHI et al., 2006; VERDAN et al., 2012; CHEN et al., 2017). Já uma resposta Th1/Th2 esta associada com uma alta carga fúngica na esporotricose experimental (DE ALMEIDA, J. R. F. et al., 2015).

A resposta humoral é muito importante em infecções fúngicas. Fatores como opsonização e reconhecimento da fração Fc promovem a fagocitose e a eliminação do patógeno (CASADEVALL, ARTURO; PIROFSKI, 2012). Tratamento com anticorpos já demonstraram proteção contra algumas infecções fúngicas, como a paracoccidioidomicose e candidíase (CASADEVALL, A; PIROFSKI, 2005; XANDER et al., 2007; BUISSA-FILHO et al., 2008; TOLEDO et al., 2010; ZHANG, H. et al., 2011). Como descrito anteriormente, nosso grupo laboratorial observou uma forte e protetora resposta humoral, por anticorpos IgG1, na esporotricose, essa proteção esta associada a GP70 (NASCIMENTO; ALMEIDA, 2005). O tratamento com o mAbP6E7 é protetor na esporotricose experimental, contra *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, pela opsonização do fungo e pelos altos níveis de IFN- $\gamma$  (NASCIMENTO et al., 2008; TEIXEIRA, P. A. N. C. et al., 2009; DE ALMEIDA, J. R. F. et al., 2015; DE ALMEIDA, J. R. et al., 2017).

## 1.5 Vacina

Vacinas foram uma das grandes descobertas na saúde publica no ultimo século, erradicando diversas doenças como o vírus da varíola, o vírus da peste bovina e outras doenças bacterianas e virais. Porém, ainda não foi desenvolvida uma vacina eficaz e segura contra infecções fúngicas devido a diversos fatores, como a falta de conhecimento sobre os mecanismos que sustentam a imunidade protetora contra infecções fúngicas, complexidade genética do fungo e a falta de um antígeno eficaz (ROMANI, 2011; WÜTHRICH; DEEPE JR; KLEIN, 2012; WÜTHRICH et al., 2015). Os candidatos à vacina procuram estimular linfócitos TCD4<sup>+</sup> e linfócitos B, devido à proteção da resposta imunológica Th1/Th17 e a resposta humoral, respectivamente. Candidatos à vacina são testados em modelos animais, avaliando segurança, ativação do sistema imunológico e eficácia (NANJAPPA; KLEIN, 2014).

Contra a candidíase, dois candidatos à vacina estão em testes clínicos em humanos, ambos ativam uma resposta Th1/Th17 e anticorpos protetores contra a *Candida* spp. (EDWARDS JR, 2012). Na aspergilose e na criptococose, uma vacina também induziu uma resposta Th1 e alta produção de anticorpos (LUONG et al., 2007; STUEHLER et al., 2011). WÜTHRICH; DEEPE JR; KLEIN (2012) elaboraram uma vacina atenuada com *Blastomyces dermatitidis*, sem o fator de virulência BAD-1, que foi protetor na blastomicose, através da resposta mista Th1/Th17, porém com ausência de anticorpos. Os linfócitos TCD4<sup>+</sup> expandidos por essa vacina também foram protetores contra a histoplasmose e coccidioidomicose, sugerindo um antígeno conservado em fungos patogênicos. A partir dessa ideia, esse mesmo grupo elaborou uma vacina a partir de um epítipo da calnexina, altamente conservado no filo ascomycota, que foi capaz de expandir linfócitos TCD4<sup>+</sup>, sendo um candidato à vacina contra múltiplos fungos (WÜTHRICH et al., 2015).

Diferentes protocolos são utilizados na busca de antígenos capazes de promover proteção em infecções fúngicas. Através de programas de antigenicidade e de predição ao MHC de classe II, foi elaborada uma vacina contra paracoccidioidomicose. Um epítipo de 15 aminoácidos, denominado P10, foi isolado a partir da GP43, principal antígeno do *Paracoccidioides brasiliensis* (TABORDA et al., 1998). Na paracoccidioidomicose experimental, o P10 foi capaz de induzir proliferação de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, produção de citocinas pró-inflamatórias e diminuir a carga fúngica em diversos modelos associados com diferentes adjuvantes e antifúngicos (MAYORGA et al., 2012; TRAVASSOS; RITTNER; TABORDA, 2013; MUÑOZ et al., 2014; TRAVASSOS; TABORDA, 2017).

Pelo fato da esporotricose ser uma doença cosmopolita, aos altos números de casos na Ásia e no Brasil e a magnitude do surto zoonótico no Rio de Janeiro, são necessárias novas estratégias para controlar a doença em áreas endêmicas. Como descrito anteriormente, a GP70 e o principal antígeno do *Sporothrix* spp., tendo um papel importante na virulência e resposta imune hospedeiro na esporotricose, se tornando um importante candidato a vacina na esporotricose (NASCIMENTO et al., 2008; DE ALMEIDA, J. R. F. et al., 2015; RODRIGUES et al., 2015b)

## 1.6 Justificativa

Conforme demonstrado, *S. brasiliensis* é a espécie mais virulenta do gênero *Sporothrix* spp., sendo a principal espécie no surto zoonótico da esporotricose e associada em casos graves da doença. As vacinas foram capazes de erradicar diversas doenças, acabando com epidemias, surtos graves e fatais mundialmente. Uma vacina contra a esporotricose, principalmente contra *S. brasiliensis*, iria melhorar o parâmetro da doença no

mundo, principalmente no Brasil. Diante disso, esse trabalho buscou caracterizar, identificar e avaliar a eficácia de possíveis alvos para uma vacina contra a esporotricose.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Caracterizar e identificar peptídeos imunogênicos da cepa de *S. brasiliensis* 5110 e avaliar a eficácia e a resposta imunológica induzida por esses peptídeos como uma vacina na esporotricose subcutânea experimental.

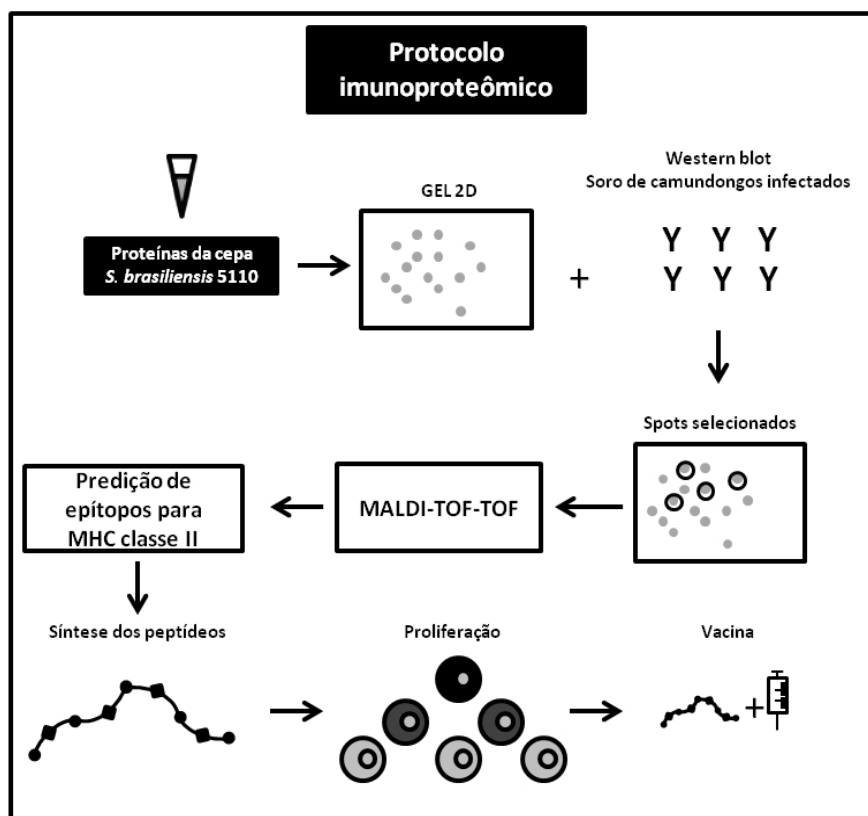
### 2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar e identificar as possíveis proteínas antigênicas da cepa de *S. brasiliensis* 5110;
- Analisar o grau de acoplamento com a molécula de MHC de classe II, de camundongos BALB/c, das sequências peptídicas das proteínas identificadas;
- Sintetizar os peptídeos com maiores chances de se acoplar ao MHC de classe II;
- Definir uma resposta imunológica protetora contra o *S. brasiliensis* por meio de uma vacina utilizando o fungo morto por calor;
- Avaliar a capacidade dos peptídeos de induzirem proliferação em células de camundongos infectados com *S. brasiliensis*, e avaliar as citocinas produzidas relacionadas com as respostas do tipo Th1 e Th17;
- Avaliar a eficácia dos peptídeos no controle da esporotricose subcutânea, por meio da carga fúngica, disseminação em outros órgãos, diâmetro da lesão e lesões secundárias;
- Caracterizar a resposta imunológica induzida pelos peptídeos *in vivo*, por meio dos níveis de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-17A e IL-1 $\beta$ ) e pelo perfil celular de células no baço e linfonodo (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>) e na lesão (GR1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Protocolo imunoproteômico para a caracterização, identificação e avaliação dos peptídeos da cepa *S. brasiliensis* 5110

Foi realizado um protocolo imunoproteômico, por meio da resposta imunológica humoral na esporotricose juntamente com programas de predição para o acoplamento com molécula de MHC de classe II, para assim selecionar os peptídeos candidatos a uma vacina na esporotricose subcutânea (**Figura 1**).



**Figura 1. Protocolo para a caracterização, identificação e avaliação da eficácia dos peptídeos candidatos à vacina na esporotricose.** Por meio de uma eletroforese 2D das proteínas da cepa *S. brasiliensis* 5110, foram selecionados e identificados os spots que reagiram contra o soro policlonal de camundongos infectados. As proteínas identificadas foram avaliadas, por meio de programas de predição, os epítomos com maiores chances de se ligar na molécula de MHC de classe II. Os peptídeos com os maiores scores na predição foram sintetizados e avaliados em ensaios de proliferação *in vitro*. Os peptídeos capazes de induzir proliferação *in vitro* foram testados como uma vacina na esporotricose.

### 3.2 Microrganismo e condições de cultura

Foi utilizada a cepa de *S. brasiliensis* 5110 (ATCC MYA - 4823), um isolado de esporotricose cutânea em um felino no Rio de Janeiro. Esta cepa foi mantida, com passagens regulares em camundongos, a 37°C em ágar BHI (BD Difco) na micoteca do Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP). Para a preparação do inóculo fúngico, a cepa *S. brasiliensis* foi cultivada em meio BHI a 37°C por 5 dias. A seguir as leveduras foram suspensas em 5 mL de tampão fosfato salino (PBS) estéril. A concentração das leveduras foi ajustada após serem contadas na câmara de Neubauer.

### 3.3 Camundongos

Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas de 8 a 12 semanas de idade, que foram obtidos no biotério de produção e experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os animais foram criados em condições – SPF (Livre de patógenos específicos). Este estudo foi realizado de acordo com as recomendações do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório dos Institutos Nacionais de Saúde. O protocolo foi aprovado pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FCF protocolo 513/16).

### 3.4 Extração das proteínas da cepa *S. brasiliensis* 5110

Para a obtenção das proteínas da cepa de *S. brasiliensis* 5110 foi utilizado o protocolo de DA FONSECA et al. (2001), com algumas modificações. A cepa *S. brasiliensis* 5110 foi cultivada por 5 dias a 37°C em ágar BHI e as colônias foram transferidas para um cadinho estéril. Foi utilizado nitrogênio líquido para quebrar a parede do fungo e assim extrair as proteínas. O material fúngico obtido foi homogeneizado com um tampão de reidratação de gel (7 M Ureia, 2 M Tioúreia, 4% CHAPS, 0,4% Triton X-100, 40 mM DTT, 0.5% Pharmalyte), em seguida foi centrifugado (11000 × g, 4°C, 10 minutos (min)) e o sobrenadante recolhido, esse procedimento foi realizado por duas vezes. A dosagem proteica foi realizada pelo método de *Bradford* (Sigma), e como padrão o BSA, todos os procedimentos foram realizados de acordo com o fabricante.

### 3.5 Obtenção do soro policlonal

Foram utilizados dois grupos, de 5 camundongos BALB/c cada, infectados com  $5 \times 10^6$  de leveduras da cepa *S. brasiliensis* 5110 ou com PBS estéril, em um inóculo de 200  $\mu$ L, intraperitonealmente. Após 21 dias o sangue dos camundongos foi coletado em uma punção intracardiaca e centrifugado (10000 x g, 4°C, 10 min) para separação do soro. Os soros foram estocados à temperatura de -20°C até o momento do uso.

### 3.6 Eletroforese 2D das proteínas da cepa *S. brasiliensis* 5110 e western blot utilizando o soro policlonal

Para a focalização isoeletrica, fitas *Immobiline* de 7 cm com pH 3-10 (GE Healthcare), foram hidratadas *overnight* com 125  $\mu$ L de tampão de reidratação de gel com a proteínas do fungo (250  $\mu$ g de proteína/fita) e focalizadas no sistema *Ettan IPGphor 3* (GE Healthcare), sob as seguintes condições: 300V/200Vh; 1000V/300Vh; 5000V/4000Vh; 5000V/1250Vh. Após a focalização isoeletrica, as fitas foram reduzidas com DTT 1% (m/v) seguido de Iodoacetamida 2,5% (m/v) em tampão de equilíbrio (Ureia 6 M, Tris-HCl pH 8,8 75 mM, Glicerol 29,3% (v/v) SDS 2% (m/v)) durante 15 minutos cada. A segunda dimensão foi realizada por uma corrida eletroforética em géis de poliacrilamida 12%. As fitas *Immobiline* foram colocadas sobre os géis de poliacrilamida e selados com agarose 0,5%. A eletroforese ocorreu sob as seguintes condições: 80V/30 minutos + 200V/75 minutos. Após esta etapa, os géis foram fixados em solução 50% metanol com 10% ácido acético e corados com *coomassie blue* R 350 (GE Healthcare) ou por prata através do *silver staining Kit* (GE Healthcare), de acordo com o fabricante. A massa molecular das proteínas foi estimada utilizando-se um padrão de peso molecular de 5-250 kDa (*PageRuler Unstained* Thermo Scientific). Os géis corados foram escaneados pelo *ImageScanner III* com o *software LabScan Tm* (v6.0, GE Healthcare). As imagens foram analisadas pelo *ImageMaster 2D Platinum* para a determinação e numeração dos *spots*.

No *western blot*, as proteínas separadas eletroforeticamente no gel 2D, foram então transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare). A transferência foi realizada a 60 mA por 1 horas em tampão de transferência (25 mM Tris, 96 mM glicina, pH 8,3 e metanol 20%), na unidade de transferência *TE 70 PWR Semi-dry transfer unit* (GE Healthcare). Depois da transferência, a membrana foi bloqueada com 5% de leite desnatado em tampão fosfato salino com 0,05% de Tween 20 (PBS-T) por 2 horas. Depois a membrana foi lavada com PBS-T e incubada com soro policlonal de camundongos controles ou de camundongos infectados, já descrito anteriormente, na diluição 1:200 ou com 20  $\mu$ g do mAbP6E7 *overnight* na temperatura de 4°C, sob agitação constante. A membrana foi

então lavada em PBS-T 3 vezes por 10 minutos cada e incubada com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a HRP (Santa Cruz *biotechnology*) na diluição de 1:5000 por 2 horas. Depois de lavada, a membrana de nitrocelulose foi revelada com o kit ECL (Invitrogen).

### 3.7 Sequenciamento dos peptídeos

A partir *western blot* foram cortados do gel, corado com *coomassie blue* R 350, os *spots* na região próxima aos *spots* presentes no *western blot* (Foram utilizados 4 géis para ter uma boa concentração de proteínas no *spot*) e adicionado em microtubos de 1,5 mL com água Milli-Q. Os próximos procedimentos foram realizados no CEFAP – BIOMASS (Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa) localizado no ICB-USP. Os *spots* foram descorados com 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  em 50% de acetonitrila seguido de uma solução 100% de acetonitrila. Posteriormente as proteínas foram digeridas com 12,5 ng/L de tripsina (Roche Molecular *Biochemicals*) em uma solução com 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  *overnight* por 37°C. O sobrenadante de cada *spot* foi coletado e purificado na *Milipore Zip-Tip C18 pipette tips* e adicionado na *MALDI target plate*, misturado com *matrix  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-trans-cinnamic acid* (Sigma) e armazenado em temperatura ambiente. As amostras foram analisadas no aparelho *Autoflex TOF/TOF* (Bruker) com o *software Bruker Daltonics flexAnalysis*. Os quatro picos mais intensos foram selecionados e identificados no programa *Pattern Lab Proteomics* (CARVALHO et al., 2016). Foi utilizado o proteoma da cepa *S. brasiliensis* 5110 (TEIXEIRA, M. M. et al., 2014). A base de dados de contaminantes e procedimentos de análise foi utilizada de acordo com o sistema. Os parâmetros de identificação incluem modificações variáveis de oxidação (M) e modificações fixas da metilação da carbamida (C).

### 3.8 Seleção dos peptídeos por meio do acoplamento na molécula de MHC de classe II

As sequências peptídicas das proteínas identificadas foram analisadas nos programas de predição com a molécula de MHC de classe II de camundongos BALB/c. Foram utilizados 2 programas, o *IEDB Analysis Resource* e o *PREDBALB/c* (ZHANG, G. L. et al., 2005; WANG et al., 2008; WANG et al., 2010). No *IEDB Analysis Resource* as ferramentas utilizadas foram a *SMM align method (stabilization matrix alignment method)* e *NN align method (neural network-based method)* (NIELSEN; LUNDEGAARD; LUND, 2007; NIELSEN; LUND, 2009). Sendo que quanto menor o número, nas escalas SMM e NN, maior a afinidade, desse modo valores <50 nM são considerados de alta afinidade, <500 nM são considerados de afinidade intermediária e <5000 nM de baixa afinidade. No

*PRED*BALB/c quanto maior o número, maior será a afinidade do peptídeo com o MHC de classe II, os valores vão de 0 a 10, para a análise foram escolhidos apenas os peptídeos com valores iguais ou maiores de 9,5. Os peptídeos que demonstraram um alto grau de acoplamento com o MHC de classe II em ambos os programas, foram sintetizados pela *Life Technologies* para os ensaios de proliferação.

### 3.9 Proliferação celular

Dois camundongos BALB/c foram infectados, intraperitonealmente com  $5 \times 10^6$  leveduras, da cepa *S. brasiliensis* 5110 por 21 dias. O baço foi removido, após eutanásia na câmara de CO<sub>2</sub>. O baço foi macerado em 1 mL de PBS e filtrado em *cell strainer* de 70 µm (BD Falcon). O pool de células foi centrifugado (500 x g, 4°C, 5 min) e o sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspensionado em 1 mL de tampão hemolítico, para lise das hemácias. As células foram marcadas com *5(6)-carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester* (CFSE) de acordo com o fabricante (*Life Technology*). Posteriormente, foi plaqueado  $3 \times 10^5$  de células em um volume de 200 µL de meio R10 suplementado (RPMI com 5% soro fetal bovino (SFB), com 1% de Aminoácidos Não Essenciais – (MEM NEAA (Gibco)) e 1mM Piruvato de Sódio (Gibco)) em placa de 96 poços de fundo U (Costar, 3799). As células foram estimuladas com 5 µg dos peptídeos diluídos em PBS (ZR1, ZR4, ZR5, ZR6 e ZR7) e diluídos em DMSO (ZR3 e ZR8). Como controle negativo foi utilizado células sem marcação, com 5 µL de PBS, com 5 µL de DMSO e como controle positivo 5 µL de fitohemaglutinina (PHA). A placa foi incubada por 5 dias (37°C, com 5% CO<sub>2</sub>). Após os 5 dias as células foram centrifugadas (500 x g, 4°C, 5 min), os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados a -20°C até o momento do uso, as células ressuspensionadas em 200 µL PBS e transferidas em tubos de citometria. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FACSCantoII, BD) e a análise pelo *software FlowJo*. A proliferação foi determinada pela diminuição da intensidade de fluorescência do CFSE. Foram adquiridos 100.000 eventos. Para distinguir células auto fluorescentes de células que expressam poucas concentrações de marcadores de superfície, utilizamos a metodologia de *fluorescence-minus-one* (FMO) (ROEDERER, 2001). Foi dosado as citocinas IFN-γ e IL-17A, no sobrenadante recolhido das placas, por ELISA de acordo com o fabricante (R&D Systems kits).

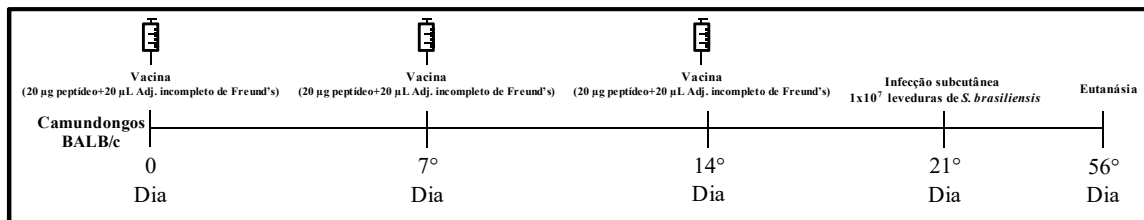
### 3.10 Imunização com leveduras de *S. brasiliensis* 5110 morto por calor

Foi realizado uma imunização com a cepa *S. brasiliensis* 5110 morto por calor (*S. brasiliensis Heat Killed*). Um tubo de *S. brasiliensis* 5110, cultivado por 7 dias a 37°C em

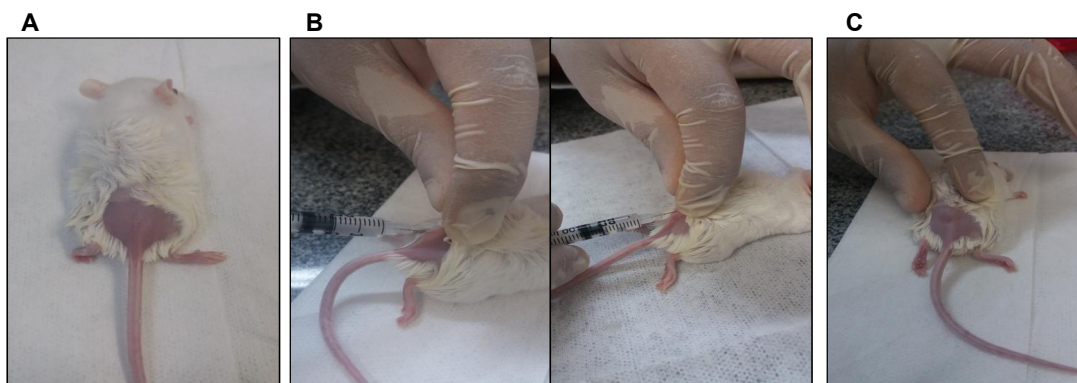
Ágar-BHI (BD Difco), foi diluído em 5 mL de PBS estéril e foi autoclavado (121°C por 30 minutos). Posteriormente foi ajustado na concentração de  $5 \times 10^7$  leveduras, através da contagem em câmara de Neubauer. Foram plaqueados inóculos de 100  $\mu$ L da solução com o fungo autoclavado, em placas de Ágar-BHI, para a confirmação da morte do fungo. Foram utilizados dois grupos, de 15 camundongos BALB/c cada. Nos dias 0 e 7º dia grupo controle recebeu 0,2 mL de PBS estéril intraperitonealmente e o grupo tratado recebeu  $5 \times 10^7$  de leveduras de *S. brasiliensis* 5110 mortas por calor em 0,2 mL de PBS estéril intraperitonealmente. No 14º dia ambos os grupos foram infectados  $5 \times 10^6$  de leveduras vivas de *S. brasiliensis* 5110 (ATCC MYA - 4823) em 0,2 mL de PBS estéril intraperitonealmente. Foram eutanasiados, na câmara de CO<sub>2</sub>, 5 camundongos de cada grupo no 7º, 14º e 21º dias após a infecção. O baço e o fígado destes animais foram retirados para avaliação da infecção pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e dosagem de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-17A e IFN- $\gamma$ ).

### 3.11 Vacinação e infecção dos camundongos

Foram utilizados 3 peptídeos nos ensaios *in vivo* (ZR3, ZR4 e ZR8) e os respectivos controles (PBS e DMSO). Foi utilizado 7 camundongos BALB/c por grupo, sendo inoculado 20  $\mu$ g de cada peptídeo misturados com o adjuvante incompleto de Freund's (Sigma) na diluição 1:1 em um volume final de 40  $\mu$ L, o mesmo foi feito no grupo controle (PBS e DMSO). A imunização foi intramuscular, na coxa, 3 vezes em intervalos de 7 dias (**Figura 2**). Após 7 dias da última imunização, camundongos BALB/c foram infectados no tecido subcutâneo do dorso, com  $1 \times 10^7$  de leveduras da cepa *S. brasiliensis* 5110 (**Figura 3**). A partir do décimo dia de infecção, a cada 5 dias, foram pesados os camundongos e, com o auxílio de um paquímetro, foi medido o diâmetro das lesões formadas pelo fungo. Após 35 dias de infecção os camundongos foram eutanasiados na câmara de CO<sub>2</sub>. Foram retirados as lesões, baços, fígados, linfonodos e rins de cada camundongo. Os órgãos foram diluídos em 1 mL de PBS e macerados. O macerado dos órgãos foram plaqueados em ágar BHI a 25°C por 7 dias e a carga fúngica foi avaliada pelas unidades formadoras de colônia (UFC). Após a avaliação da carga fúngica, o macerado da lesão, baço e linfonodo foram centrifugados (500 x g, 4°C, 10 min), o sobrenadante foi recolhido para a dosagem de citocinas, e o *pellet* ressuspensionado para a avaliação do perfil celular.



**Figura 2. Protocolo de vacinação e infecção com a cepa *S. brasiliensis* 5110.** Camundongos BALB/c foram divididos em 5 grupos (ZR3, ZR4, ZR8, PBS e DMSO) de 7 camundongos cada. No dia zero, 7º dia e 14º dia os camundongos receberam intramuscularmente, na coxa, 40 µL de vacina (20 µg de peptídeo ou 20 µL de PBS ou 20 µL de DMSO + 20 µL de adjuvante incompleto de Freund's). No 21º dia os camundongos foram infectados com  $1 \times 10^7$  de leveduras da cepa *S. brasiliensis* 5110 no tecido subcutâneo. Após 35 dias de infecção, no 56º dia, os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> para a avaliação da carga fúngica, perfil celular e produção de citocinas na lesão, baço, fígado, linfonodo e rim.

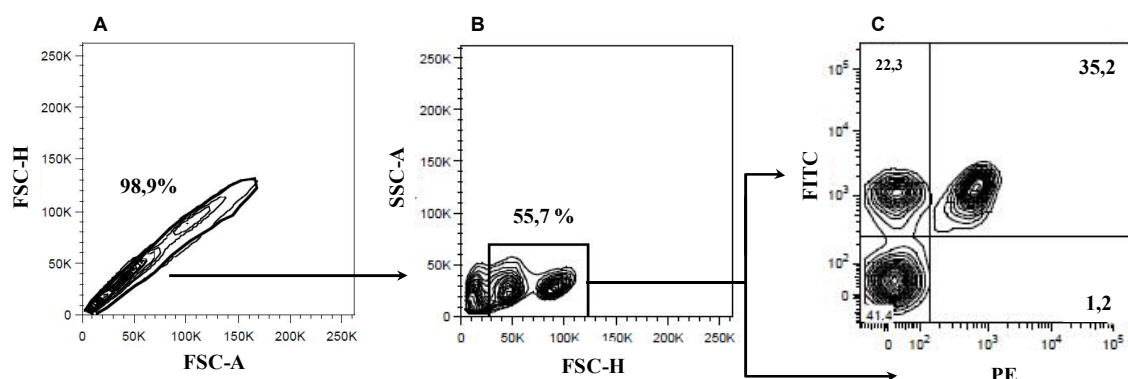


**Figura 3. Infecção subcutânea com a cepa *S. brasiliensis* 5110.** Camundongos BALB/c foram divididos em 5 grupos (ZR3, ZR4, ZR8, PBS e DMSO) de 7 camundongos cada. No dia 0, 7º dia e 14º dia os camundongos receberam intramuscularmente, na coxa, 40 µL de vacina (20 µg de peptídeo/ 20 µL de PBS ou DMSO + 20 µL de adjuvante incompleto de Freund's). No 21º dia os camundongos BALB/c foram infectados com  $1 \times 10^7$  de leveduras da cepa *S. brasiliensis* 5110 no tecido subcutâneo. (A) Foi retirado os pelos do dorso dos camundongos BALB/c. (B) Na infecção, com os dedos foi levantado a pele do camundongo, e com uma seringa de 1 mL foi inoculado  $1 \times 10^7$  de leveduras da cepa *S. brasiliensis* 5110 em 200 µL de PBS estéril. (C) Um nódulo se formou no local da inoculação do fungo.

### 3.12 Perfil celular induzido pelos peptídeos

O *pellet* dos macerados da lesão, baço e linfonodo foram ressuspensos em 1 mL de tampão hemolítico, para lise das hemácias. As células foram contadas na câmara de Neubauer, utilizando a solução azul de Trypan, e ajustadas na concentração de  $1 \times 10^6$  para a marcação com anticorpos. No baço e linfonodo foi determinado o número total de CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> com os anticorpos PE CD4 (GK 1.5), FITC CD3 (145-2C11), PE-Cy7 CD8 (53-6.7) e APC-Cy5 CD19 (1D3). Na lesão foi determinado o número total de GR1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> com os anticorpos APC GR1 (RB6-8C5) e FITC CD11b (m1/70). Todos os anticorpos são da *BD Bioaciences*. As células foram incubadas por 30 minutos no

escuro a 4°C. Após a incubação, foram realizadas 3 lavagens com PBS com 3% de SFB. Em seguida as células foram ressuspensas e adquiridas por citômetro de fluxo (FACSCantoll, BD) e a análise pelo software *FlowJo*. A análise dos dados foi inicialmente baseada no perfil de dispersão frontal/tamanho relativo (FSc), para parâmetros de altura (H) *versus* área (A) (FSC-H X FSC-A). A finalidade de tal estratégia é a eliminação dos *doublets* - células que ao serem adquiridas pelo citômetro passam de forma agrupada. A exclusão é feita pela seleção das células a serem analisadas por meio de um *gate* (**Figura 4A**). Após a exclusão dos *doublets*, as células foram analisadas quanto ao perfil de dispersão lateral do feixe luminoso/granulosidade relativa (SSc) *versus* FSc (SSc X FSc), afim de analisar granulosidade e tamanhos relativos das populações. Dessa forma o perfil celular foi selecionado pela inserção de um novo *gate* que delimita a população a ser analisada (**Figura 4B**). A partir desse *gate* as populações específicas foram determinadas de acordo com a positividade para os marcadores específicos da população de interesse (**Figura 4C**). Foram adquiridos 100.000 eventos. Para distinguir células auto fluorescentes de células que expressam poucas concentrações de marcadores de superfície, utilizamos a metodologia de *fluorescence-minus-one* (FMO) (ROEDERER, 2001).



**Figura 4. Estratégia de gate.** A imagem é representativa a uma das análises de fenotipagem realizadas no presente trabalho. (A) Exclusão dos *Doublets*. (B) Seleção do perfil celular a ser analisado. (C) Determinação da população a ser analisada pela análise dos marcadores (Demonstrados na figura os marcadores para FITC e PE).

### 3.13 Níveis de citocinas

A partir do sobrenadante dos órgãos, lesão, baço e linfonodo foram avaliados os níveis das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-17A e IL-1 $\beta$  pelo método de ELISA, de acordo com o fabricante (R&D Systems kits).

### 3.14 Análise estatística

Foi utilizado o Prism 5 *software* (GraphPad *software* Inc) em todos os gráficos e as diferenças foram consideradas significantes quando  $p \leq 0,05$ . Os resultados foram expressos com o desvio padrão. A análise estatística foi realizada usando o ANOVA seguido do teste paramétrico de t'test (INSTAT *software*: GraphPad) e *One-way* ANOVA seguido do teste de Tukey para calcular a significância estatística.

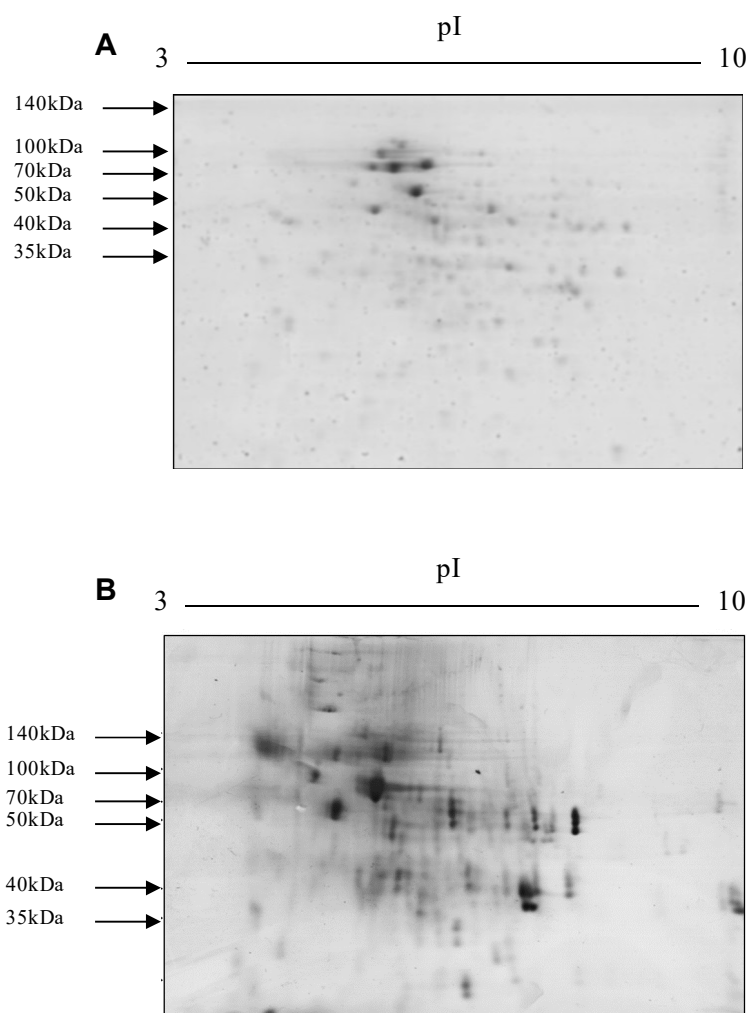
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Proteoma da cepa *S. brasiliensis* 5110 e as proteínas

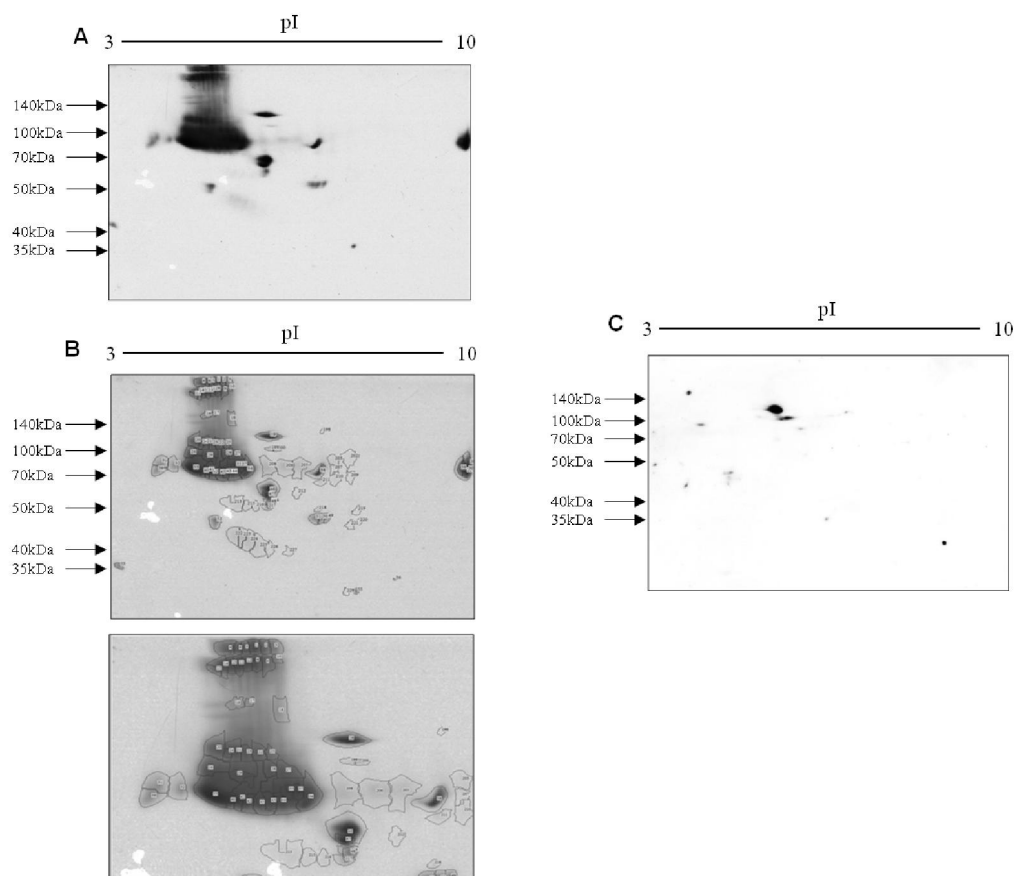
Para avaliar o proteoma da cepa *S. brasiliensis* 5110, 250 µg de proteínas foram fracionadas por eletroforese 2D. O gel 2D foi corado por *coomassie blue* ou prata e observamos a presença de 95 e 130 *spots* nos géis, respectivamente (**Figura 5A e 5B**). Os *spots* se concentraram entre 100 a 40 kDa, aproximadamente, com o pI (Ponto isoeletrico) de 4-6. Esses resultados são semelhantes aos observados em outras espécies de *Sporothrix* spp. com diferentes protocolos de extração de proteína (RUIZ-BACA et al., 2011; RUIZ-BACA et al., 2014; RODRIGUES et al., 2015b).

A análise de *western blot* revelou 53 *spots* no proteoma de *S. brasiliensis* 5110 ao utilizarmos o soro de camundongos infectados. A maior parte dos *spots* ficaram entre 140 e 70 kDa com um pI de 4-6 (**Figura 6A**). O soro do controle mostrou poucos *spots* com baixa reatividade (dados não mostrados). A avaliação e contagem dos *spots* foi feita no programa *ImageMaster 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare) (**Figura 6B**). Observamos isoformas na altura de 100 kDa, que já foi demonstrada em *S. brasiliensis* e em outras espécies do *Sporothrix* spp. (RUIZ-BACA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2015b). Em contraste com o soro de camundongo infectado, o soro de pacientes com esporotricose, revelou 11 *spots* no proteoma de *S. brasiliensis* (cepa CBS 132990) na faixa de 91 a 36 kDa (RODRIGUES et al., 2015b).

O *western blot* realizado com o mAbP6E7 identificou a GP70 no proteoma de *S. brasiliensis* 5110, com aproximadamente 100 kDa e com o pI de 5-6 (**Figura 6C**). Foi descrito a presença da GP70, com o mAbP6E7, no exoantígeno do *S. brasiliensis* 5110 com o peso molecular similar (DE ALMEIDA, J. R. F. et al., 2015). Já foi observado a presença da GP70 em outras espécies de *Sporothrix* spp. na eletroforese 2D, também com o pI 5-6 (RUIZ-BACA et al., 2014). O aumento de peso molecular da GP70, de 70 kDa para aproximadamente 100 kDa, observado na cepa *S. brasiliensis* 5110, pode ser devido ao maior nível de glicosilação que a espécie *S. brasiliensis* apresenta na GP70, quando comparada a *S. schenckii* (CASTRO et al., 2013). Já foram demonstradas outras diferenças na GP70 entre as espécies *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, como o fato da GP70 estar em baixos níveis na parede na espécie *S. brasiliensis* quando comparada com a *S. schenckii* (CASTRO et al., 2013).



**Figura 5. Eletroforese 2D do proteoma da cepa *S. brasiliensis* 5110 corado por coomassie blue e prata.** As colônias da cepa *S. brasiliensis* 5110 foram transferidas para um cadinho e o fungo foi submetido à extração do seu antígeno total com auxílio de nitrogênio líquido. O material fúngico obtido foi homogeneizado com um tampão de reidratação de gel. Foi realizado a eletroforese 2D com as proteínas do fungo. As proteínas do fungo foram fracionadas em duas dimensões, a primeira dimensão foi em uma fita *Immobiline* de 7 cm com pH 3-10 e na segunda dimensão foi realizado uma eletroforese em gel de SDS-PAGE 12%. Os géis foram corados com (A) coomassie blue R 350 ou (B) coloração de prata.



**Figura 6. Proteínas da cepa *S. brasiliensis* 5110.** Após a eletroforese 2D das proteínas do fungo em um gel de SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose para a realização do *western blot*. **(A)** Foi utilizado o soro policlonal, de camundongos infectados com a cepa *S. brasiliensis* 5110 por 21 dias, como anticorpo secundário. **(B)** A análise desses *spots* foi feito pelo programa *ImageMaster 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare). **(C)** *Western blot* com o mAbP6E7, como anticorpo secundário

#### 4.2 Identificação das proteínas da cepa *S. brasiliensis* 5110 e a predição dos peptídeos na molécula de MHC de classe II

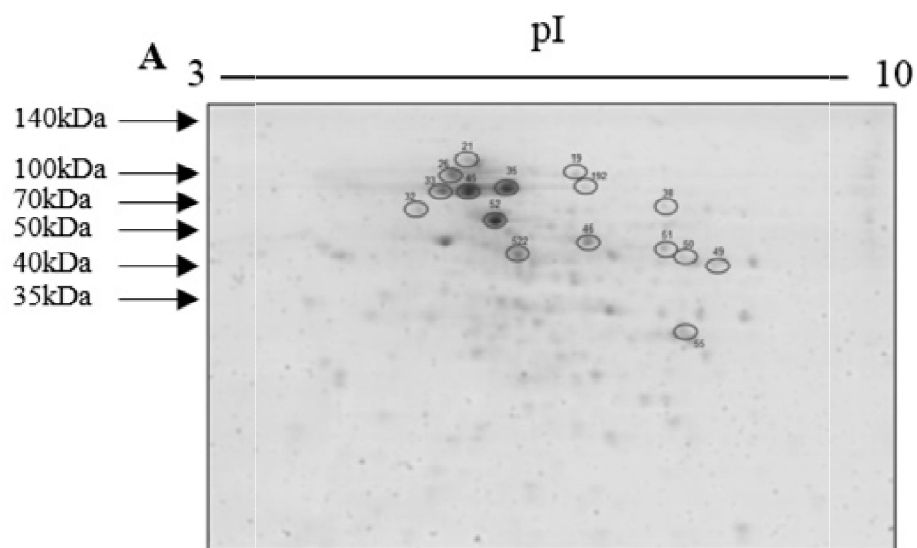
Do total de 53 *spots* encontrados no *western blot* apenas 16 *spots* foram capazes de serem retirados do gel 2D corado por *coomassie blue* (**Figura 7A**). Infelizmente não foi possível sobrepor corretamente os *spots* do *western blot* sobre o gel corado pelo *coomassie blue*, para termos uma melhor exatidão que o *spot* cortado seria correspondente a uma proteína imunogênica presente no *western blot*. Dessa forma, foram retirados os *spots*, com uma boa coloração de *coomassie blue* do gel, nas regiões próximas aos *spots* do *western blot*.

A identificação dos *spots* foi feita por espectrometria de massa, utilizando o genoma da cepa *S. brasiliensis* 5110, que possui cerca de 9000 proteínas (TEIXEIRA, M. M. et al., 2014). Foi identificadas 34 proteínas da cepa *S. brasiliensis* 5110, apenas 2 *spots* não foram capazes de serem identificados (**Tabela 1**). Infelizmente não foi possível cortar a GP70 do gel 2D corado por *coomassie blue*, apesar da presença dela ter sido comprovada no *western blot* com o mAbP6E7. As proteínas identificadas estão relacionadas a diversas funções como virulência, atividades metabólicas ou com função desconhecida. A enolase é uma proteína relacionada à virulência e ao escape frente ao sistema imune, já identificada em *S. schenckii* (PORTUONDO et al., 2016). As proteínas de choque térmico (*Heat-shock*) são responsáveis pelo dimorfismo térmico, permitindo a sobrevivência do fungo no tecido do hospedeiro (BURNIE et al., 2006; BROWN, A. J.; LEACH; NICHOLLS, 2010). Já foi observado a expressão da proteína de choque térmico, de 70 kDa, na superfície de *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, sendo que o mutante para esta proteína apresentou virulência significativamente atenuada (ZHANG, S. et al., 2006; SUN et al., 2010).

Foi feito uma predição para acoplamento com a molécula de MHC de classe II de BALB/c com todas as sequências peptídicas, das 34 proteínas identificadas da cepa *S. brasiliensis* 5110. Aproximadamente 60 sequências peptídicas de no máximo 16 aminoácidos, foram consideradas com chances intermediárias/altas de acoplamento ao MHC de classe II, de acordo com os parâmetros descritos nos materiais e métodos. Desses 60 peptídeos, foram selecionadas os 7 com as chances mais altas de acoplamento (**Tabela 2**). Uma das sequências peptídicas é da proteína importina, que está envolvido com atividades metabólicas como o transporte de moléculas para o núcleo. Os outros peptídeos sintetizados são de proteínas com função desconhecida.

Foi também sintetizado um peptídeo da GP70 pelo fato de estar presente no proteoma do fungo e ser o principal componente antigênico do *Sporothrix* spp. (NASCIMENTO; ALMEIDA, 2005; NASCIMENTO et al., 2008; DE ALMEIDA, J. R. F. et al., 2015; CHEN et al., 2017). Na análise dos peptídeos da GP70, pelos programas de predição,

foi observado que nenhuma sequência péptica demonstrou um alto grau de acoplamento ao MHC de classe II. A sequência peptídica LKFLALASVISATSA (ZR8) foi selecionada para síntese, por ser a com maiores chances de acoplamento.



**Figura 7. Os 16 spots selecionados para o sequenciamento.** Um gel de poliacrilamida 12% do proteoma da cepa *S. brasiliensis* 5110 corado por *coomassie blue* foi utilizado para a excisão dos spots selecionados para o sequenciamento (circulados em preto). Um total de 4 géis foram utilizados para a excisão dos spots que foram armazenados em microtubos com água Milli-Q. O sequenciamento foi realizado no CEFAP – BIOMASS (Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa) localizado no ICB-USP.

| Spots        | Proteínas                                         | Cobertura | Massa teórica | Massa experimental |
|--------------|---------------------------------------------------|-----------|---------------|--------------------|
| <b>ZR19</b>  | <i>Aconitate hydratase</i>                        | 1,90 %    | 85 kDa        | 100 kDa            |
|              | <i>RalA-binding protein 1</i>                     | 0,62 %    | 155 kDa       |                    |
| <b>ZR21</b>  | <i>Heat shock 70kDa protein 4</i>                 | 1,11 %    | 80 kDa        | 120 kDa            |
| <b>ZR26</b>  | <i>Major facilitator superfamily transporter</i>  | 1,33 %    | 60 kDa        | 100 kDa            |
|              | <i>Molecular chaperone HtpG</i>                   | 5,51 %    | 80 kDa        |                    |
| <b>ZR32</b>  | <i>Hypothetic protein 1</i>                       | 0,86 %    | 100 kDa       | 70 kDa             |
|              | <i>Hypothetic protein 2</i>                       | 0,85 %    | 125 kDa       |                    |
| <b>ZR33</b>  | <i>Nuclear migration protein</i>                  | 0,68 %    | 160 kDa       | 90 kDa             |
| <b>ZR35</b>  | <i>C6 zinc finger domain containing protein</i>   | 1,13 %    | 130 kDa       | 90 kDa             |
|              | <i>Molecular chaperone DnaK</i>                   | 4,30 %    | 75 kDa        |                    |
|              | <i>Importin</i>                                   | 1,18 %    | 100 kDa       |                    |
|              | <i>Hypothetic protein</i>                         | 2,22 %    | 80 kDa        |                    |
| <b>ZR38</b>  | <i>Hypothetic protein</i>                         | 0,86 %    | 100 kDa       | 80 kDa             |
|              | <i>RalA-binding protein 1</i>                     | 0,62 %    | 155 kDa       |                    |
| <b>ZR45</b>  | <i>Heat shock 70kDa protein 1/8</i>               | 5,92 %    | 70 kDa        | 90 kDa             |
| <b>ZR46</b>  | <i>Hypothetic protein 1</i>                       | 3,88 %    | 40 kDa        | 50 kDa             |
|              | <i>Hypothetic protein 2</i>                       | 4,49 %    | 30 kDa        |                    |
|              | <i>Aldehyde dehydrogenase (NAD+)</i>              | 4,25 %    | 55 kDa        |                    |
| <b>ZR49</b>  | <i>Cop9 subunit</i>                               | 1,46 %    | 60 kDa        | 45 kDa             |
|              | <i>Hypothetic protein</i>                         | 0,95 %    | 90 kDa        |                    |
| <b>ZR50</b>  | <i>Não identificado</i>                           | -         | -             | -                  |
| <b>ZR51</b>  | <i>Histidyl-tRNA synthetase</i>                   | 1,13 %    | 70 kDa        | 45 kDa             |
|              | <i>Hypothetic protein</i>                         | 2,85 %    | 55 kDa        |                    |
|              | <i>Mannose-1-phosphate Guanylyltransferase</i>    | 2,69 %    | 50 kDa        |                    |
|              | <i>Autophagy protein</i>                          | 0,61 %    | 120 kDa       |                    |
| <b>ZR52</b>  | <i>Não identificado</i>                           | -         | -             | -                  |
| <b>ZR55</b>  | <i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 2</i> | 1,32 %    | 65 kDa        | 30 kDa             |
|              | <i>Hypothetic protein</i>                         | 1,00 %    | 100 kDa       |                    |
|              | <i>ABC transport system ATP-binding protein</i>   | 0,91 %    | 93 kDa        |                    |
| <b>ZR192</b> | <i>Hypothetic protein</i>                         | 6,22 %    | 30 kDa        | 90 kDa             |
|              | <i>MFS transporter</i>                            | 1,77 %    | 60 kDa        |                    |
|              | <i>Glutamate synthase (NADPH/NADH)</i>            | 0,37 %    | 232 kDa       |                    |
|              | <i>Hypothetic protein1</i>                        | 4,41 %    | 140 kDa       |                    |
|              | <i>Hypothetic protein 2</i>                       | 0,95 %    | 90 kDa        |                    |
| <b>ZR522</b> | <i>Enolase</i>                                    | 3,42 %    | 50 kDa        | 45 kDa             |
|              | <i>Hypothetic protein</i>                         | 2,04 %    | 50 kDa        |                    |

**Tabela 1. As proteínas identificadas no genoma do *S. brasiliensis* 5110.** As 34 proteínas identificadas pelo do programa *PatternLab Proteomics*. Na análise foi utilizado o genoma da cepa *S. brasiliensis* 5110 (TEIXEIRA, M. M. et al., 2014).

| <b>Spot</b> | <b>Proteínas</b>            | <b>Smm</b> | <b>Nn</b> | <b>MHC</b> | <b>PREDBALB/c</b> | <b>Peptídeo</b>  | <b>Nome do peptídeo</b> |
|-------------|-----------------------------|------------|-----------|------------|-------------------|------------------|-------------------------|
| ZR55        | <i>Hypothetic protein</i>   | 85         | 28        | IAd        | 9,65              | TRLMEMLAAQAALSN  | <b>ZR1</b>              |
| ZR35        | <i>Importin</i>             | 158        | 88        | IAd        | 9,60              | QSHIMAMILSVQAAFP | <b>ZR3</b>              |
| ZR51        | <i>Hypothetic protein</i>   | 292        | 54        | IAd        | 9,66              | MSRTSSALKAVAAAET | <b>ZR4</b>              |
| ZR32        | <i>Hypothetic protein 1</i> | 199        | 499       | IAd        | 9,70              | QMIVRIRAQLAEASR  | <b>ZR5</b>              |
| ZR55        | <i>Hypothetic protein</i>   | 233        | 49        | IAd        | 9,57              | NEMRRRMMMESARDLE | <b>ZR6</b>              |
| ZR32        | <i>Hypothetic protein 2</i> | 336        | 13        | IAd        | 9,60              | SVASYVAMQAVMDASR | <b>ZR7</b>              |
| -----       | GP70                        | 1308       | 331       | IAd        | 8,98              | LKFLALASVISATSA  | <b>ZR8</b>              |

**Tabela 2. Os peptídeos selecionados para síntese.** Por meio dos programas *IEDB Analysis Resource* e *PREDBALB/c* foram sintetizados os 7 peptídeos com maiores chances de acoplamento com o MHC de classe II.

#### 4.3 Os peptídeos ZR3, ZR4 e ZR8 foram capazes de promover proliferação em células sensibilizadas com a cepa *S. brasiliensis* 5110

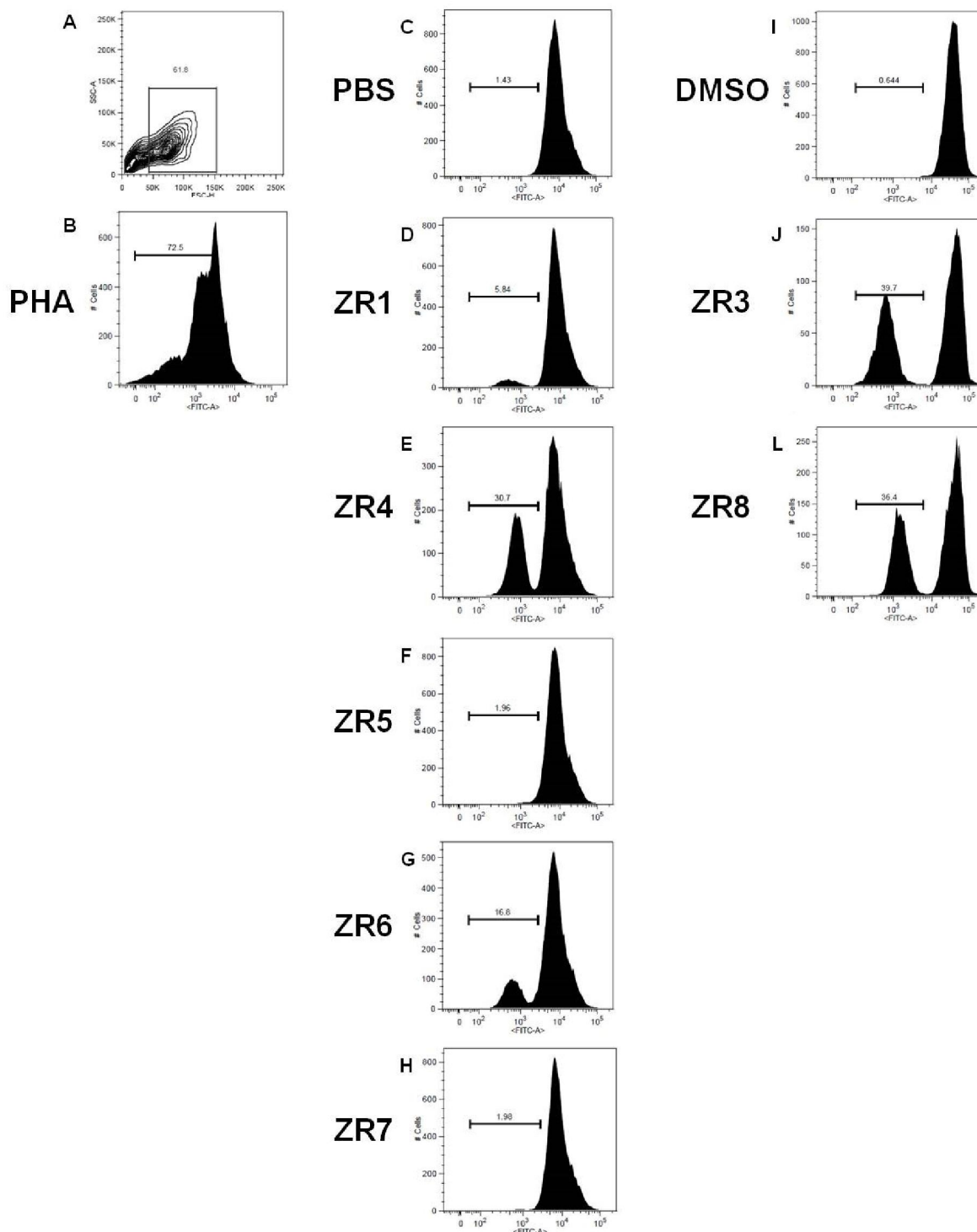
Para verificar se os peptídeos são capazes de promover uma resposta protetora na esporotricose, sendo assim candidatos à vacina, foi realizado o ensaio de proliferação celular. Somente os peptídeos que foram capazes de induzir expansão nas células sensibilizadas com o fungo *S. brasiliensis* foram utilizados *in vivo* como vacinas. A proliferação dessas células demonstra que o acoplamento dos peptídeos com a molécula de MHC de classe II foi eficiente e promoveu ativação dos linfócitos de memória gerados na infecção. As células esplênicas, de camundongos infectados, foram marcadas com CFSE e estimuladas por 5 dias com os peptídeos sintetizados e com os controles negativos (DMSO e PBS). Dos 7 peptídeos sintetizados, 5 peptídeos foram solúveis em PBS (ZR1, ZR4, ZR5, ZR6 e ZR7) e 2 peptídeos foram solúveis em DMSO (ZR3 e ZR8). As células foram analisadas quanto ao perfil de dispersão (SSC X FSC), a fim de analisar granulidade e tamanhos relativos das populações (**Figura 8A**). Como controle positivo na proliferação celular foi utilizado a PHA (**Figura 8B**).

Apenas o peptídeo ZR4, entre os peptídeos solúveis em PBS, foi capaz de induzir uma alta proliferação celular (**Figura 8E**). O peptídeo ZR6 induziu uma baixa proliferação (**Figura 8G**). Os outros peptídeos solúveis em PBS ficaram similares ao controle (**Figura 8C, 8D, 8F e 8H**). O peptídeo ZR4 é de uma proteína de função desconhecida.

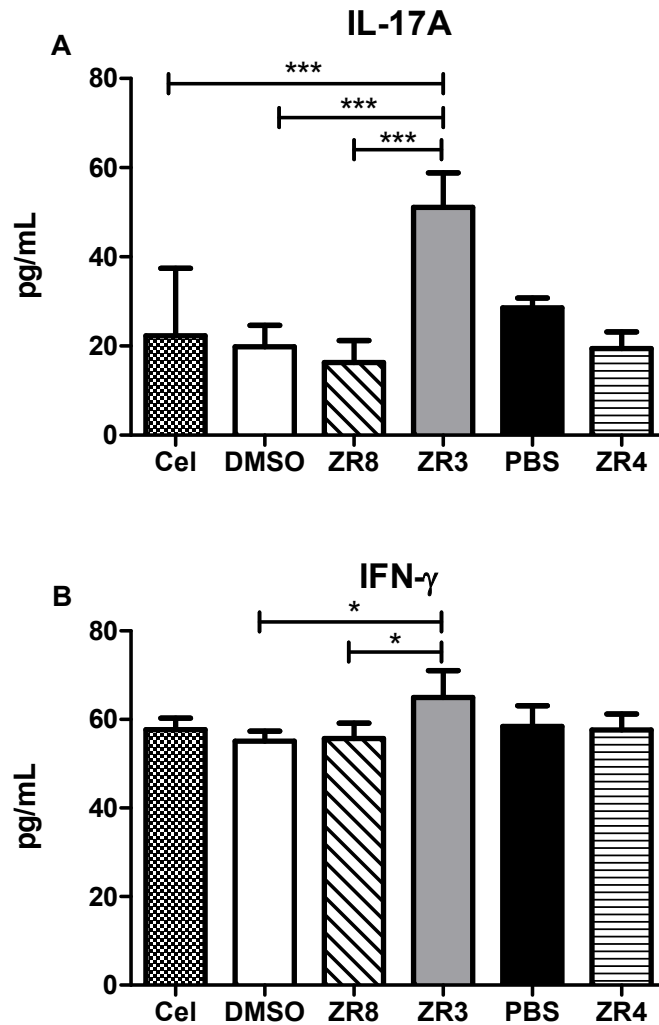
Os dois peptídeos solúveis em DMSO foram capazes de induzir alta proliferação celular, diferentemente do controle DMSO (**Figura 8I, 8J e 8L**). Como descrito anteriormente, foi sintetizado uma sequência de aminoácidos da GP70 (ZR8) pelo fato dessa proteína ser um dos principais antígenos do *Sporothrix* spp. (NASCIMENTO; ALMEIDA, 2005; NASCIMENTO et al., 2008; DE ALMEIDA, J. R. F. et al., 2015; CHEN et al., 2017). No presente trabalho demonstramos que um peptídeo da GP70 consegue induzir proliferação celular, em células sensibilizadas com o *S. brasiliensis*. Já foi confirmado o potencial de peptídeos da GP70 como uma vacina na esporotricose causada pela *S. globosa*, por meio de diferentes protocolos de predição (CHEN et al., 2017). RODRIGUES et al. (2015a), ao descreverem novos métodos de diagnósticos na esporotricose, sugerem que a GP70 seja um antígeno promissor para ser alvo de uma vacina. O peptídeo ZR3 é uma sequência da importina, proteínas com funções metabólicas que estão presentes em outros fungos patogênicos, podem ser potentes alvos para vacinas (GÖRLICH et al., 1994; ENENKEL; BLOBEL; REXACH, 1995; WÜTHRICH et al., 2015). Uma vacina com peptídeos da proteína de choque térmico, do fungo *Histoplasma capsulatum*, foi protetora na histoplasmose (SCHECKELHOFF; DEEPE, 2002). A calnexina, uma chaperona associada

ao *folding* de proteínas, foi capaz induzir proliferação em células sensibilizadas com diversos fungos patogênicos (WÜTHRICH et al., 2015).

Em infecções fúngicas, uma resposta Th1/Th17 é protetora pela secreção de citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17A que aumentam a atividade microbicida de neutrófilos e macrófagos (ROMANI, 2011). Durante o ensaio de proliferação celular verificamos os níveis de citocinas no sobrenadante. O peptídeo ZR3 induziu altos níveis de IL-17A e IFN- $\gamma$  (**Figura 9A e 9B**). Essa resposta é protetora na esporotricose (DE LIMA FRANCO et al., 2012; VERDAN et al., 2012; CHEN et al., 2017). Os peptídeos ZR8 e ZR4 induziram produção de níveis basais dessas citocinas na proliferação *in vitro*, apesar da alta expansão celular. Por meio desse experimento, demonstramos uma ativação de célula T induzida pelos peptídeos ZR3, ZR4 e ZR8, e uma resposta protetora Th1/Th17 induzida pelo peptídeo ZR3 *in vitro*.



**Figura 8. Ensaio de proliferação celular utilizando os peptídeos imunogênicos da cepa *S. brasiliensis* 5110.** Camundongos BALB/c foram infectados com  $5 \times 10^6$  de leveduras da cepa *S. brasiliensis* 5110 intraperitonealmente. No 21º dia os camundongos foram eutanasiados em câmara de  $\text{CO}_2$  para a retirada do baço. As células splênicas foram marcadas com CFSE, e foi avaliada a proliferação celular pela diminuição da intensidade de fluorescência. (A) Representativo da população adquirida, representativo de um grupo analisado. As células foram estimuladas pelos peptídeos sintetizados e controles durante 5 dias, sendo (B) o controle positivo phitoemaglutinina (PHA). Os estímulos do grupo PBS foram: (C) PBS, (D) ZR1, (E) ZR4, (F) ZR5, (G) ZR6, (H) ZR7. Os estímulos do grupo DMSO foram: (I) DMSO, (J) ZR3 e (L) ZR8. O resultado foi obtido por citometria de fluxo (FACSCANTO). Foram adquiridos 100.000 eventos. Representado 1 experimento de 3 experimentos independentes.



**Figura 9. Níveis das citocinas no sobrenadante do ensaio de proliferação celular.** Camundongos BALB/c foram infectados com  $5 \times 10^6$  de leveduras da cepa *S. brasiliensis* 5110 intraperitonealmente. No 21º dia os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> para a retirada do baço. As células esplênicas foram marcadas com CFSE, e foi avaliada a proliferação celular. As células foram estimuladas pelos peptídeos e controles durante 5 dias. Após 5 dias foi recolhido o sobrenadante e avaliado os níveis de citocinas por ELISA. As citocinas avaliadas foram (A) IL-17A e (B) IFN-γ. Representado 1 experimento de 3 experimentos independentes. Os resultados foram expressos com o desvio padrão. A análise estatística foi analisada pelo One-Way ANOVA, e múltiplas comparações pelo teste de Tukey. O nível de significância admitido foi de  $p < 0,05$ , sendo \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

#### 4.4 Imunização com leveduras mortas por calor da cepa *S. brasiliensis* 5110 induz uma resposta protetora e diminui a carga fúngica na esporotricose disseminada

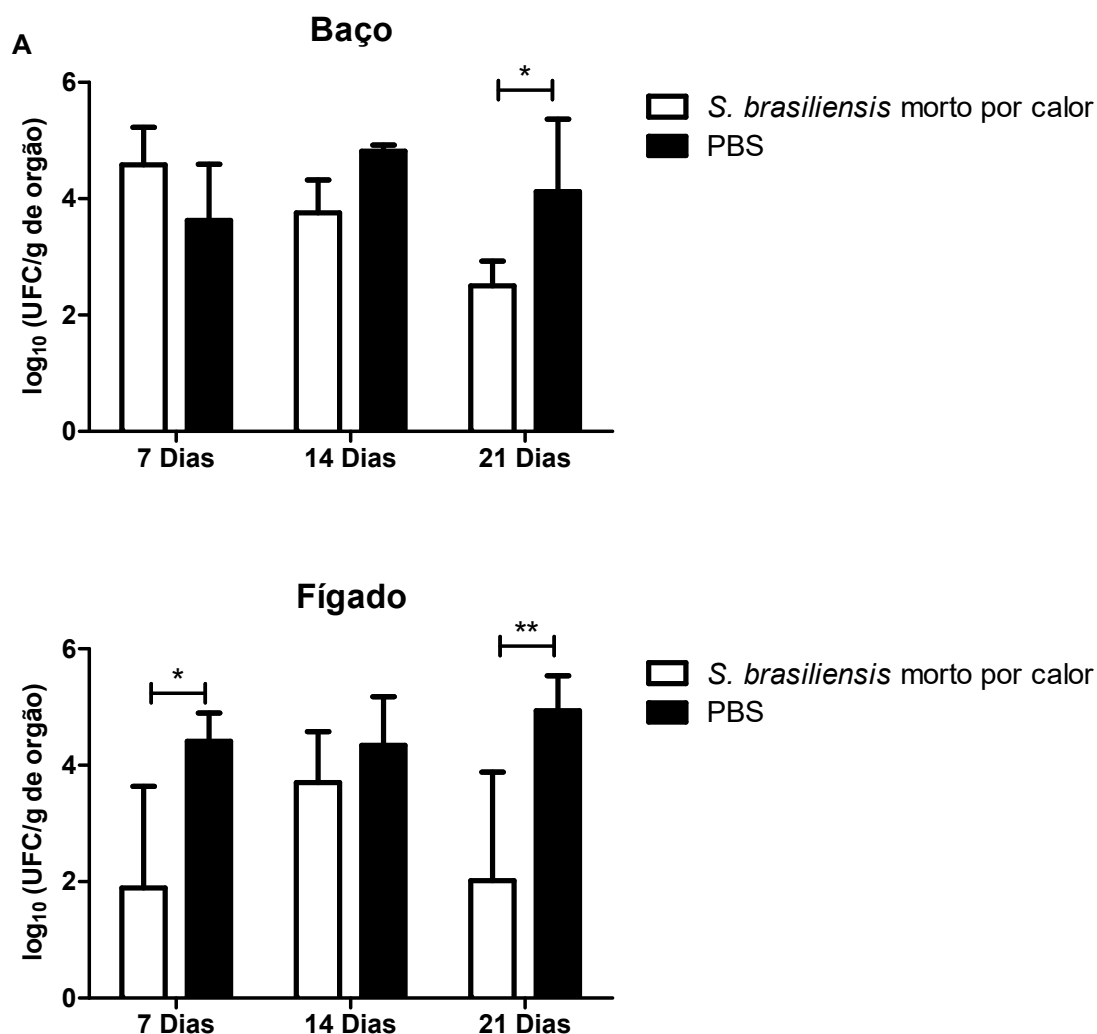
Antes de testar os peptídeos que foram capazes de proliferar células sensibilizadas com *S. brasiliensis*, padronizamos um modelo de proteção na esporotricose por meio de um perfil imunológico protetor induzido por uma memória imunológica. Desse modo os camundongos foram imunizados com o fungo morto por calor e avaliamos qual o perfil imunológico induzido contra a esporotricose.

A imunização com as leveduras mortas por calor foi capaz de reduzir a carga fúngica no baço e no fígado após 21 dias de infecção (**Figura 10A e 10B**). A redução da carga fúngica no fígado já pode ser observada após 7 dias de infecção, exibindo uma diferença maior em relação ao grupo não imunizado após 21 dias de infecção (**Figura 10A**). Já no baço a redução da carga fúngica só foi significativa após 21 dias de infecção em relação ao grupo não imunizado (**Figura 10B**). Já foi demonstrado que a imunização com fungos mortos por calor promove proteção ao hospedeiro (LIU et al., 2011; STEVENS; CLEMONS; LIU, 2011). Diversos mecanismos imunológicos justificam essa proteção, como o aumento da produção de anticorpos específicos, produção de citocinas pró-inflamatórias e maior infiltrado celular nos locais da infecção (LUO et al., 2014; HOWLADER et al., 2016; ISMAIL et al., 2016; UPADHYA et al., 2016).

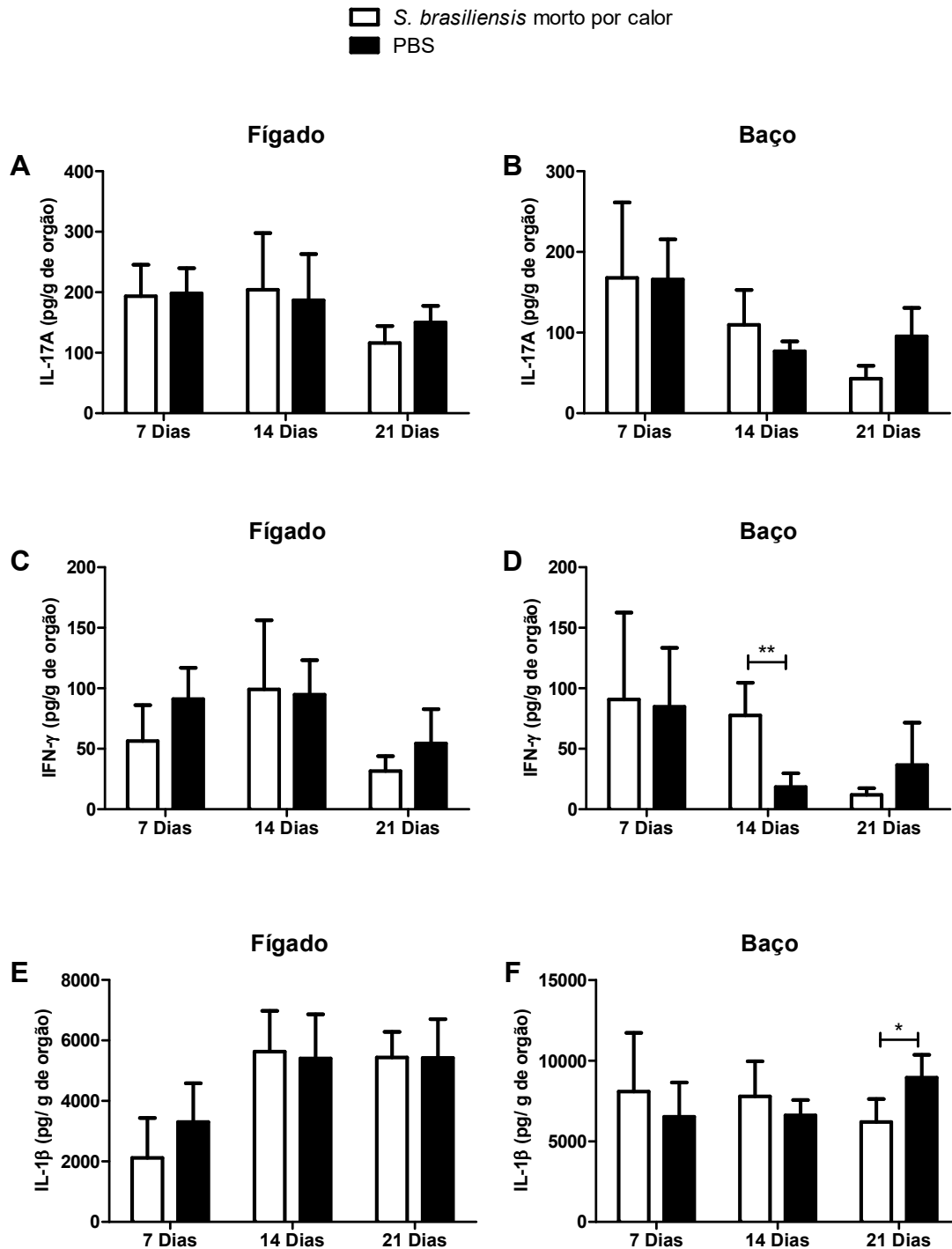
Foi avaliado os níveis de citocinas IL-17A, IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  no baço e no fígado para verificar se a resposta imunológica, induzida pela imunização, é a responsável pela redução da carga fúngica na esporotricose disseminada (**Figura 11**). Não foi observada diferença nos níveis de IL-17A entre os grupos em ambos os órgãos (**Figura 11A e 11B**). No baço dos camundongos imunizados houve um aumento nos níveis de IFN- $\gamma$  no 14º dia de infecção, e uma diminuição nos níveis de IL-1 $\beta$  no 21º dia de infecção (**Figura 11D e 11F**). No entanto, no fígado não foi observado diferença na produção dessas citocinas (**Figura 11C e 11E**).

Nosso grupo demonstrou um potencial virulento da cepa *S. brasiliensis* 5110 na esporotricose disseminada, com uma alta carga fúngica associada a níveis basais de citocinas (DE ALMEIDA, J. R. F. et al., 2015). No presente trabalho, os camundongos não imunizados apresentaram alta carga fúngica e baixos níveis IFN- $\gamma$ . Entretanto, a imunização com as leveduras mortas por calor promoveu um aumento na produção de IFN- $\gamma$  no 14º dia de infecção no baço, seguido da diminuição da carga fúngica no mesmo órgão no 21º dia de infecção. A produção de IFN- $\gamma$  esta associado com a diminuição da carga fúngica na esporotricose causada por *S. schenckii* (NASCIMENTO et al., 2008). A produção de IFN- $\gamma$ , juntamente com uma resposta Th1, é essencial para o hospedeiro frente a uma infecção fúngica (ROMANI, 2011).

No baço dos camundongos imunizados houve uma redução significativa da IL-1 $\beta$  juntamente com uma redução da carga fúngica no 21º dia de infecção. Acreditamos que a redução dos níveis de IL-1 $\beta$  no baço esteja relacionada com a menor presença do fungo nesse órgão, diferentemente do grupo não imunizado, onde a doença evoluiu cronicamente, exibindo alta carga fúngica e altos níveis de IL-1 $\beta$ . Em um modelo de paracoccidiodomicose foi demonstrado que os pulmões dos camundongos exibiram aumento significativo de IL-1 $\beta$  e um ligeiro infiltrado de macrófagos e neutrófilos, que são importantes no *clearance* do fungo. Após 4 semanas a IL-1 $\beta$ , aumentada anteriormente, teve seus níveis reduzidos juntamente com a redução da carga fúngica no pulmão (LOPERA et al., 2011).



**Figura 10. Carga fúngica na esporotricose disseminada após a imunização com leveduras da cepa *S. brasiliensis* 5110 mortas por calor.** Dois grupos de camundongos BALB/c ( $n = 15$  por grupo) foram imunizados com  $1 \times 10^7$  de leveduras da cepa *S. brasiliensis* 5110 mortas por calor em  $200 \mu\text{l}$  de PBS (Barra branca) ou com apenas  $200 \mu\text{l}$  de PBS estéril (Barra preta) intraperitonealmente no dia zero e 7º dia. No 14º dia os camundongos foram infectados com  $5 \times 10^6$  de leveduras da cepa *S. brasiliensis* vivas intraperitonealmente. Os camundongos foram sacrificados no 7º, 14º e 21º dias após a infecção. Foram retirados o baço e o fígado desses camundongos para a avaliação das unidades formadoras de colônias (UFC) no (A) baço e no (B) fígado. Representado 1 experimento de 3 experimentos independentes. Os resultados foram expressos com o desvio padrão. A análise estatística foi analisada pelo One-Way ANOVA, e múltiplas comparações pelo teste de Tukey. O nível de significância admitido foi de  $p < 0,05$ , sendo \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .



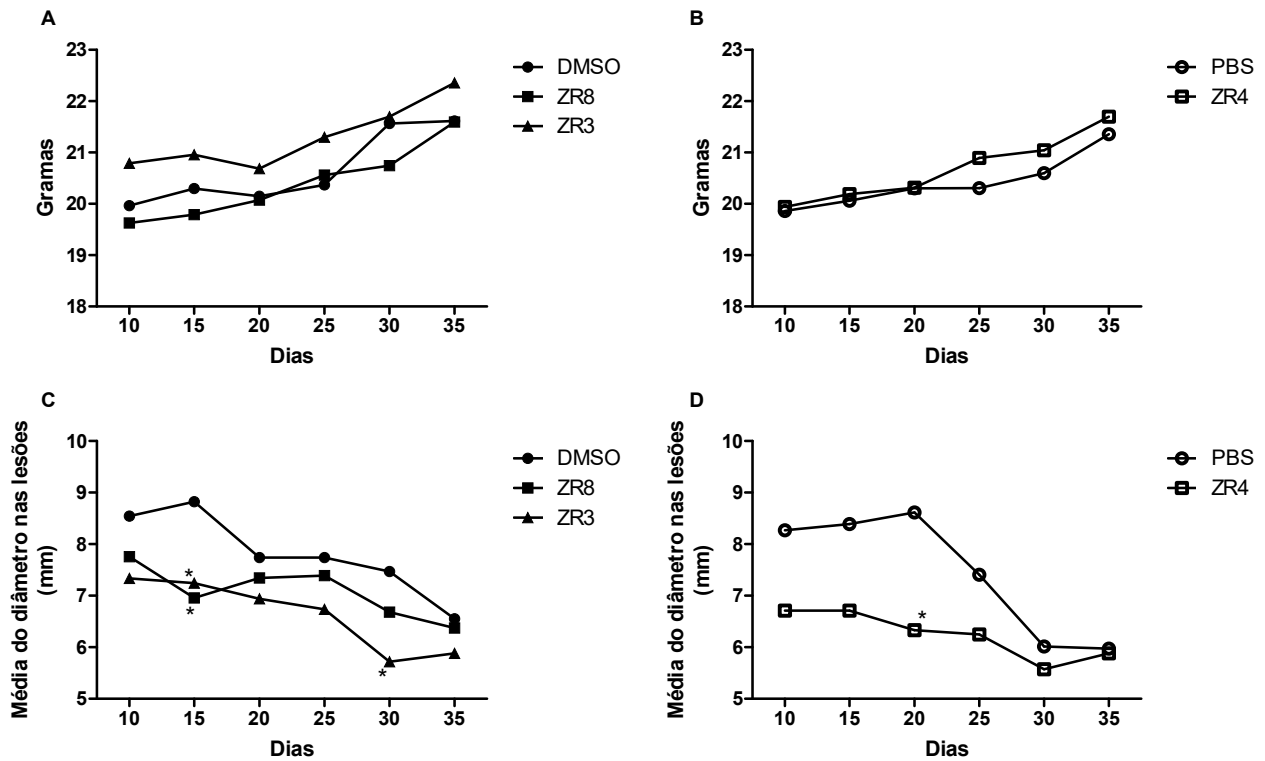
**Figura 11. Níveis de citocinas induzidas pela imunização com leveduras da cepa *S. brasiliensis* 5110 mortas por calor na esporotricose disseminada.** Dois grupos de camundongos BALB/c ( $n = 15$  por grupo) foram imunizados com  $5 \times 10^7$  de leveduras da cepa *S. brasiliensis* 5110 mortas por calor em 200  $\mu$ l de PBS (Barra branca) ou com apenas 200  $\mu$ l de PBS estéril (Barra preta) intraperitonealmente no dia zero e 7º dia. No 14º dia os camundongos foram infectados com  $5 \times 10^6$  de leveduras da cepa *S. brasiliensis* vivas intraperitonealmente. Os camundongos foram sacrificados nos 7º, 14º e 21º dias após a infecção. Foi avaliado os níveis de citocinas de (A e B) IL-17A, (C e D) IFN- $\gamma$  e (E e F) IL-1 $\beta$  por ELISA no baço e no fígado respectivamente. Representado 1 experimento de 3 experimentos independentes. Os resultados foram expressos com o desvio padrão. A análise estatística foi analisada pelo One-Way ANOVA, e múltiplas comparações pelo teste de Tukey. O nível de significância admitido foi de  $p < 0,05$ , sendo \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

#### 4.5 Indução de uma resposta protetora por peptídeos imunogênicos na esporotricose subcutânea

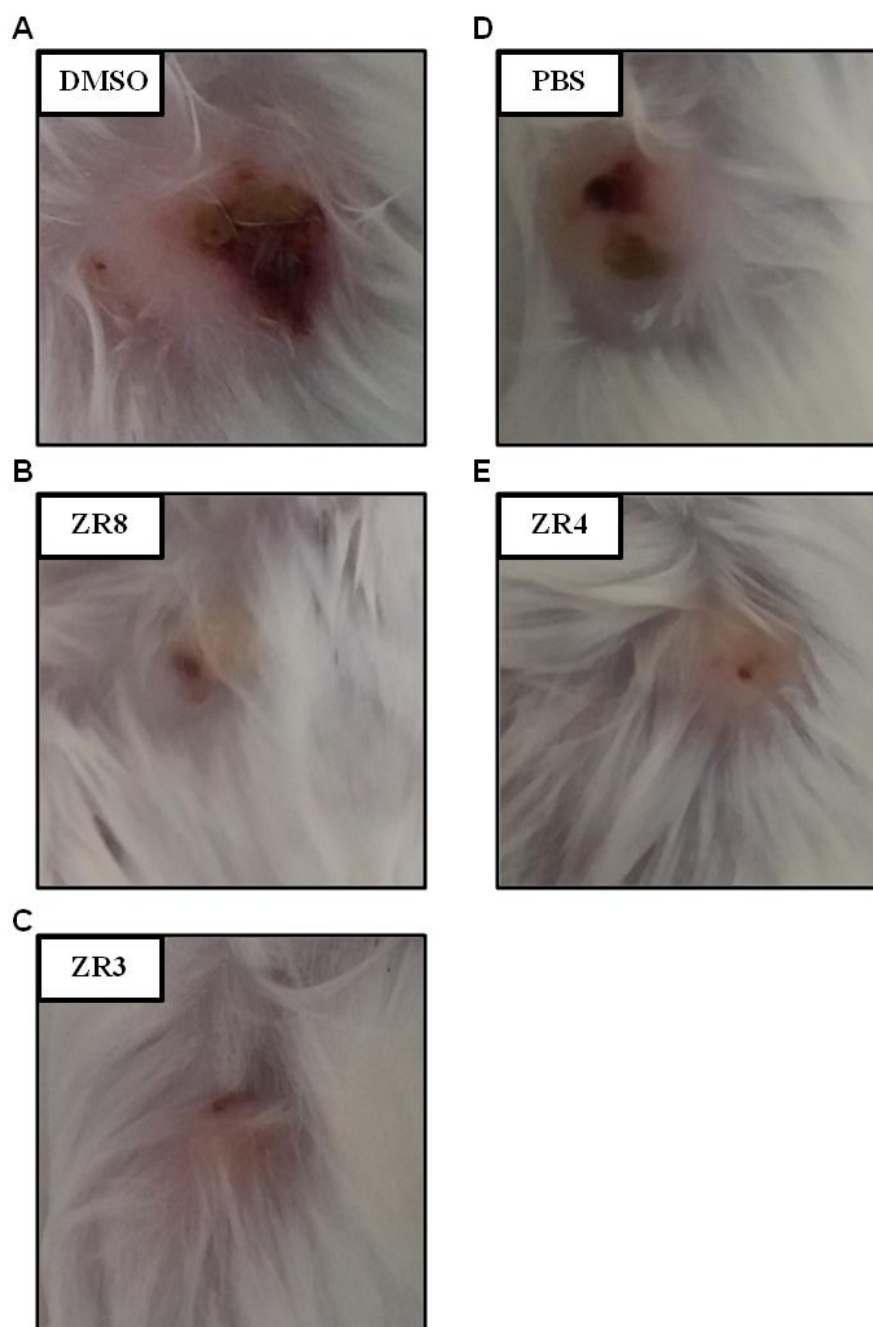
Foi elaborado um modelo de vacina utilizando os peptídeos capazes de promover proliferação celular, conforme descrito nos materiais e métodos (**Figura 2**). Após a vacinação foi realizada uma infecção subcutânea com as leveduras da cepa *S. brasiliensis* 5110, já que a inoculação de leveduras no tecido subcutâneo é a principal forma de infecção da doença (FERNANDES, K. et al., 2000; SCHUBACH, T. M. P. et al., 2002). A evolução da doença foi avaliada pela perda de peso, diâmetro da lesão primária, desenvolvimento de lesões secundárias e carga fúngica.

Não foi observada diferença significativa no peso dos camundongos, apesar dos camundongos vacinados com o DMSO apresentarem ligeira perda de peso quando comparados com os camundongos vacinados com o ZR3 (**Figura 12A e 12B**). Todos os camundongos apresentaram uma redução natural do diâmetro da lesão ao longo de 35 dias de infecção (**Figura 12C e 12D**). A vacinação com os peptídeos ZR3, ZR4 e ZR8 foi capaz de reduzir o diâmetro das lesões no início da infecção. As lesões foram significativamente menores no 15º dia de infecção no grupo ZR8 e no 15º e 30º dia de infecção no grupo ZR3 (**Figura 12C**). O grupo vacinado com peptídeo ZR4 teve a regressão significativa da lesão no 20º dia de infecção, quando comparada com o seu respectivo controle (**Figura 12D**). Foram representadas em fotos as lesões no 15º dia de infecção de todos os grupos (**Figura 13A, 13B, 13C, 13D e 13E**). A diminuição da lesão na esporotricose é um bom prognóstico. Em diferentes modelos de esporotricose subcutânea, a espécie *S. brasiliensis* foi considerada a mais virulenta, entre outros parâmetros, por promover as maiores e mais graves lesões no tecido (CASTRO et al., 2013; DELLA TERRA et al., 2017).

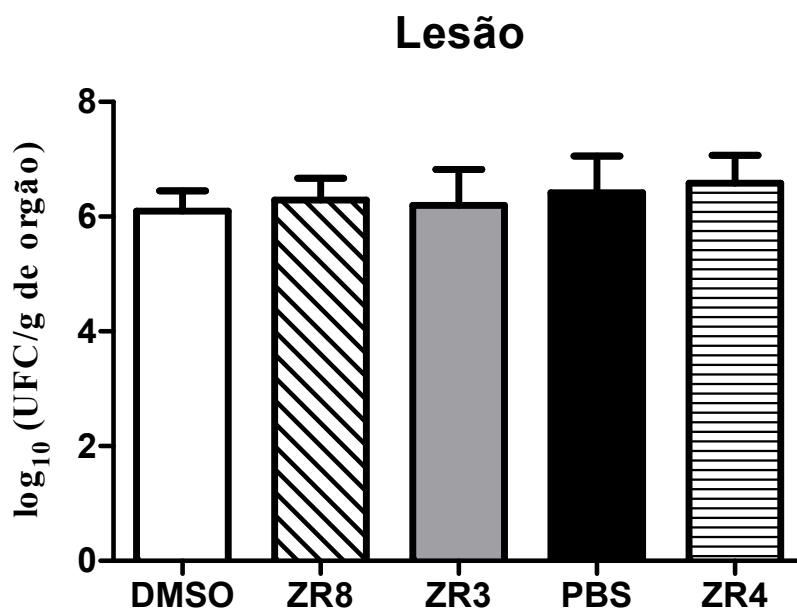
No 35º dia de infecção foi avaliada a carga fúngica na lesão, baço, fígado, linfonodos e rins. Foi observado uma alta carga fúngica na lesão, porém não houve diferença entre os grupos vacinados com os respectivos controles (**Figura 14**). Não foi observada disseminação do fungo para outros órgãos (dados não mostrados). Embora nesse modelo de esporotricose subcutânea não tenha evoluído para uma esporotricose disseminada, os camundongos de todos os grupos desenvolveram esplenomegalia e linfonomegalia, porém apenas o grupo controle desenvolveu lesões secundárias como artrites nos membros e lesões na cauda (**Figura 15**). Lesões secundárias similares foram observadas em outros modelos de esporotricose subcutânea (CASTRO et al., 2013; DELLA TERRA et al., 2017).



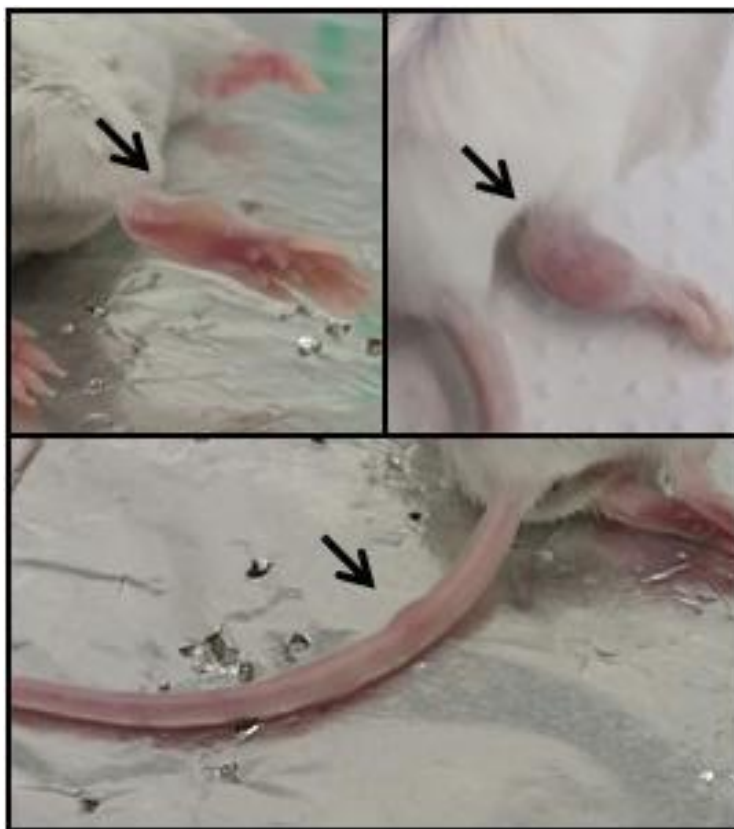
**Figura 12. O efeito dos peptídeos imunogênicos no peso e no diâmetro das lesões na esporotricose subcutânea.** Cinco grupos de camundongos BALB/c ( $n = 7$  por grupo) foram vacinados com 20  $\mu\text{g}$  dos peptídeos imunogênicos ou 20  $\mu\text{L}$  de PBS ou DMSO, juntamente com o adjuvante de Freund's na proporção 1:1, intramuscularmente no dia zero, 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dia. No 21<sup>o</sup> dia os camundongos foram infectados com  $1 \times 10^7$  de leveduras da cepa *S. brasiliensis* 5110 no tecido subcutâneo. A partir do 10<sup>o</sup> dia, em intervalos de 5 dias até o 35<sup>o</sup> dia, os camundongos foram pesados e foi medido a altura e largura das lesões com um paquímetro. (A) o peso dos camundongos do grupo DMSO e do (B) grupo PBS. O diâmetro das lesões do (C) grupos DMSO e do (D) grupo PBS. Representado 1 experimento de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada pelo Two-Way ANOVA, e múltiplas comparações pelo pós-teste Bonferroni. O nível de significância admitido foi de  $p < 0,05$ , sendo \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .



**Figura 13. Fotos das lesões subcutâneas no 15º dia de infecção.** Cinco grupos de camundongos BALB/c ( $n = 7$  por grupo) foram vacinados com 20  $\mu\text{g}$  dos peptídeos imunogênicos ou 20  $\mu\text{L}$  de PBS ou DMSO, juntamente com o adjuvante de Freund's na proporção 1:1, intramuscularmente no dia zero, 7º e 14º dia. No 21º dia os camundongos foram infectados com  $1 \times 10^7$  de leveduras da cepa *S. brasiliensis* 5110 no tecido subcutâneo. Foto representativa de 1 camundongo de cada grupo no 15º dia após infecção, sendo (A) DMSO, (B) ZR8, (C) ZR3, (D) PBS e (E) ZR4. Representado 1 experimento de 3 experimentos independentes.



**Figura 14. Carga fúngica na esporotricose subcutânea em camundongos vacinados com os peptídeos imunogênicos.** Cinco grupos de camundongos BALB/c ( $n = 7$  por grupo) foram vacinados com 20  $\mu\text{g}$  dos peptídeos imunogênicos ou 20  $\mu\text{L}$  de PBS ou DMSO, juntamente com o adjuvante de Freund's na proporção 1:1, intramuscularmente no dia zero, 7º e 14º dia. No 21º dia os camundongos foram infectados com  $1 \times 10^7$  de leveduras da cepa *S. brasiliensis* 5110 no tecido subcutâneo. No 35º dia os camundongos foram eutanasiados em câmara de  $\text{CO}_2$ , as lesões foram retiradas para análise de unidades formadoras de colônia (UFC). Representado 1 experimento de 3 experimentos independentes. Os resultados foram expressos com o desvio padrão.



**Figura 15. Fotos das lesões secundárias no 35º dia de infecção.** Cinco grupos de camundongos BALB/c ( $n = 7$  por grupo) foram vacinados com 20  $\mu\text{g}$  dos peptídeos imunogênicos ou 20  $\mu\text{L}$  de PBS ou DMSO, juntamente com o adjuvante de Freund's na proporção 1:1, intramuscularmente no dia zero, 7º e 14º dia. No 21º dia os camundongos foram infectados com  $1 \times 10^7$  de leveduras da cepa *S. brasiliensis* 5110 no tecido subcutâneo. Foto representativa de 2 experimentos de 3 experimentos independentes. Foto dos camundongos do grupo DMSO e PBS no 35º dia após infecção.

#### 4.6 Os peptídeos ZR3 e ZR8 induzem uma resposta imunológica protetora na esporotricose

Como não vimos controle da carga fúngica, foi avaliado se os peptídeos imunogênicos foram capazes de induzir um perfil celular protetor na esporotricose subcutânea. Após 35 dias de infecção, além da carga fúngica, foi avaliado a quantidade de linfócitos TCD4, TCD8 e linfócitos B, no baço e linfonodos, sendo essas as principais células envolvidas na proteção induzida por vacinas (NANJAPPA; KLEIN, 2014). Na lesão foi verificado o número total de neutrófilos. O linfonodo, baço e lesão foram retirados para a análise do número total de células a partir da porcentagem da população específica marcada (**Figura 16A e 16D, Figura 17A e 17D, Figura 18A e 18D e Figura 19A**)

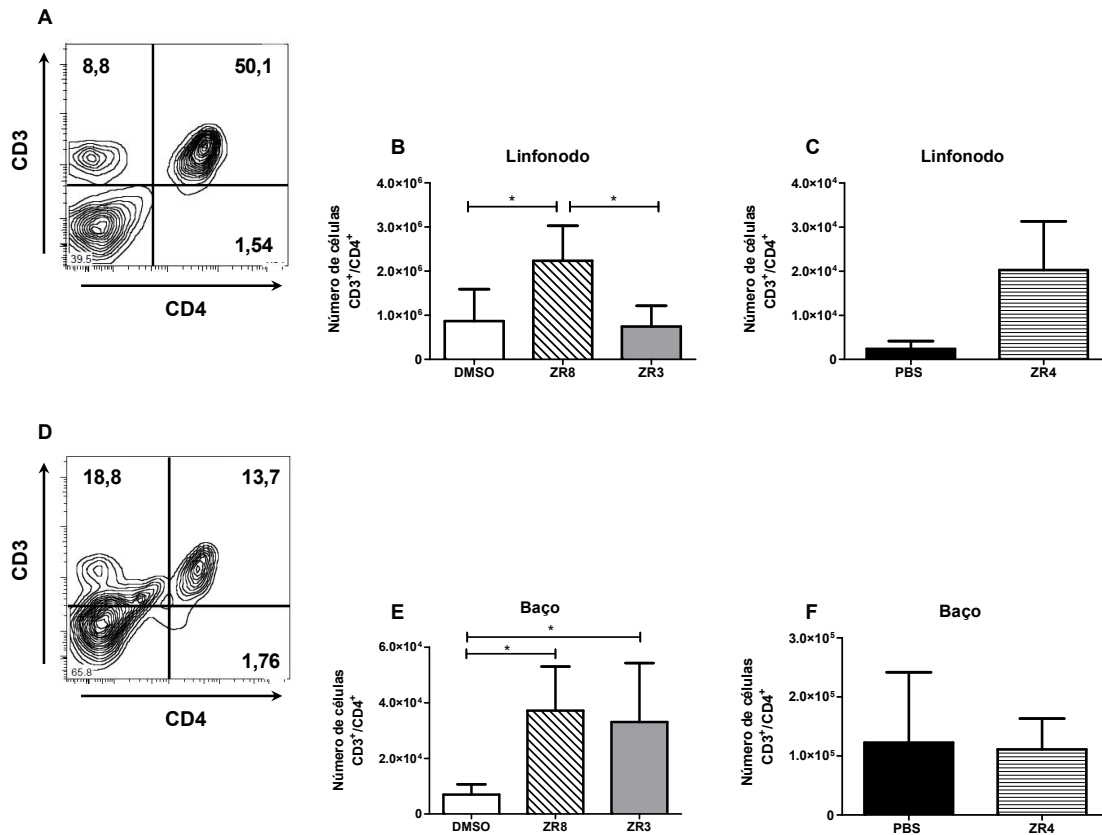
Por citometria de fluxo observamos o aumento do número total das células CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> no linfonodo e baço dos camundongos vacinados com o peptídeo ZR8 (**Figura 16B e 16E**). O peptídeo ZR3 induziu um aumento no número de células CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> somente no baço (**Figura 16E**). O peptídeo ZR4 não induziu diferença no número CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> (**Figura 16C e 16F**). Em infecções fúngicas o aumento de linfócitos TCD4, induzido por vacinas, está associado ao controle da doença (SCHECKELHOFF; DEEPE, 2002; NANJAPPA; KLEIN, 2014; WÜTHRICH et al., 2015; TRAVASSOS; TABORDA, 2017).

O número de células CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> foi aumentada no baço e no linfonodo dos camundongos vacinados por ZR8 e ZR4, respectivamente (**Figura 17E e Figura 17C**). Não foi observada diferença no número de células CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> no grupo ZR3 (**Figura 17B, 17E e 17F**). O perfil CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> está associado com linfócitos B que, por meio da produção de anticorpos, contribui para uma resposta humoral protetora na esporotricose (NASCIMENTO; ALMEIDA, 2005; ALMEIDA, S. R., 2012; DE ALMEIDA, J. R. F. et al., 2015). Em outras doenças fúngicas, como a candidíase e pneumocistose, a indução de anticorpos específicos mediados por uma vacina foi capaz de reduzir a carga fúngica, sendo assim protetora nessas doenças (ZHENG et al., 2005; EDWARDS JR, 2012).

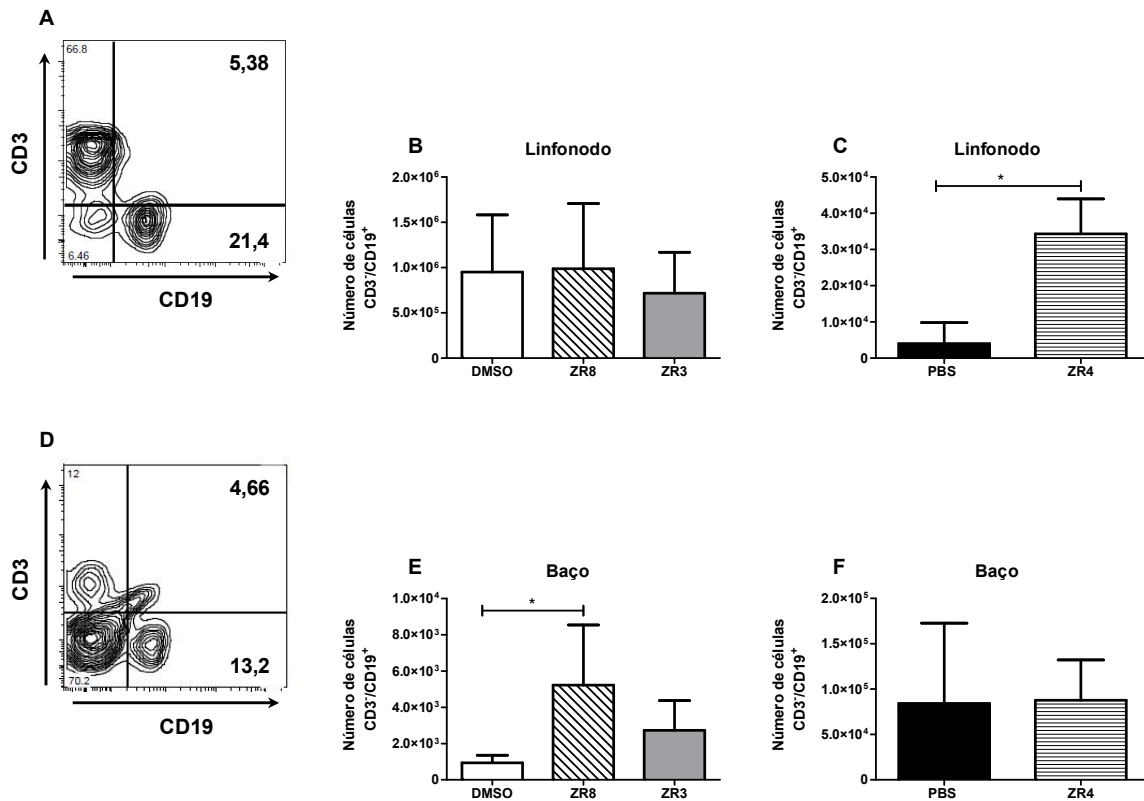
Nenhum peptídeo utilizado alterou o número de linfócitos TCD8 no baço e linfonodo (**Figura 18**). As vacinas buscam principalmente a ativação de linfócitos TCD4 e linfócitos B devido a suas funções efetoras, que são protetoras em infecções fúngicas. Entretanto, o alto número de infecções fúngicas em pacientes com linfopenia de linfócitos TCD4, provocadas por síndromes de imunodeficiência como a AIDS, a construção de uma vacina protetora por meio dos mecanismos efetores dos linfócitos TCD8 vem sendo de grande interesse (NANJAPPA; KLEIN, 2014).

Nas lesões dos camundongos vacinados com os peptídeos ZR8 e ZR3 foi observado aumento significativo no número de células CD11b<sup>+</sup>/GR1<sup>+</sup> (**Figura 19B**). Não houve diferença entre o grupo ZR4 com o seu respectivo controle (**Figura 19C**). Os neutrófilos

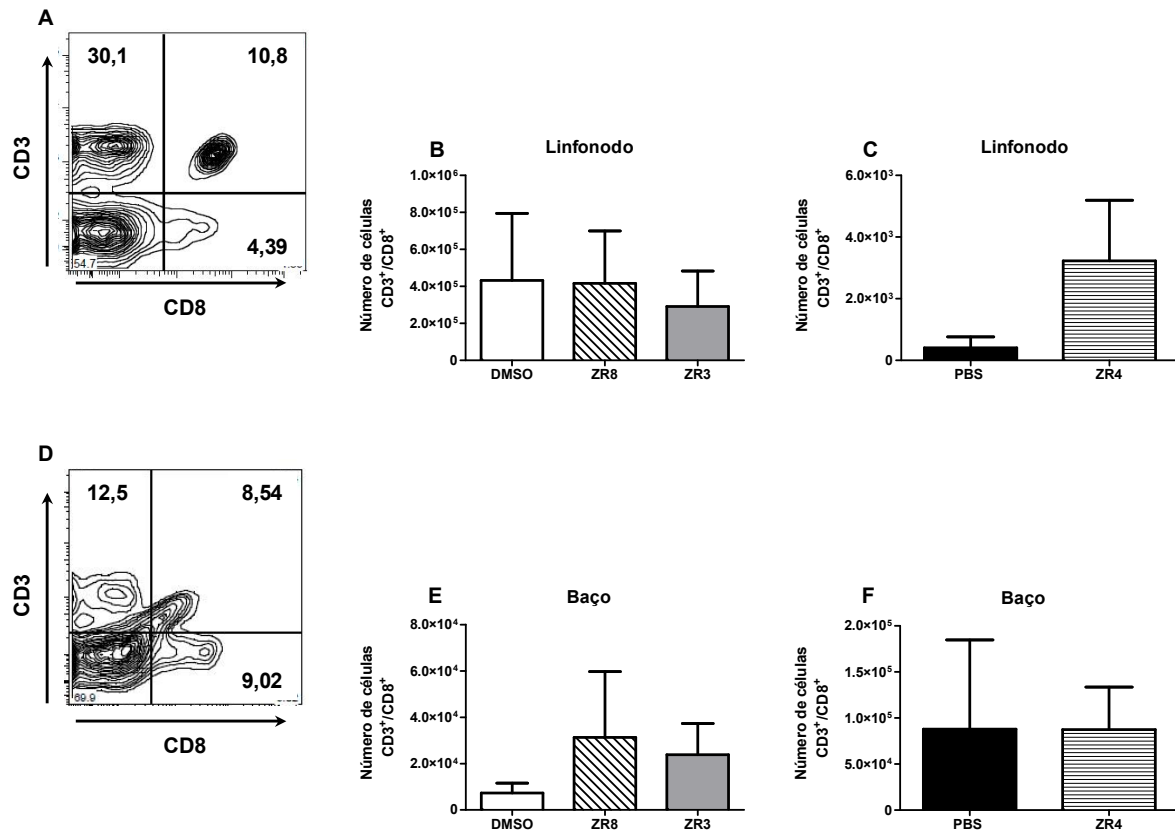
apresentam mecanismos fungistáticos e fungicida essenciais no controle de infecções fúngicas (ROMANI, 2011; CHEN et al., 2017).



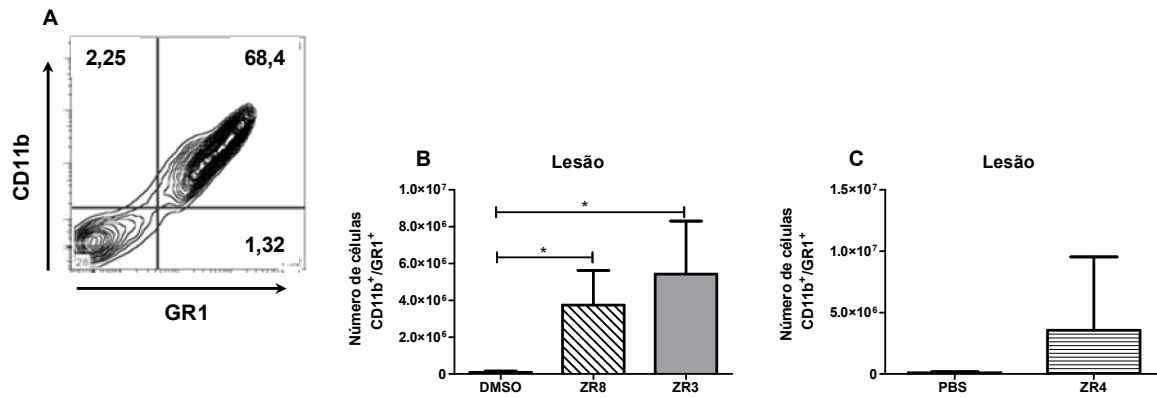
**Figura 16. Número total de células CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> na esporotricose subcutânea, após a vacinação com os peptídeos imunogênicos.** Cinco grupos de camundongos BALB/c (n = 7 por grupo) foram vacinados com 20 µg dos peptídeos imunogênicos ou 20 µL de PBS ou DMSO, juntamente com o adjuvante de Freund's na proporção 1:1, intramuscularmente no dia zero, 7º e 14º dia. No 35º dia os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> e foram retirados os linfonodos e baços para a avaliação do número total das células CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>. A marcação específica foi realizada com os anticorpos FITC CD3 (145-2C11) e PE CD4 (GK 1.5). *Counter plot* com a porcentagem de células CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, representativo de 1 camundongo entre os grupos, sendo (A) linfonodo e (D) baço. O número absoluto de células corresponde à porcentagem duplo positiva, sendo (B e C) linfonodo do grupo DMSO e PBS respectivamente e (E e F) baço do grupo DMSO e PBS respectivamente. O resultado foi obtido por citometria de fluxo (FACSCANTO). Foram adquiridos 100.000 eventos. Representado 1 experimento de 3 experimentos independentes. Os resultados foram expressos com o desvio padrão. A análise estatística foi analisada pelo One-Way ANOVA, e múltiplas comparações pelo teste de Tukey no grupo DMSO e o ANOVA seguido do teste paramétrico de t-test no grupo PBS. O nível de significância admitido foi de p<0,05, sendo \*: p<0,05; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001.



**Figura 17. Número total de células CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> na esporotricose subcutânea, após a vacinação com os peptídeos imunogênicos.** Cinco grupos de camundongos BALB/c (n = 7 por grupo) foram vacinados com 20 µg dos peptídeos imunogênicos ou 20 µL de PBS ou DMSO, juntamente com o adjuvante de Freund's na proporção 1:1, intramuscularmente no dia zero, 7º e 14º dia. No 35º dia os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>, foram retirados os linfonodos e baços para a avaliação do número total das células CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>. A marcação específica foi realizada com os anticorpos FITC CD3 (145-2C11) e APC-Cy5 CD19 (1D3). *Counter plot* com a porcentagem de células CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>, representativo de 1 camundongo entre os grupos, sendo (**A**) linfonodo e (**D**) baço. O número absoluto de células corresponde à porcentagem negativa para CD3 e positiva para CD19, sendo (**B** e **C**) linfonodo do grupo DMSO e PBS respectivamente e (**E** e **F**) baço do grupo DMSO e PBS respectivamente. O resultado foi obtido por citometria de fluxo (FACSCANTO). Foram adquiridos 100.000 eventos. Representado 1 experimento de 3 experimentos independentes. Os resultados foram expressos com o desvio padrão. A análise estatística foi analisada pelo One-Way ANOVA, e múltiplas comparações pelo teste de Tukey no grupo DMSO e o ANOVA seguido do teste paramétrico de t-test no grupo PBS. O nível de significância admitido foi de p<0,05, sendo \*: p<0,05; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001.



**Figura 18. Número total de células CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> na esporotricose subcutânea, após a vacinação com os peptídeos imunogênicos.** Cinco grupos de camundongos BALB/c (n = 7 por grupo) foram vacinados com 20 µg dos peptídeos imunogênicos ou 20 µL de PBS ou DMSO, juntamente com o adjuvante de Freund's na proporção 1:1, intramuscularmente no dia zero, 7º e 14º dia. No 35º dia os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>, foram retirados os linfonodos e baços para a avaliação do número total das células CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. A marcação específica foi realizada com os anticorpos FITC CD3 (145-2C11) e PE-Cy7 CD8 (53-6.7). *Counter plot* com a porcentagem de células CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, representativo de 1 camundongo entre os grupos, sendo (A) linfonodo e (D) baço. O número absoluto de células corresponde à porcentagem duplo positiva, sendo (B e C) linfonodo do grupo DMSO e PBS respectivamente e (E e F) baço do grupo DMSO e PBS respectivamente. O resultado foi obtido por citometria de fluxo (FACSCANTO). Foram adquiridos 100.000 eventos. Representado 1 experimento de 3 experimentos independentes. Os resultados foram expressos com o desvio padrão. A análise estatística foi analisada pelo One-Way ANOVA, e múltiplas comparações pelo teste de Tukey no grupo DMSO e o ANOVA seguido do teste paramétrico de t-test no grupo PBS. O nível de significância admitido foi de p<0,05, sendo \*: p<0,05; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001.



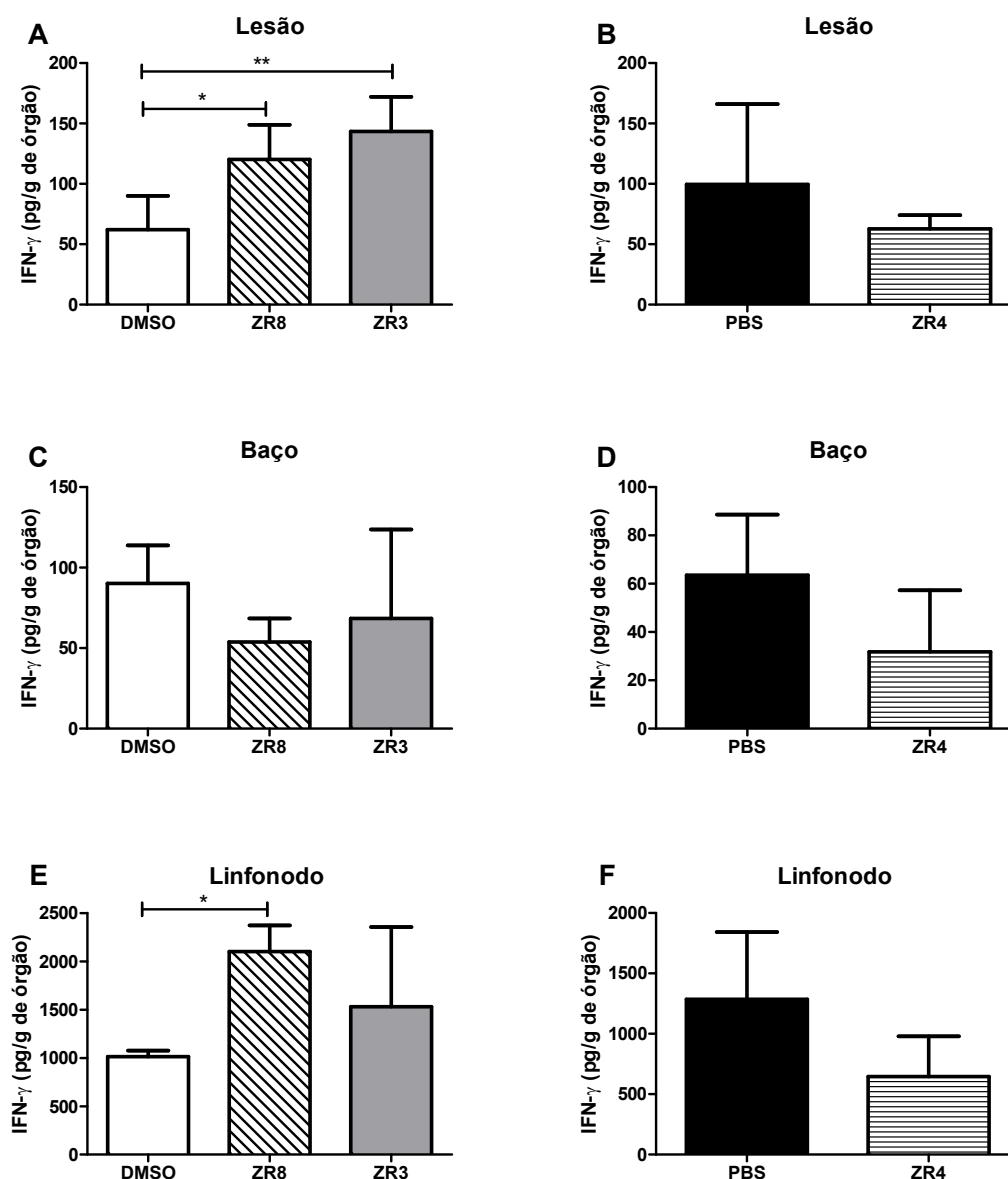
**Figura 19. Número total de células CD11b<sup>+</sup>/GR1<sup>+</sup> na esporotricose subcutânea, após a vacinação com os peptídeos imunogênicos.** Cinco grupos de camundongos BALB/c (n = 7 por grupo) foram vacinados com 20 µg dos peptídeos imunogênicos ou 20 µL de PBS ou DMSO, juntamente com o adjuvante de Freund's na proporção 1:1, intramuscularmente no dia zero, 7º e 14º dia. No 35º dia os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>, foi retirado a lesão para a avaliação do número total das células CD11b<sup>+</sup>/GR1<sup>+</sup>. A marcação específica foi realizada com os anticorpos FITC CD11b (m1/70) e APC GR1 (RB6-8C5). **(A)** *Counter plot* com a porcentagem de células CD11b<sup>+</sup>/GR1<sup>+</sup>, representativo de 1 camundongo entre os grupos. O número absoluto de células corresponde à porcentagem duplo positiva, sendo **(B)** do grupo DMSO e **(C)** do grupo PBS. O resultado foi obtido por citometria de fluxo (FACSCANTO). Foram adquiridos 100.000 eventos. Representado 1 experimento de 3 experimentos independentes. Os resultados foram expressos com o desvio padrão. A análise estatística foi analisada pelo One-Way ANOVA, e múltiplas comparações pelo teste de Tukey no grupo DMSO e o ANOVA seguido do teste paramétrico de t-test no grupo PBS. O nível de significância admitido foi de p<0,05, sendo \*: p<0,05; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001.

#### 4.7 Os peptídeos ZR3 e ZR8 induzem uma resposta imunológica protetora na esporotricose

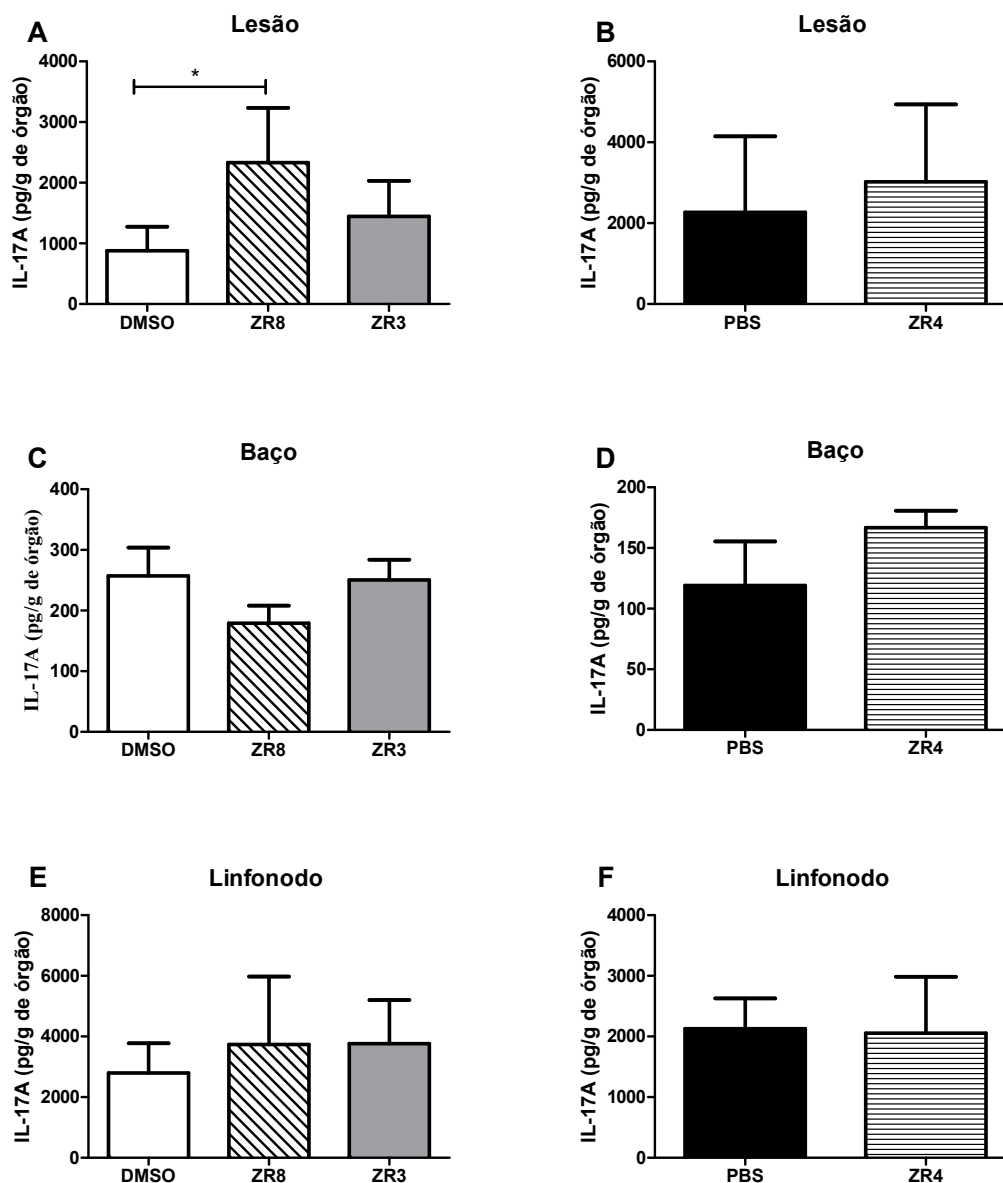
Foram determinados os níveis de IFN- $\gamma$ , IL-17A e IL-1 $\beta$  induzido pelos peptídeos imunogênicos na esporotricose subcutânea. Foi avaliada a lesão, baço e linfonodo para confirmar se a vacina induz uma resposta imunológica protetora na esporotricose subcutânea.

O peptídeo ZR8 aumentou todos os níveis dessas citocinas na lesão (**Figura 20A**, **Figura 21A** e **Figura 22A**). Os camundongos vacinados com o peptídeo ZR8 também tiveram altos níveis de IFN- $\gamma$  no linfonodo e IL-1 $\beta$  no baço (**Figura 20E** e **Figura 22C**). O peptídeo ZR3 aumentou a produção de IFN- $\gamma$  na lesão (**Figura 19A**). Os camundongos vacinados com o peptídeo ZR4 tiveram níveis similares de citocina com o respectivo controle (**Figura 20B**, **20D** e **20F**, **Figura 21B**, **21D** e **21F** e **Figura 22B**, **22D** e **22F**). Uma resposta Th1/Th17 é protetora na esporotricose (KAJIWARA et al., 2004; UENOTSUCHI et al., 2006; CHEN et al., 2017). Foi comprovado que a ausência de IL-1 $\beta$  prejudica a resposta adaptativa na esporotricose causada por *S. schenckii* (GONÇALVES et al., 2017). No presente trabalho, nós observamos uma resposta Th1/Th17 e altos níveis de IL-1 $\beta$  nos camundongos vacinados com o peptídeo ZR8.

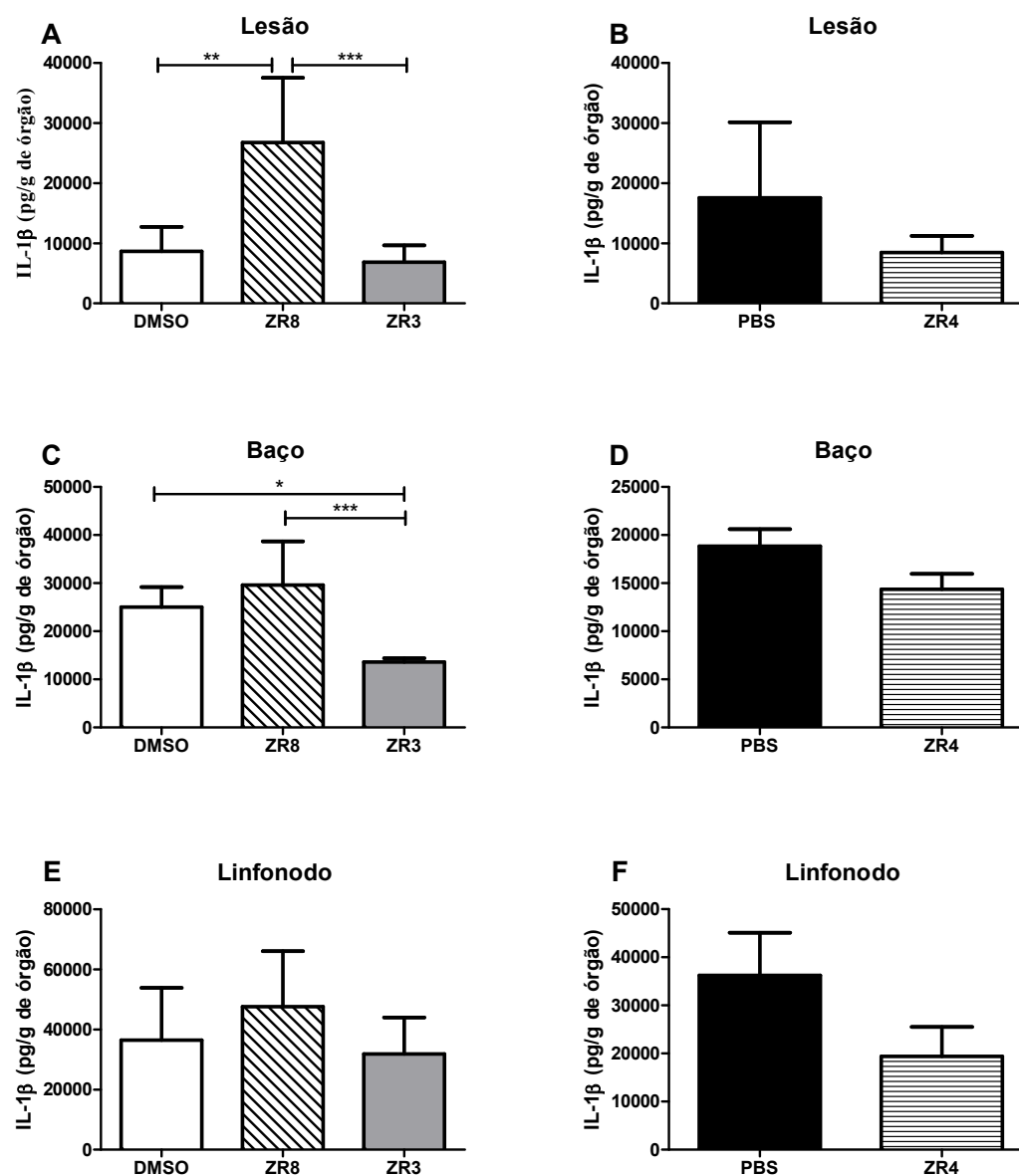
Embora a vacinação, com os peptídeos imunogênicos, não tenha diminuído a carga fúngica na esporotricose subcutânea, os peptídeos ZR3 e ZR8 induziram uma resposta imune protetora na esporotricose com aumento de linfócitos TCD4 e altos níveis de IFN- $\gamma$  e IL-17A, sendo que o peptídeo ZR8 foi o melhor candidato à vacina na esporotricose subcutânea, avaliado nesse trabalho.



**Figura 20. Concentração de IFN- $\gamma$  na lesão, baço e linfonodo dos camundongos vacinados com os peptídeos imunogênicos na esporotricose subcutânea.** Cinco grupos de camundongos BALB/c ( $n = 7$  por grupo) foram vacinados com 20  $\mu$ g dos peptídeos imunogênicos ou 20  $\mu$ L de PBS ou DMSO, juntamente com o adjuvante de Freund's na proporção 1:1, intramuscularmente no dia zero, 7º e 14º dia. No 35º dia os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>, foram retirados a lesão, baço e linfonodo para a dosagem de IFN- $\gamma$ . A concentração de IFN- $\gamma$  foi avaliada por ELISA, sendo (A e B) na lesão, (C e D) no baço e (E e F) no linfonodo, no grupo DMSO e grupo PBS respectivamente. Representado 1 experimento de 3 experimentos independentes. Os resultados foram expressos com o desvio padrão. A análise estatística foi analisada pelo One-Way ANOVA, e múltiplas comparações pelo teste de Tukey no grupo DMSO e o ANOVA seguido do teste paramétrico de t-test no grupo PBS. O nível de significância admitido foi de  $p < 0,05$ , sendo \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .



**Figura 21. Concentração de IL-17A na lesão, baço e linfonodo dos camundongos vacinados com os peptídeos imunogênicos na esporotricose subcutânea.** Cinco grupos de camundongos BALB/c ( $n = 7$  por grupo) foram vacinados com 20  $\mu$ g dos peptídeos imunogênicos ou 20  $\mu$ L de PBS ou DMSO, juntamente com o adjuvante de Freund's na proporção 1:1, intramuscularmente no dia zero, 7º e 14º dia. No 35º dia os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>, foram retirados a lesão, baço e linfonodo para a dosagem de IL-17A. A concentração de IL-17A foi avaliada por ELISA sendo (A e B) na lesão, (C e D) no baço e (E e F) no linfonodo, no grupo DMSO e grupo PBS respectivamente. Representado 1 experimento de 3 experimentos independentes. Os resultados foram expressos com o desvio padrão. A análise estatística foi analisada pelo One-Way ANOVA, e múltiplas comparações pelo teste de Tukey no grupo DMSO e o ANOVA seguido do teste paramétrico de t-test no grupo PBS. O nível de significância admitido foi de  $p < 0,05$ , sendo \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .



**Figura 22. Concentração de IL-1 $\beta$  na lesão, baço e linfonodo dos camundongos vacinados com os peptídeos imunogênicos na esporotricose subcutânea.** Cinco grupos de camundongos BALB/c ( $n = 7$  por grupo) foram vacinados com 20  $\mu$ g dos peptídeos imunogênicos ou 20  $\mu$ L de PBS ou DMSO, juntamente com o adjuvante de Freund's na proporção 1:1, intramuscularmente no dia zero, 7 $^{\circ}$  e 14 $^{\circ}$  dia. No 35 $^{\circ}$  dia os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>, foram retirados a lesão, baço e linfonodo para a dosagem de IL-1 $\beta$ . A concentração de IL-1 $\beta$  foi avaliada por ELISA sendo (A e B) na lesão, (C e D) no baço e (E e F) no linfonodo, no grupo DMSO e grupo PBS respectivamente. Representado 1 experimento de 3 experimentos independentes. Os resultados foram expressos com o desvio padrão. A análise estatística foi analisada pelo One-Way ANOVA, e múltiplas comparações pelo teste de Tukey no grupo DMSO e o ANOVA seguido do teste paramétrico de t-test no grupo PBS. O nível de significância admitido foi de  $p < 0,05$ , sendo \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente as infecções fúngicas se tornaram um grupo emergente dentro das doenças infecciosas. A pandemia da AIDS, o aumento do uso de quimioterápicos no tratamento do câncer, e outros fatores que diminuem a resposta imunológica do hospedeiro, juntamente com procedimentos hospitalares invasivos, como o uso de cateteres, aumentaram os casos de infecções disseminadas causadas por fungos (BROWN, G. D., 2011; WÜTHRICH; DEEPE JR; KLEIN, 2012; WÜTHRICH et al., 2015). A *Candida albicans* é um dos principais agentes em infecções sanguíneas hospitalares (PFALLER et al., 2011). Já a aspergilose é uma das infecções mais relatadas em pacientes com neoplasias sanguíneas (WALSH et al., 2008). Aproximadamente, mais de um milhão de novos casos de criptococose, são estimados no mundo em pacientes com AIDS, sendo que metade desses pacientes vão a óbito com a doença (PARK et al., 2009).

Antifúngicos são as principais escolhas no tratamento de infecções fúngicas, em pacientes imunossuprimidos e imunocompetentes. Entretanto, a resistência está sendo recorrente em quase todas as drogas antifúngicas (TRAVASSOS; TABORDA, 2017). Várias doenças foram erradicadas com o uso de vacinas, como a varíola em seres humanos e da peste bovina em animais, juntamente com a quase erradicação ou a prevenção bem-sucedida de outras infecções virais ou bacterianas (NANJAPPA; KLEIN, 2014). No entanto, o desenvolvimento de vacinas contra infecções fúngicas ainda é um desafio, em parte devido à falta de conhecimento sobre os mecanismos de uma imunidade protetora contra infecções fúngicas e a complexidade genética dos fungos (WÜTHRICH et al., 2015). Atualmente, apenas 2 antígenos estão em estágios clínicos para a criação de uma nova vacina contra infecções fúngicas, ambos para candidíase (CASSONE; CASADEVALL, 2012).

A esporotricose, embora seja classificada como uma micose subcutânea pode evoluir para formas mais graves e profundas ocasionando lesões disseminadas, amputações e óbitos (DE LIMA BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011; FREITAS, D. F. et al., 2015b). Após o surto zoonótico, a doença se tornou endêmica no Rio de Janeiro (SCHUBACH, T. M. P. et al., 2002). Os gatos são altamente suscetíveis à doença, e mesmo após tratamento adequado os animais acabam falecendo. Outros estados como São Paulo, Rio Grande do Sul e Paraná tem demonstrado aumento progressivo nos casos de esporotricose. A nova espécie descrita *S. brasiliensis*, é a espécie mais diagnosticada nesses casos (RODRIGUES et al., 2013).

O presente estudo propôs um modelo imunoproteômico para selecionar os peptídeos imunogênicos da cepa *S. brasiliensis* 5110, com a intenção de criar uma vacina contra a

esporotricose. Após a identificação de 34 proteínas foram selecionados os peptídeos com maior probabilidade de se acoplar com o MHC de classe II, por meio de programas de predição. Encontrar um peptídeo que acople ao MHC de classe II, utilizando esse modelo, é um método muito utilizado em diversas abordagens para a construção de vacinas (BÄR et al., 2012; SERNA et al., 2014; WÜTHRICH et al., 2015). Porém, a análise utilizada por esses programas pode não ser precisa. Na busca de um peptídeo comum para várias infecções fúngicas, WÜTHRICH et al. (2015) sintetizaram 10 peptídeos (de uma proteína imunogênica comum em vários fungos dimórficos) com alto grau de afinidade a molécula de MHC de classe II, e apenas um peptídeo foi capaz de promover proliferação em células sensibilizadas. Em outro estudo, foi isolado e caracterizado epítomos de *Candida albicans*, utilizando coluna específica para MHC de classe II, para isolar o complexo MHC-peptídeo das células dendríticas que entraram em contato com a *Candida albicans* previamente. Desse modo, após a eluição dessa coluna foi possível identificar os peptídeos apresentados por essas células. De acordo com os programas de predição, esses peptídeos identificados no complexo MHC-peptídeo, tem alta capacidade de se acoplar na molécula de MHC de classe II (BÄR et al., 2012).

No presente estudo foram identificados 60 peptídeos com um grau alto/intermediário para se acoplar no MHC de classe II, foram sintetizados apenas os 7 peptídeos com melhores níveis de predição, desses peptídeos apenas 3 foram capazes de induzir proliferação *in vitro* (ZR3, ZR4 e ZR8). Candidatos à vacina contra paracoccidiodomicose, aspergilose e blastomicose também foram capazes de induzir expansão celular *in vitro* (TABORDA et al., 1998; DIAZ-AREVALO; ITO; KALKUM, 2012; WÜTHRICH et al., 2015).

Nós utilizamos uma imunização com fungo morto por calor e observamos diminuição da carga fúngica na esporotricose disseminada, juntamente com o aumento de IFN- $\gamma$ , comprovando que uma resposta de memória pode gerar proteção na esporotricose. As células TCD4, por meio da secreção das citocinas pro inflamatórias, determinam a resistência do hospedeiro contra infecções fúngicas como paracoccidiodomicose, coccidiodomicose, aspergilose e candidíase (WÜTHRICH et al., 2015; TRAVASSOS; TABORDA, 2017). A resposta Th1 é caracterizada pela produção de IFN- $\gamma$ , que aumenta a atividade microbicida de macrófagos, sendo a citocina mais importante na proteção contra a esporotricose (UENOTSUCHI et al., 2006). As células Th17 estão envolvidas no recrutamento de neutrófilos e são importante contra infecções fúngicas (ROMANI, 2011; MARCOS et al., 2016). Uma vacina utilizando os peptídeos ZR8 e ZR3 foi capaz de aumentar o número de linfócitos TCD4 no baço e no linfonodo (apenas ZR8), juntamente com um aumento no número de neutrófilos nas lesões. Esse aumento de linfócitos TCD4 no baço e linfonodos corroboram com o aumento de IFN- $\gamma$  nas lesões dos camundongos vacinados com os peptídeos ZR3 e ZR8.

O peptídeo ZR8 foi o mais promissor candidato a vacina contra a esporotricose subcutânea. Além do aumento nos linfócitos TCD4 no baço e no linfonodo e dos níveis de IFN- $\gamma$  nas lesões, o peptídeo ZR8 foi a única vacina que aumentou os níveis de IL-17A nas lesões. Acreditamos que esse aumento de IL-17A esteja associado com o aumento da população de linfócitos TCD4 nos linfonodos, presente somente nos camundongos vacinados com o peptídeo ZR8. Com todos esses fatores, confirmamos a eficácia do ZR8 em induzir uma resposta de memória protetora contra a esporotricose. Os camundongos vacinados com ZR8 também tiveram aumento no número de células CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> no baço. Já foi demonstrado que uma resposta humoral eficiente está associada com o aumento de IFN- $\gamma$  na esporotricose (NASCIMENTO; ALMEIDA, 2005; NASCIMENTO et al., 2008; DE ALMEIDA, J. R. F. et al., 2015).

Por meio de uma abordagem imune diferente, CHEN et al. (2017) desenvolveram um potencial candidato à vacina contra *S. globosa* usando um fago recombinante com um peptídeo de GP70. Este fago recombinante com o peptídeo aumenta as células Th1 e induz uma forte resposta humoral que diminui a carga fúngica na esporotricose disseminada causada por *S. globosa*. Pelo fato da GP70 ser a proteína mais antigênica das espécies *Sporothrix* spp., também utilizamos uma sequência da GP70 (LKFLALASVISATSA), diferente da usada por CHEN et al. (2017), e foi a mais promissora vacina na esporotricose subcutânea causada por *S. brasiliensis*, observada nesse trabalho.

Apesar do aumento de neutrófilos nas lesões, linfócitos TCD4 e células CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>, com uma resposta Th1/Th17, juntamente com a diminuição no diâmetro das lesões no 15º dia de infecção, não observamos diminuição de carga fúngica após 35 dias de infecção. Curiosamente no 35º dia de infecção os diâmetros das lesões foram similares ao grupo controle. Acreditamos que em momentos anteriores pode ter havido a diminuição da carga fúngica. A cepa *S. brasiliensis* 5110 é altamente virulenta, provocando carga fúngica elevada e crônica em vários modelos de esporotricose (CASTRO et al., 2013; DE ALMEIDA, J. R. F. et al., 2015; DE ALMEIDA, J. R. et al., 2017).

Diferentes adjuvantes podem modificar a progressão da esporotricose após a vacinação com os peptídeos imunogênicos. Por meio de diferentes adjuvantes como hidróxido de alumínio, Montanide™ Pet Gel A (PGA) e um vetor fago recombinante, associados a diferentes proteínas e peptídeos do *Sporothrix* spp., foi observado a diminuição da carga fúngica na esporotricose causada por *S. schenckii* e *S. globosa* (CHEN et al., 2017; PORTUONDO et al., 2017). Na blastomicose, um tetrâmero foi utilizado como adjuvante em um modelo de vacina protetor na doença (WÜTHRICH et al., 2015).

CASTRO et al. (2013) observaram disseminação da esporotricose a partir de uma infecção subcutânea com conídios da cepa *S. brasiliensis* 5110, após 45 dias, diferentemente do que observamos neste trabalho, onde a infecção com leveduras da

mesma cepa, por 35 dias, não evoluiu para uma disseminação. Na transmissão zoonótica, os gatos infectados inoculam cargas elevadas de levedura de *S. brasiliensis* profundamente no tecido, sendo isso determinante na gravidade dos casos com a espécie *S. brasiliensis* (FERNANDES, K. et al., 2000; SCHUBACH, T. M. P. et al., 2002). A levedura da cepa *S. brasiliensis* 5110 está bem adaptada ao tecido subcutâneo, e é muito difícil para o sistema imunológico sozinho efetuar a eliminação do fungo. Em nosso modelo, uma resposta protetora não foi o suficiente para diminuir a carga fúngica, sendo assim mais imunizações, durante a infecção, juntamente com a associação de diferentes adjuvantes em um período maior de infecção, seríamos capazes de observar melhor a eficácia dessa vacina na esporotricose subcutânea. A eficácia dos peptídeos também deve ser avaliada em outras formas da esporotricose, já que observamos a proteção contra a forma disseminada doença utilizando o fungo morto por calor.

Em conclusão, a partir de 34 proteínas identificadas de *S. brasiliensis*, foram selecionados 3 peptídeos que induzem a proliferação em células sensibilizadas *in vitro*. Demonstraram que os peptídeos ZR8 e ZR3 induzem uma resposta imune protetora contra a esporotricose. No entanto, essa resposta imune celular não foi suficiente para diminuir a carga fúngica. Estes dados demonstram avanços nas abordagens imunológicas para um desenvolvimento de vacina antifúngica, juntamente com a identificação dos peptídeos ZR8 e ZR3 como candidatos a vacina na esporotricose subcutânea.

## 6. CONCLUSÕES

Com esse trabalho concluímos que:

- Confirmamos uma proteção na esporotricose disseminada, por meio de células de memória induzidas por *S. brasiliensis* morto por calor;
- Identificamos 34 proteínas da cepa *S. brasiliensis* 5110 por meio de um modelo imunoproteômico;
- Por meio de programas de predições, identificamos 3 peptídeos (ZR3, ZR4 e ZR8) capazes de induzir proliferação celular *in vitro*;
- Uma vacina com os peptídeos ZR3, ZR4 e ZR8 foram capazes de diminuir o diâmetro das lesões e não promover lesões secundárias na esporotricose subcutânea;
- O peptídeo ZR8 foi o melhor candidato a vacina, uma vez que foi capaz de aumentar os linfócitos TCD4 e linfócitos B, juntamente com os níveis de IFN- $\gamma$ , IL-17A e IL-1 $\beta$ , sendo assim uma imunidade protetora na esporotricose subcutânea;
- Apesar da imunidade protetora, a vacina com o peptídeo ZR8 não foi capaz de diminuir a carga fúngica no presente modelo de esporotricose subcutânea;

## 7. BIBLIOGRAFIA

ALMEIDA-PAES, R.; FRASES, S.; MONTEIRO, P. C. F.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; NOSANCHUK, J. D. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. **Microbes and infection**, v. 11, n. 5, p. 554-562, 2009.

ALMEIDA-PAES, R.; DE OLIVEIRA, L. C.; OLIVEIRA, M. M. E.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; NOSANCHUK, J. D.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from the *Sporothrix* complex. **BioMed research international**, v. 2015, n., p., 2015.

ALMEIDA, R. Micologia. **Ciências Farmacêuticas, Rio de Janeiro, Brazil**, v., n., p., 2008.

ALMEIDA, S. R. Therapeutic monoclonal antibody for sporotrichosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n., p., 2012.

BÄR, E.; GLADIATOR, A.; BASTIDAS, S.; ROSCHITZKI, B.; ACHA-ORBEA, H.; OXENIUS, A.; LEIBUNDGUT-LANDMANN, S. A novel Th cell epitope of *Candida albicans* mediates protection from fungal infection. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 11, p. 5636-5643, 2012.

BARROS, M. B. D. L.; SCHUBACH, A. D. O.; DO VALLE, A. C. F.; GALHARDO, M. C. G.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, T. M. P.; REIS, R. S.; WANKE, B.; MARZOCHI, K. B. F.; CONCEIÇÃO, M. J. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. **Clinical infectious diseases**, v. 38, n. 4, p. 529-535, 2004.

BARROS, M. B. D. L.; SCHUBACH, T. P.; COLL, J. O.; GREMIÃO, I. D.; WANKE, B.; SCHUBACH, A. Sporotrichosis: development and challenges of an epidemic. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 27, n. 6, p. 455-460, 2010.

BRITO, M. M.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MORGADO, F. N.; RAIBOLT, P. S.; SCHUBACH, A.; SCHUBACH, T. P.; SCHÄFFER, G. M.; BORBA, C. M. Comparison of virulence of different *Sporothrix schenckii* clinical isolates using experimental murine model. **Medical mycology**, v. 45, n. 8, p. 721-729, 2007.

BROWN, A. J.; LEACH, M. D.; NICHOLLS, S. The relevance of heat shock regulation in fungal pathogens of humans. **Virulence**, v. 1, n. 4, p. 330-332, 2010.

BROWN, G. D. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. **Annual review of immunology**, v. 29, n., p. 1-21, 2011.

BUISSA-FILHO, R.; PUCCIA, R.; MARQUES, A.; PINTO, F.; MUNOZ, J.; NOSANCHUK, J.; TRAVASSOS, L.; TABORDA, C. The monoclonal antibody against the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* mediates immune protection in infected BALB/c mice challenged intratracheally with the fungus. **Infection and immunity**, v. 76, n. 7, p. 3321-3328, 2008.

BURNIE, J. P.; CARTER, T. L.; HODGETTS, S. J.; MATTHEWS, R. C. Fungal heat-shock proteins in human disease. **FEMS microbiology reviews**, v. 30, n. 1, p. 53-88, 2006.

BUSTAMANTE, B.; CAMPOS, P. E. Endemic sporotrichosis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 14, n. 2, p. 145-149, 2001.

BUZÁS, E. I.; BUZÁS, E. I.; GYÖRGY, B.; BUZÁS, E. I.; GYÖRGY, B.; PÁSZTÓI, M.; JELINEK, I.; FALUS, A.; GABIUS, H.-J. Carbohydrate recognition systems in autoimmunity. **Autoimmunity**, v. 39, n. 8, p. 691-704, 2006.

CARLOS, I. Z.; SGARBI, D.; SANTOS, G.; PLACERES, M. *Sporothrix schenckii* Lipid Inhibits Macrophage Phagocytosis: Involvement of Nitric Oxide and Tumour Necrosis Factor- $\alpha$ . **Scandinavian journal of immunology**, v. 57, n. 3, p. 214-220, 2003.

- CARLOS, I. Z.; SASSÁ, M. F.; DA GRAÇA SGARBI, D. B.; PLACERES, M. C. P.; MAIA, D. C. G. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 168, n. 1, p. 1-10, 2009.
- CARVALHO, P. C.; LIMA, D. B.; LEPREVOST, F. V.; SANTOS, M. D.; FISCHER, J. S.; AQUINO, P. F.; MORESCO, J. J.; YATES III, J. R.; BARBOSA, V. C. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. **Nature protocols**, v. 11, n. 1, p. 102-117, 2016.
- CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Insights into mechanisms of antibody-mediated immunity from studies with *Cryptococcus neoformans*. **Current molecular medicine**, v. 5, n. 4, p. 421-433, 2005.
- CASADEVALL, A. Determinants of virulence in the pathogenic fungi. **Fungal biology reviews**, v. 21, n. 4, p. 130-132, 2007.
- CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L.-A. Immunoglobulins in defense, pathogenesis, and therapy of fungal diseases. **Cell host & microbe**, v. 11, n. 5, p. 447-456, 2012.
- CASSONE, A.; CASADEVALL, A. Recent progress in vaccines against fungal diseases. **Current opinion in microbiology**, v. 15, n. 4, p. 427-433, 2012.
- CASTRO, R. A.; KUBITSCHKE-BARREIRA, P. H.; TEIXEIRA, P. A.; SANCHES, G. F.; TEIXEIRA, M. M.; QUINTELLA, L. P.; ALMEIDA, S. R.; COSTA, R. O.; CAMARGO, Z. P.; FELIPE, M. S. Differences in cell morphometry, cell wall topography and Gp70 expression correlate with the virulence of *Sporothrix brasiliensis* clinical isolates. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e75656, 2013.
- CHAVES, A.; DE CAMPOS, M.; BARROS, M.; DO CARMO, C.; GREMIÃO, I.; PEREIRA, S.; SCHUBACH, T. Treatment abandonment in feline sporotrichosis—Study of 147 cases. **Zoonoses and public health**, v. 60, n. 2, p. 149-153, 2013.
- CHEN, F.; JIANG, R.; WANG, Y.; ZHU, M.; ZHANG, X.; DONG, S.; SHI, H.; WANG, L. Recombinant Phage Elicits Protective Immune Response against Systemic *S. globosa* Infection in Mouse Model. **Scientific Reports**, v. 7, n., p. 42024, 2017.
- CLAVIJO-GIRALDO, D. M.; MATÍNEZ-ALVAREZ, J. A.; LOPES-BEZERRA, L. M.; PONCE-NOYOLA, P.; FRANCO, B.; ALMEIDA, R. S.; MORA-MONTES, H. M. Analysis of *Sporothrix schenckii sensu stricto* and *Sporothrix brasiliensis* virulence in *Galleria mellonella*. **Journal of microbiological methods**, v. 122, n., p. 73-77, 2016.
- CONTROL, C. F. D. Multistate outbreak of sporotrichosis in seedling handlers, 1988. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 37, n. 42, p. 652, 1988.
- COOPER, C.; DIXON, D.; SALKIN, I. Laboratory-acquired sporotrichosis. **Journal of medical and veterinary mycology**, v. 30, n. 2, p. 169-171, 1992.
- COSTA, R. O.; DE MESQUITA, K. C.; DAMASCO, P. S.; BERNARDES-ENGEMANN, A. R.; DIAS, C.; SILVA, I. C.; LOPES-BEZERRA, L. M. Infectious arthritis as the single manifestation of sporotrichosis: serology from serum and synovial fluid samples as an aid to diagnosis. **Revista iberoamericana de micologia**, v. 25, n. 1, p. 54, 2008.
- CUNNINGHAM, K. M.; BULMER, G.; RHOADES, E. Phagocytosis and intracellular fate of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 140, n. 5, p. 815-817, 1979.
- DA CRUZ, L. C. H. Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n., p. 08-28, 2013.
- DA FONSECA, C. A.; JESUINO, R. S.; FELIPE, M. S. S.; CUNHA, D. A.; BRITO, W. A.; SOARES, C. M. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes and infection**, v. 3, n. 7, p. 535-542, 2001.

DA GRAÇA SGARBI, D. B.; DA SILVA, A. J. R.; CARLOS, I. Z.; SILVA, C. L.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C. S. Isolation of ergosterol peroxide and its reversion to ergosterol in the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia**, v. 139, n. 1, p. 9-14, 1997.

DE ALMEIDA, J. R.; SANTIAGO, K. L.; KAIHAMI, G. H.; MARANHÃO, A. Q.; DE MACEDO BRÍGIDO, M.; DE ALMEIDA, S. R. The efficacy of humanized antibody against the *Sporothrix* antigen, gp70, in promoting phagocytosis and reducing disease burden. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n., p., 2017.

DE ALMEIDA, J. R. F.; KAIHAMI, G. H.; JANNUZZI, G. P.; DE ALMEIDA, S. R. Therapeutic vaccine using a monoclonal antibody against a 70-kDa glycoprotein in mice infected with highly virulent *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. **Medical mycology**, v. 53, n. 1, p. 42-50, 2015.

DE BEER, Z. W.; DUONG, T. A.; WINGFIELD, M. J. The divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma*: solution to a problematic relationship. **Studies in mycology**, v. 83, n., p. 165-191, 2016.

DE LIMA BARROS, M. B.; COSTA, D. L. M. A.; SCHUBACH, T. M. P.; VALLE, A. C. F.; LORENZI, N. P.; TEIXEIRA, J. L.; DE OLIVEIRA SCHUBACH, A. Endemic of zoonotic sporotrichosis: profile of cases in children. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 27, n. 3, p. 246-250, 2008.

DE LIMA BARROS, M. B.; DE ALMEIDA PAES, R.; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 4, p. 633-654, 2011.

DE LIMA FRANCO, D.; NASCIMENTO, R.; FERREIRA, K.; ALMEIDA, S. R. D. Antibodies Against *Sporothrix schenckii* Enhance TNF- $\alpha$  Production and Killing by Macrophages. **Scandinavian journal of immunology**, v. 75, n. 2, p. 142-146, 2012.

DELLA TERRA, P. P.; RODRIGUES, A. M.; FERNANDES, G. F.; NISHIKAKU, A. S.; BURGER, E.; DE CAMARGO, Z. P. Exploring virulence and immunogenicity in the emerging pathogen *Sporothrix brasiliensis*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 8, p. e0005903, 2017.

DIAZ-AREVALO, D.; ITO, J. I.; KALKUM, M. Protective effector cells of the recombinant Asp f3 anti-aspergillosis vaccine. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n., p., 2012.

DÍAZ, I. A. C. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. **Mycopathologia**, v. 108, n. 2, p. 113-116, 1989.

DICKERSON, C.; TAYLOR, R.; DRUTZ, D. Susceptibility of congenitally athymic (nude) mice to sporotrichosis. **Infection and immunity**, v. 40, n. 1, p. 417-420, 1983.

DONABEDIAN, H.; O'DONNELL, E.; OLSZEWSKI, C.; MACARTHUR, R. D.; BUDD, N. Disseminated cutaneous and meningeal sporotrichosis in an AIDS patient. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 18, n. 2, p. 111-115, 1994.

DOOLEY, D. P.; BOSTIC, P. S.; BECKIUS, M. L. Spook house sporotrichosis: a point-source outbreak of sporotrichosis associated with hay bale props in a Halloween haunted house. **Archives of internal medicine**, v. 157, n. 16, p. 1885-1887, 1997.

EDWARDS JR, J. E. Fungal cell wall vaccines: an update. **Journal of medical microbiology**, v. 61, n. 7, p. 895-903, 2012.

ENENKEL, C.; BLOBEL, G.; REXACH, M. Identification of a yeast karyopherin heterodimer that targets import substrate to mammalian nuclear pore complexes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 28, p. 16499-16502, 1995.

ENGLAND, D.; HOCHHOLZER, L. Sporothrix infection of the lung without cutaneous disease. Primary pulmonary sporotrichosis. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 111, n. 3, p. 298-300, 1987.

- FERNANDES, G. F.; DO AMARAL, C. C.; SASAKI, A.; MARTINEZ GODOY, P.; DE CAMARGO, Z. P. Heterogeneity of proteins expressed by Brazilian *Sporothrix schenckii* isolates. **Medical mycology**, v. 47, n. 8, p. 855-861, 2009.
- FERNANDES, G. F.; DOS SANTOS, P. O.; RODRIGUES, A. M.; SASAKI, A. A.; BURGER, E.; DE CAMARGO, Z. P. Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 241-249, 2013.
- FERNANDES, K.; COELHO, A.; BEZERRA, L.; BARJA-FIDALGO, C. Virulence of *Sporothrix schenckii* conidia and yeast cells, and their susceptibility to nitric oxide. **Immunology**, v. 101, n. 4, p. 563-569, 2000.
- FERREIRA, L. S.; GONCALVES, A. C.; PORTUONDO, D. L.; MAIA, D. C. G.; PLACERES, M. C. P.; BATISTA-DUHARTE, A.; CARLOS, I. Z. Optimal clearance of *Sporothrix schenckii* requires an intact Th17 response in a mouse model of systemic infection. **Immunobiology**, v. 220, n. 8, p. 985-992, 2015.
- FISCHMAN, O.; BENTUBO, H.; CAMARGO, Z.; RODRIGUES, A.; PIRES, D.; PETRI, V. Atypical clinical presentation of sporotrichosis caused by *sporothrix globosa* resistant to intraconazole. **Mycoses**, v. 55, n., p. 207-208, 2012.
- FREITAS, D. F.; LIMA, M. A.; DE ALMEIDA-PAES, R.; LAMAS, C. C.; DO VALLE, A. C.; OLIVEIRA, M. M.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C. Sporotrichosis in the central nervous system caused by *Sporothrix brasiliensis*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 4, p. 663-664, 2015a.
- FREITAS, D. F.; SANTOS, S. S.; ALMEIDA-PAES, R.; DE OLIVEIRA, M. M.; DO VALLE, A. C.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; NOSANCHUK, J. D. Increase in virulence of *Sporothrix brasiliensis* over five years in a patient with chronic disseminated sporotrichosis. **Virulence**, v. 6, n. 2, p. 112-120, 2015b.
- FREITAS, D. F. S.; VALLE, A. C. F. D.; PAES, R. D. A.; BASTOS, F. I. P. M.; GALHARDO, M. C. G. Zoonotic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: a protracted epidemic yet to be curbed. v., n., p., 2010.
- FREITAS, D. F. S.; DE SIQUEIRA HOAGLAND, B.; DO VALLE, A. C. F.; FRAGA, B. B.; DE BARROS, M. B.; DE OLIVEIRA SCHUBACH, A.; DE ALMEIDA-PAES, R.; CUZZI, T.; ROSALINO, C. M. V.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Sporotrichosis in HIV-infected patients: report of 21 cases of endemic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Sabouraudia**, v. 50, n. 2, p. 170-178, 2012.
- GONÇALVES, A. C.; FERREIRA, L. S.; MANENTE, F. A.; FARIA, C. M. Q. G.; POLES, M. C.; ANDRADE, C. R.; ZAMBONI, D. S.; CARLOS, I. Z. The NLRP3 inflammasome contributes to host protection during *Sporothrix schenckii* infection. **Immunology**, v. 151, n. 2, p. 154-166, 2017.
- GÖRLICH, D.; PREHN, S.; LASKEY, R. A.; HARTMANN, E. Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. **Cell**, v. 79, n. 5, p. 767-778, 1994.
- GREMIÃO, I. D.; MENEZES, R. C.; SCHUBACH, T. M.; FIGUEIREDO, A. B.; CAVALCANTI, M. C.; PEREIRA, S. A. Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. **Medical mycology**, v. 53, n. 1, p. 15-21, 2015.
- GREMIÃO, I. D. F.; MIRANDA, L. H. M.; REIS, E. G.; RODRIGUES, A. M.; PEREIRA, S. A. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 1, p. e1006077, 2017.
- GUZMAN-BELTRAN, S.; PEREZ-TORRES, A.; CORONEL-CRUZ, C.; TORRES-GUERRERO, H. Phagocytic receptors on macrophages distinguish between different *Sporothrix schenckii* morphotypes. **Microbes and infection**, v. 14, n. 12, p. 1093-1101, 2012.

HAMPTON, D. E.; ADESINA, A.; CHODOSH, J. Conjunctival sporotrichosis in the absence of antecedent trauma. **Cornea**, v. 21, n. 8, p. 831-833, 2002.

HEKTOEN, L.; PERKINS, C. Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. **The Journal of experimental medicine**, v. 5, n. 1, p. 77, 1900.

HELM, M.; BERMAN, C. The clinical, therapeutic and epidemiological features of the sporotrichosis infection on the mines. **Proceedings of the Transvaal Mine Medical Officers' Association. Sporotrichosis infection on mines of the Witwatersrand. Johannesburg, South Africa**, v., n., p. 59-67, 1947.

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

HOWARD, D. H. Dimorphism of *Sporotrichum schenckii*. **Journal of bacteriology**, v. 81, n. 3, p. 464, 1961.

HOWLADER, D. R.; SINHA, R.; NAG, D.; MAJUMDER, N.; MUKHERJEE, P.; BHAUMIK, U.; MAITI, S.; WITHEY, J. H.; KOLEY, H. Zebrafish as a novel model for non-typhoidal *Salmonella* pathogenesis, transmission and vaccine efficacy. **Vaccine**, v. 34, n. 42, p. 5099-5106, 2016.

ISHIDA, K.; DE CASTRO, R. A.; BORBA DOS SANTOS, L. P.; QUINTELLA, L. P.; LOPES-BEZERRA, L. M.; ROZENTAL, S. Amphotericin B, alone or followed by itraconazole therapy, is effective in the control of experimental disseminated sporotrichosis by *Sporothrix brasiliensis*. **Medical mycology**, v. 53, n. 1, p. 34-41, 2014.

ISMAIL, M.; SITI-ZAHRAH, A.; SYAFIQ, M.; AMAL, M.; FIRDAUS-NAWI, M.; ZAMRI-SAAD, M. Feed-based vaccination regime against streptococcosis in red tilapia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*. **BMC veterinary research**, v. 12, n. 1, p. 194, 2016.

JELLMAYER, J. A.; FERREIRA, L. S.; MANENTE, F. A.; GONÇALVES, A. C.; POLES, M. C.; BATISTA-DUHARTE, A.; CARLOS, I. Z. Dectin-1 expression by macrophages and related antifungal mechanisms in a murine model of *Sporothrix schenckii* sensu stricto systemic infection. **Microbial pathogenesis**, v. 110, n., p. 78-84, 2017.

KAJIWARA, H.; SAITO, M.; OHGA, S.; UENOTSUCHI, T.; YOSHIDA, S.-I. Impaired host defense against *Sporothrix schenckii* in mice with chronic granulomatous disease. **Infection and immunity**, v. 72, n. 9, p. 5073-5079, 2004.

KAUFFMAN, C. A.; HAJJEH, R.; CHAPMAN, S. W.; GROUP, M. S. Practice guidelines for the management of patients with sporotrichosis. **Clinical infectious diseases**, v. 30, n. 4, p. 684-687, 2000.

KAUFFMAN, C. A.; BUSTAMANTE, B.; CHAPMAN, S. W.; PAPPAS, P. G. Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases**, v. 45, n. 10, p. 1255-1265, 2007.

KENYON, E. M.; RUSSELL, L. H.; MCMURRAY, D. N. Isolation of *Sporothrix schenckii* from potting soil. **Mycopathologia**, v. 87, n. 1, p. 128-128, 1984.

KLEIN, B. S.; TEBBETS, B. Dimorphism and virulence in fungi. **Current opinion in microbiology**, v. 10, n. 4, p. 314-319, 2007.

KOGA, T.; DUAN, H.; FURUE, M. Immunohistochemical detection of interferon- $\gamma$ -producing cells in granuloma formation of sporotrichosis. **Medical mycology**, v. 40, n. 2, p. 111-114, 2002.

LACAZ, C.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E.; MELO, N. Identificação dos fungos. **Fungos Actinomicetos Algas de interesse médico**, v., n., p. 130, 1998.

LIMA, O.; FIGUEIREDO, C.; PEREIRA, B.; COELHO, M.; MORANDI, V.; LOPES-BEZERRA, L. Adhesion of the human pathogen *Sporothrix schenckii* to several extracellular matrix proteins. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 32, n. 5, p. 651-657, 1999.

LIMA, O. C.; FIGUEIREDO, C. C.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; MORANDI, V.; BEZERRA, L. M. L. Involvement of fungal cell wall components in adhesion of *Sporothrix schenckii* to human fibronectin. **Infection and immunity**, v. 69, n. 11, p. 6874-6880, 2001.

LIMA, O. C.; BOUCHARA, J.-P.; RENIER, G.; MAROT-LEBLOND, A.; CHABASSE, D.; LOPES-BEZERRA, L. M. Immunofluorescence and flow cytometry analysis of fibronectin and laminin binding to *Sporothrix schenckii* yeast cells and conidia. **Microbial pathogenesis**, v. 37, n. 3, p. 131-140, 2004.

LIU, M.; CLEMONS, K. V.; BIGOS, M.; MEDOVARSKA, I.; BRUMMER, E.; STEVENS, D. A. Immune responses induced by heat killed *Saccharomyces cerevisiae*: a vaccine against fungal infection. **Vaccine**, v. 29, n. 9, p. 1745-1753, 2011.

LOPERA, D.; NARANJO, T. W.; CRUZ, O. G.; RESTREPO, A.; CANO, L. E.; LENZI, H. L. Structural and topographic dynamics of pulmonary histopathology and local cytokine profiles in *Paracoccidioides brasiliensis* conidia-infected mice. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 7, p. e1232, 2011.

LOPES-BEZERRA, L. M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R. O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 2, p. 293-308, 2006.

LUO, G.; GEBREMARIAM, T.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A.; IBRAHIM, A. S. Heat-killed yeast protects diabetic ketoacidotic-steroid treated mice from pulmonary mucormycosis. **Vaccine**, v. 32, n. 29, p. 3573-3576, 2014.

LUONG, M.; LAM, J. S.; CHEN, J.; LEVITZ, S. M. Effects of fungal N-and O-linked mannosylation on the immunogenicity of model vaccines. **Vaccine**, v. 25, n. 22, p. 4340-4344, 2007.

LUTZ, A.; SPLENDORE, A. Sobre uma mycose observada em homens e ratos (Contribuição para o conhecimento das assim chamadas sporotricoses). **Rev Med, São Paulo**, v. 10, n., p. 443-450, 1907.

MAIA, D. C. G.; SASSÁ, M. F.; PLACERES, M. C. P.; CARLOS, I. Z. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia**, v. 161, n. 1, p. 11-19, 2006.

MARCOS, C. M.; DE OLIVEIRA, H. C.; WANESSA DE CÁSSIA, M.; MELO, J. D. F. D. S.; ASSATO, P. A.; SCORZONI, L.; ROSSI, S. A.; E SILVA, A. C. D. P.; MENDES-GIANNINI, M. J.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Anti-immune strategies of pathogenic fungi. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 6, n., p., 2016.

MARIMON, R.; GENÉ, J.; CANO, J.; TRILLES, L.; LAZÉRA, M. D. S.; GUARRO, J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3251-3256, 2006.

MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; SUTTON, D. A.; KAWASAKI, M.; GUARRO, J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3198-3206, 2007.

MARIMON, R.; GENÉ, J.; CANO, J.; GUARRO, J. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. **Sabouraudia**, v. 46, n. 6, p. 621-625, 2008.

MARIO, D. N.; GUARRO, J.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H.; CAPILLA, J. In vitro and in vivo efficacy of amphotericin B combined with posaconazole against experimental disseminated sporotrichosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 5018-5021, 2015.

MAYORGA, O.; MUÑOZ, J. E.; LINCOPAN, N.; TEIXEIRA, A. F.; FERREIRA, L. C.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. The role of adjuvants in therapeutic protection against paracoccidioidomycosis after immunization with the P10 peptide. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n., p., 2012.

- MCG, G. Esporotricose zoonótica no Rio de Janeiro ainda sem controle. **Bol Inf Soc Infectol**, v. 34, n., p. 3-5, 2011.
- MEHTA, K. I. S.; SHARMA, N. L.; KANGA, A. K.; MAHAJAN, V. K.; RANJAN, N. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the environmental sources of cutaneous sporotrichosis patients in Himachal Pradesh, India: results of a pilot study. **Mycoses**, v. 50, n. 6, p. 496-501, 2007.
- MENDONCA, L.; GORIN, P.; LLOYD, K.; TRAVASSOS, L. Polymorphism of *Sporothrix schenckii* surface polysaccharides as a function of morphological differentiation. **Biochemistry**, v. 15, n. 11, p. 2423-2431, 1976.
- MESA-ARANGO, A. C.; DEL ROCÍO REYES-MONTES, M.; PÉREZ-MEJÍA, A.; NAVARRO-BARRANCO, H.; SOUZA, V.; ZÚNIGA, G.; TORIELLO, C. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 3004-3011, 2002.
- MONTENEGRO, H.; RODRIGUES, A. M.; DIAS, M. A. G.; DA SILVA, E. A.; BERNARDI, F.; DE CAMARGO, Z. P. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging animal infection in São Paulo, Brazil. **BMC veterinary research**, v. 10, n. 1, p. 269, 2014.
- MUÑOZ, J. E.; LUFT, V. D.; AMORIM, J.; MAGALHÃES, A.; THOMAZ, L.; NOSANCHUK, J. D.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Immunization with P10 peptide increases specific immunity and protects immunosuppressed BALB/c mice infected with virulent yeasts of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**, v. 178, n. 3-4, p. 177-188, 2014.
- NANJAPPA, S. G.; KLEIN, B. S. Vaccine immunity against fungal infections. **Current opinion in immunology**, v., n., p. 27, 2014.
- NASCIMENTO, R. C.; ALMEIDA, S. R. Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 241-247, 2005.
- NASCIMENTO, R. C.; ESPINDOLA, N. M.; CASTRO, R. A.; TEIXEIRA, P. A.; LOUREIRO Y PENHA, C. V.; LOPES-BEZERRA, L. M.; ALMEIDA, S. R. Passive immunization with monoclonal antibody against a 70-kDa putative adhesin of *Sporothrix schenckii* induces protection in murine sporotrichosis. **European journal of immunology**, v. 38, n. 11, p. 3080-3089, 2008.
- NIELSEN, M.; LUNDEGAARD, C.; LUND, O. Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method. **BMC bioinformatics**, v. 8, n. 1, p. 238, 2007.
- NIELSEN, M.; LUND, O. NN-align. An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction. **BMC bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 296, 2009.
- OROFINO-COSTA, R.; UNTERSTELL, N.; GRIPP, A. C.; DE MACEDO, P. M.; BROTA, A.; DIAS, E.; DE MELO TEIXEIRA, M.; FELIPE, M. S.; BERNARDES-ENGEMANN, A. R.; LOPES-BEZERRA, L. M. Pulmonary cavitation and skin lesions mimicking tuberculosis in a HIV negative patient caused by *Sporothrix brasiliensis*. **Medical mycology case reports**, v. 2, n., p. 65-71, 2013.
- OROFINO-COSTA, R.; MACEDO, P. M. D.; RODRIGUES, A. M.; BERNARDES-ENGEMANN, A. R. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, n. 5, p. 606-620, 2017.
- OROFINO-COSTA, R.; BÓIA, M.; MAGALHÃES, G.; DAMASCO, P.; BERNARDES-ENGEMANN, A.; BENVENUTO, F.; SILVA, I.; LOPES-BEZERRA, L. Arthritis as a hypersensitivity reaction in a case of sporotrichosis transmitted by a sick cat: clinical and serological follow up of 13 months. **Mycoses**, v. 53, n. 1, p. 81-83, 2010.

PADHYE, A.; KAUFMAN, L.; DURRY, E.; BANERJEE, C.; JINDAL, S.; TALWAR, P.; CHAKRABARTI, A. Fatal pulmonary sporotrichosis caused by *Sporothrix schenckii* var. *luriei* in India. **Journal of clinical microbiology**, v. 30, n. 9, p. 2492-2494, 1992.

PAIXÃO, A. G.; DA CRUZ LAMAS, C.; NUNES, E. P.; CHEQUER, G. L.; GONÇALVES, M. L. C.; GALHARDO, M. C. G.; ALMEIDA-PAES, R. The difficult management of disseminated *Sporothrix brasiliensis* in a patient with advanced AIDS. **AIDS research and therapy**, v. 12, n. 1, p. 16, 2015.

PANDEY, S.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 7, n. 1, p. a016246, 2015.

PAPPAS, P. G.; TELLEZ, I.; DEEP, A. E.; NOLASCO, D.; HOLGADO, W.; BUSTAMANTE, B. Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity. **Clinical infectious diseases**, v. 30, n. 1, p. 65-70, 2000.

PARK, B. J.; WANNEMUEHLER, K. A.; MARSTON, B. J.; GOVENDER, N.; PAPPAS, P. G.; CHILLER, T. M. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **Aids**, v. 23, n. 4, p. 525-530, 2009.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; MOET, G. J.; JONES, R. N.; CASTANHEIRA, M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). **International journal of antimicrobial agents**, v. 38, n. 1, p. 65-69, 2011.

PLOUFFE JR, J. F.; SILVA JR, J.; FEKETY, R.; REINHALTER, E.; BROWNE, R. Cell-mediated immune responses III sporotrichosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 139, n. 2, p. 152-157, 1979.

PORTUONDO, D. L.; BATISTA-DUHARTE, A.; FERREIRA, L. S.; MARTÍNEZ, D. T.; POLES, M. C.; DUARTE, R. A.; MARCOS, C. M.; DE ALMEIDA, A. M. F.; CARLOS, I. Z. A cell wall protein-based vaccine candidate induce protective immune response against *Sporothrix schenckii* infection. **Immunobiology**, v. 221, n. 2, p. 300-309, 2016.

PORTUONDO, D. L.; BATISTA-DUHARTE, A.; FERREIRA, L. S.; DE ANDRADE, C. R.; QUINELLO, C.; TÉLLEZ-MARTÍNEZ, D.; DE AGUIAR LOESCH, M. L.; CARLOS, I. Z. Comparative efficacy and toxicity of two vaccine candidates against *Sporothrix schenckii* using either Montanide™ Pet Gel A or aluminum hydroxide adjuvants in mice. **Vaccine**, v. 35, n. 34, p. 4430-4436, 2017.

POULIOT, P.; PLANTE, I.; RAQUIL, M.-A.; TESSIER, P. A.; OLIVIER, M. Myeloid-related proteins rapidly modulate macrophage nitric oxide production during innate immune response. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 5, p. 3595-3601, 2008.

REX, J.; BENNETT, J. Administration of potassium iodide to normal volunteers does not increase killing of *Sporothrix schenckii* by their neutrophils or monocytes. **Journal of medical and veterinary mycology**, v. 28, n. 3, p. 185-189, 1990.

RODRIGUES, A. M.; DE MELO TEIXEIRA, M.; DE HOOG, G. S.; SCHUBACH, T. M. P.; PEREIRA, S. A.; FERNANDES, G. F.; BEZERRA, L. M. L.; FELIPE, M. S.; DE CAMARGO, Z. P. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 6, p. e2281, 2013.

RODRIGUES, A. M.; FERNANDES, G. F.; ARAUJO, L. M.; DELLA TERRA, P. P.; DOS SANTOS, P. O.; PEREIRA, S. A.; SCHUBACH, T. M. P.; BURGER, E.; LOPES-BEZERRA, L. M.; DE CAMARGO, Z. P. Proteomics-based characterization of the humoral immune response in sporotrichosis: toward discovery of potential diagnostic and vaccine antigens. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 8, p. e0004016, 2015a.

RODRIGUES, A. M.; KUBITSCHKE-BARREIRA, P. H.; FERNANDES, G. F.; DE ALMEIDA, S. R.; LOPES-BEZERRA, L. M.; DE CAMARGO, Z. P. Immunoproteomic analysis reveals a convergent

humoral response signature in the *Sporothrix schenckii* complex. **Journal of proteomics**, v. 115, n., p. 8-22, 2015b.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. Sporothrix Species Causing Outbreaks in Animals and Humans Driven by Animal–Animal Transmission. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 7, p. e1005638, 2016.

ROEDERER, M. Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. **Cytometry Part A**, v. 45, n. 3, p. 194-205, 2001.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 4, p. 275-288, 2011.

ROMERO-MARTINEZ, R.; WHEELER, M.; GUERRERO-PLATA, A.; RICO, G.; TORRES-GUERRERO, H. Biosynthesis and Functions of Melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infection and immunity**, v. 68, n. 6, p. 3696-3703, 2000.

RUIZ-BACA, E.; TORIELLO, C.; PÉREZ-TORRES, A.; SABANERO-LÓPEZ, M.; VILLAGÓMEZ-CASTRO, J. C.; LÓPEZ-ROMERO, E. Isolation and some properties of a glycoprotein of 70 kDa (Gp70) from the cell wall of *Sporothrix schenckii* involved in fungal adherence to dermal extracellular matrix. **Medical mycology**, v. 47, n. 2, p. 185-196, 2009.

RUIZ-BACA, E.; MORA-MONTES, H. M.; LÓPEZ-ROMERO, E.; TORIELLO, C.; MOJICA-MARÍN, V.; URTIZ-ESTRADA, N. 2D-immunoblotting analysis of *Sporothrix schenckii* cell wall. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 2, p. 248-250, 2011.

RUIZ-BACA, E.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, G.; CUÉLLAR-CRUZ, M.; TORIELLO, C.; LÓPEZ-ROMERO, E.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G. Detection of 2 immunoreactive antigens in the cell wall of *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix globosa*. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 79, n. 3, p. 328-330, 2014.

SARAVANAKUMAR, P. S.; ESLAMI, P.; ZAR, F. A. Lymphocutaneous sporotrichosis associated with a squirrel bite: case report and review. **Clinical infectious diseases**, v. 23, n. 3, p. 647-648, 1996.

SASSÁ, M. F.; SATURI, A. E.; SOUZA, L. F.; DE ABREU RIBEIRO, L. C.; DA GRACA SGARBI, D. B.; CARLOS, I. Z. Response of macrophage Toll-like receptor 4 to a *Sporothrix schenckii* lipid extract during experimental sporotrichosis. **Immunology**, v. 128, n. 2, p. 301-309, 2009.

SASSÁ, M. F.; FERREIRA, L. S.; DE ABREU RIBEIRO, L. C.; CARLOS, I. Z. Immune response against *Sporothrix schenckii* in TLR-4-deficient mice. **Mycopathologia**, v. 174, n. 1, p. 21-30, 2012.

SCHECKELHOFF, M.; DEEPE, G. S. The protective immune response to heat shock protein 60 of *Histoplasma capsulatum* is mediated by a subset of V $\beta$ 8. 1/8.2+ T cells. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 10, p. 5818-5826, 2002.

SCHENCK, B. R. Refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to the sporotrichia. **Bull Johns Hopkins Hosp**, v. 9, n., p. 286-290, 1898.

SCHUBACH, A.; DE LIMA BARROS, M. B.; WANKE, B. Epidemic sporotrichosis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 21, n. 2, p. 129-133, 2008.

SCHUBACH, A. O.; SCHUBACH, T. M.; BARROS, M. B. Epidemic cat-transmitted sporotrichosis. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 11, p. 1185-1186, 2005.

SCHUBACH, T.; VALLE, A.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.; MONTEIRO, P.; REIS, R. S.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.; MARZOCHI, K.; SCHUBACH, A. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). **Sabouraudia**, v. 39, n. 1, p. 147-149, 2001.

SCHUBACH, T.; SCHUBACH, A.; OKAMOTO, T.; PELLON, I.; FIALHO-MONTEIRO, P.; REIS, R.; BARROS, M.; ANDRADE-PEREZ, M.; WANKE, B. Haematogenous spread of *Sporothrix schenckii* in

cats with naturally acquired sporotrichosis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 44, n. 9, p. 395-398, 2003.

SCHUBACH, T. M. P.; DE OLIVEIRA SCHUBACH, A.; DOS REIS, R. S.; CUZZI-MAYA, T.; BLANCO, T. C. M.; MONTEIRO, D. F.; DE LIMA BARROS, M. B.; BRUSTEIN, R.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; MONTEIRO, P. C. F. *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Mycopathologia**, v. 153, n. 2, p. 83-86, 2002.

SERNA, C.; LARA, J. A.; RODRIGUES, S. P.; MARQUES, A. F.; ALMEIDA, I. C.; MALDONADO, R. A. A synthetic peptide from *Trypanosoma cruzi* mucin-like associated surface protein as candidate for a vaccine against Chagas disease. **Vaccine**, v. 32, n. 28, p. 3525-3532, 2014.

SHAW, J. C.; LEVINSON, W.; MONTANARO, A. Sporotrichosis in the acquired immunodeficiency syndrome. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 21, n. 5, p. 1145-1147, 1989.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**: Guanabara Koogan, 2004

SONG, Y.; LI, S. S.; ZHONG, S. X.; LIU, Y. Y.; YAO, L.; HUO, S. S. Report of 457 sporotrichosis cases from Jilin province, northeast China, a serious endemic region. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 27, n. 3, p. 313-318, 2013.

STALKUP, J. R.; BELL, K.; ROSEN, T. Disseminated cutaneous sporotrichosis treated with itraconazole. **Cutis**, v. 69, n. 5, p. 371-374, 2002.

STEVENS, D. A.; CLEMONS, K. V.; LIU, M. Developing a vaccine against aspergillosis. **Medical mycology**, v. 49, n. Supplement\_1, p. S170-S176, 2011.

STUEHLER, C.; KHANNA, N.; BOZZA, S.; ZELANTE, T.; MORETTI, S.; KRUHM, M.; LURATI, S.; CONRAD, B.; WORSCHKECH, E.; STEVANOVIĆ, S. Cross-protective T H 1 immunity against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. **Blood**, v. 117, n. 22, p. 5881-5891, 2011.

SUBSECRETARIA DE VIGILÂNCIA, FISCALIZAÇÃO SANITÁRIA E CONTROLE DE ZOOSE DA PREFEITURA DO RIO DE JANEIRO. Atendimento a esporotricose cresce 400%. Disponível em <[http://www.rio.rj.gov.br/web/vigilanciasanitaria/exibeco\\_novo?id=6728166](http://www.rio.rj.gov.br/web/vigilanciasanitaria/exibeco_novo?id=6728166)>. Acesso em: 01 de dez. 2017.

SUN, J. N.; SOLIS, N. V.; PHAN, Q. T.; BAJWA, J. S.; KASHLEVA, H.; THOMPSON, A.; LIU, Y.; DONGARI-BAGTZOGLOU, A.; EDGERTON, M.; FILLER, S. G. Host cell invasion and virulence mediated by *Candida albicans* Ssa1. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 11, p. e1001181, 2010.

TABORDA, C. P.; JULIANO, M. A.; PUCCIA, R.; FRANCO, M.; TRAVASSOS, L. R. Mapping of the T-Cell Epitope in the Major 43-Kilodalton Glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* Which Induces a Th-1 Response Protective against Fungal Infection in BALB/c Mice. **Infection and immunity**, v. 66, n. 2, p. 786-793, 1998.

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

TACHIBANA, T.; MATSUYAMA, T.; MITSUYAMA, M. Involvement of CD4+ T cells and macrophages in acquired protection against infection with *Sporothrix schenckii* in mice. **Medical mycology**, v. 37, n. 6, p. 397-404, 1999.

TACHIBANA, T.; MATSUYAMA, T.; ITO, M.; MITSUYAMA, M. *Sporothrix schenckii* thermo-intolerant mutants losing fatal visceral infectivity but retaining high cutaneous infectivity. **Medical mycology**, v. 39, n. 3, p. 295-298, 2001.

TEIXEIRA, M. M.; DE ALMEIDA, L. G.; KUBITSCHKE-BARREIRA, P.; ALVES, F. L.; KIOSHIMA, É. S.; ABADIO, A. K.; FERNANDES, L.; DERENGOWSKI, L. S.; FERREIRA, K. S.; SOUZA, R. C.

Comparative genomics of the major fungal agents of human and animal Sporotrichosis: *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 943, 2014.

TEIXEIRA, P. A. C.; DE CASTRO, R. A.; FERREIRA, F. R. L.; CUNHA, M. M. L.; TORRES, A. P.; PENHA, C. V. L. Y.; ROZENTAL, S.; LOPES-BEZERRA, L. M. L-DOPA accessibility in culture medium increases melanin expression and virulence of *Sporothrix schenckii* yeast cells. **Medical mycology**, v. 48, n. 5, p. 687-695, 2010.

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

THOMPSON, D.; KAPLAN, W. Laboratory-acquired sporotrichosis. **Sabouraudia**, v. 15, n. 2, p. 167-170, 1977.

TOLEDO, M. S.; TAGLIARI, L.; SUZUKI, E.; SILVA, C. M.; STRAUS, A. H.; TAKAHASHI, H. K. Effect of anti-glycosphingolipid monoclonal antibodies in pathogenic fungal growth and differentiation. Characterization of monoclonal antibody MEST-3 directed to Manp  $\alpha 1 \rightarrow 3$ Manp  $\alpha 1 \rightarrow 2$ IPC. **BMC microbiology**, v. 10, n. 1, p. 47, 2010.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**: Atheneu, 2004

TRAVASSOS, L. R.; RITTNER, G. M.; TABORDA, C. P. Paracoccidioidomycosis: advance towards a molecular vaccine. In: (Ed.). **Molecular Vaccines**: Springer, 2013, p.257-268.

TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Linear epitopes of *Paracoccidioides brasiliensis* and Other Fungal Agents of Human Systemic Mycoses As vaccine Candidates. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n., p., 2017.

TSUBOI, R.; SANADA, T.; TAKAMORI, K.; OGAWA, H. Isolation and properties of extracellular proteinases from *Sporothrix schenckii*. **Journal of bacteriology**, v. 169, n. 9, p. 4104-4109, 1987.

UENOTSUCHI, T.; TAKEUCHI, S.; MATSUDA, T.; URABE, K.; KOGA, T.; UCHI, H.; NAKAHARA, T.; FUKAGAWA, S.; KAWASAKI, M.; KAJIWARA, H. Differential induction of Th1-prone immunity by human dendritic cells activated with *Sporothrix schenckii* of cutaneous and visceral origins to determine their different virulence. **International immunology**, v. 18, n. 12, p. 1637-1646, 2006.

UPADHYA, R.; LAM, W. C.; MAYBRUCK, B.; SPECHT, C. A.; LEVITZ, S. M.; LODGE, J. K. Induction of protective immunity to cryptococcal infection in mice by a heat-killed, chitosan-deficient strain of *Cryptococcus neoformans*. **MBio**, v. 7, n. 3, p. e00547-00516, 2016.

VARTIVARIAN, S. Virulence properties and nonimmune pathogenetic mechanisms of fungi. **Clinical infectious diseases**, v. 14, n. Supplement\_1, p. S30-S36, 1992.

VERDAN, F.; FALEIROS, J.; FERREIRA, L.; MONNAZZI, L.; MAIA, D.; TANSINE, A.; PLACERES, M.; CARLOS, I. Z.; SANTOS-JUNIOR, R. Dendritic cell are able to differentially recognize *Sporothrix schenckii* antigens and promote Th1/Th17 response in vitro. **Immunobiology**, v. 217, n. 8, p. 788-794, 2012.

VILELA, R.; SOUZA, F.; COTA, G. F.; MENDOZA, L. Cutaneous and menigeal sporotrichosis in a HIV patient. **Revista iberoamericana de micologia**, v. 24, n. 2, p. 161, 2007.

WALSH, T. J.; ANAISSIE, E. J.; DENNING, D. W.; HERBRECHT, R.; KONTOYIANNIS, D. P.; MARR, K. A.; MORRISON, V. A.; SEGAL, B. H.; STEINBACH, W. J.; STEVENS, D. A. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. 3, p. 327-360, 2008.

WANG, P.; SIDNEY, J.; DOW, C.; MOTHE, B.; SETTE, A.; PETERS, B. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. **PLoS computational biology**, v. 4, n. 4, p. e1000048, 2008.

WANG, P.; SIDNEY, J.; KIM, Y.; SETTE, A.; LUND, O.; NIELSEN, M.; PETERS, B. Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. **BMC bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 568, 2010.

WÜTHRICH, M.; DEEPE JR, G. S.; KLEIN, B. Adaptive immunity to fungi. **Annual review of immunology**, v. 30, n., p. 115-148, 2012.

WÜTHRICH, M.; BRANDHORST, T. T.; SULLIVAN, T. D.; FILUTOWICZ, H.; STERKEL, A.; STEWART, D.; LI, M.; LERKSUTHIRAT, T.; LEBERT, V.; SHEN, Z. T. Calnexin induces expansion of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells that confer immunity to fungal *ascomycetes* via conserved epitopes. **Cell host & microbe**, v. 17, n. 4, p. 452-465, 2015.

XANDER, P.; VIGNA, A. F.; DOS SANTOS FEITOSA, L.; PUGLIESE, L.; BAILÃO, A. M.; DE ALMEIDA SOARES, C. M.; MORTARA, R. A.; MARIANO, M.; LOPES, J. D. A surface 75-kDa protein with acid phosphatase activity recognized by monoclonal antibodies that inhibit *Paracoccidioides brasiliensis* growth. **Microbes and infection**, v. 9, n. 12, p. 1484-1492, 2007.

ZHANG, G. L.; SRINIVASAN, K. N.; VEERAMANI, A.; AUGUST, J. T.; BRUSIC, V. PRED BALB/c: a system for the prediction of peptide binding to H2 d molecules, a haplotype of the BALB/c mouse. **Nucleic acids research**, v. 33, n. suppl\_2, p. W180-W183, 2005.

ZHANG, H.; JIA, C.; XI, H.; LI, S.; YANG, L.; WANG, Y. Specific inhibition of *Candida albicans* growth in vitro by antibodies from experimental *Candida keratitis* mice. **Experimental eye research**, v. 93, n. 1, p. 50-58, 2011.

ZHANG, S.; HACHAM, M.; PANEPINTO, J.; HU, G.; SHIN, S.; ZHU, X.; WILLIAMSON, P. R. The Hsp70 member, Ssa1, acts as a DNA-binding transcriptional co-activator of laccase in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1090-1101, 2006.

ZHANG, Y.; PYLA, V. Sweet's syndrome-like sporotrichosis. **International journal of dermatology**, v. 53, n. 5, p., 2014.

ZHANG, Y.; HAGEN, F.; STIELOW, B.; RODRIGUES, A.; SAMERPITAK, K.; ZHOU, X.; FENG, P.; YANG, L.; CHEN, M.; DENG, S. Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14 000 human and animal case reports. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 35, n., p. 1, 2015.

ZHENG, M.; RAMSAY, A. J.; ROBICHAUX, M. B.; NORRIS, K. A.; KLIMENT, C.; CROWE, C.; RAPAKA, R. R.; STEELE, C.; MCALLISTER, F.; SHELLITO, J. E. CD4<sup>+</sup> T cell-independent DNA vaccination against opportunistic infections. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 12, p. 3536, 2005.

## 8. ANEXOS



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

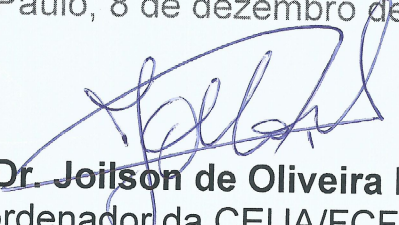
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 95.2015-P513

## CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, **CERTIFICA** que o Projeto de Pesquisa "**Caracterização e avaliação da capacidade protetora dos peptídeos imunogênicos de *Sporothrix brasiliensis***" (Protocolo CEUA/FCF/513), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **José Roberto Fogaça de Almeida**, sob orientação do(a) **Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de **04 de dezembro de 2015**. Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 8 de dezembro de 2015.



**Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins**  
Coordenador da CEUA/FCF/USP



**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**  
**Documento sem validade oficial**  
**FICHA DO ALUNO**

---

**9142 - 7747955/1 - José Roberto Fogaça de Almeida**

**Email:** joalmeida@usp.br  
**Data de Nascimento:** 22/11/1988  
**Cédula de Identidade:** RG - 34.019.325-6 - SP  
**Local de Nascimento:** Estado de São Paulo  
**Nacionalidade:** Brasileira  
**Graduação:** Farmacêutico - Universidade São Judas Tadeu - São Paulo - Brasil - 2011  
**Mestrado:** Mestre em Ciências - Área: Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2013

---

**Curso:** Doutorado  
**Programa:** Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)  
**Área:** Fisiopatologia  
**Data de Matrícula:** 03/12/2013  
**Início da Contagem de Prazo:** 03/12/2013  
**Data Limite para o Depósito:** 04/12/2017  
**Orientador:** Prof(a). Dr(a). Sandro Rogerio de Almeida - 10/08/2016 até o presente. Email: sandroal@usp.br  
**Proficiência em Línguas:** Inglês, Aprovado em 03/12/2013  
**Data de Aprovação no Exame de Qualificação:** Aprovado em 16/02/2016  
**Data do Depósito do Trabalho:**  
**Título do Trabalho:**  
**Data Máxima para Aprovação da Banca:**  
**Data de Aprovação da Banca:**  
**Data Máxima para Defesa:**  
**Data da Defesa:**  
**Resultado da Defesa:**  
**Histórico de Ocorrências:** Primeira Matrícula em 03/12/2013

---

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

**Última ocorrência:** Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

**Impresso em:** 03/12/2017 22:53:29



**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

**Documento sem validade oficial**

**FICHA DO ALUNO**

**9142 - 7747955/1 - José Roberto Fogaça de Almeida**

| Sigla                 | Nome da Disciplina                                                                                                                                                                                                                                                                           | Início     | Término    | Carga Horária | Cred. | Freq. | Conc. | Exc. | Situação  |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|---------------|-------|-------|-------|------|-----------|
| FBC5813-4/1           | Aplicações de Cromatografia e Espectrometria de Massas em Análises Toxicológicas                                                                                                                                                                                                             | 11/03/2014 | 14/04/2014 | 60            | 4     | 100   | A     | N    | Concluída |
| QBQ5802-4/2           | Metodologias em Bioquímica e Biologia Molecular: Conceitos e Aplicações (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)                                                                                                                                                                   | 11/03/2014 | 21/04/2014 | 60            | 4     | 100   | A     | N    | Concluída |
| FBC5748-4/1           | Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação                                                                                                                                                                                                                                            | 08/04/2014 | 19/05/2014 | 60            | 4     | 100   | A     | N    | Concluída |
| BMP5773-3/1           | Bases Imunológicas da Relação Parasita-Hospedeiro (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)                                                                                                                                                                             | 04/03/2015 | 29/04/2015 | 120           | 8     | 100   | A     | N    | Concluída |
| Atividade do Programa | Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC0415 Fisiopatologia I, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1) | 01/07/2015 | 30/11/2015 | -             | 3     | -     | -     | -    | -         |

|                     | Créditos mínimos exigidos  |                       | Créditos obtidos |
|---------------------|----------------------------|-----------------------|------------------|
|                     | Para exame de qualificação | Para depósito de tese |                  |
| <b>Disciplinas:</b> | 0                          | 20                    | 23               |
| <b>Estágios:</b>    |                            |                       |                  |
| <b>Total:</b>       | 0                          | 20                    | 23               |

**Créditos Atribuídos à Tese: 167**

**Observações:**

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 08/03/2017.

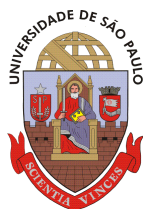
**Conceito a partir de 02/01/1997:**

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

**Última ocorrência:** Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

**Impresso em:** 03/12/2017 22:53:29



**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**  
**Documento sem validade oficial**  
**FICHA DO ALUNO**

---

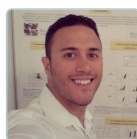
**9142 - 7747955/1 - José Roberto Fogaça de Almeida**

| Comissão julgadora da tese de doutorado: |                           |           |            |
|------------------------------------------|---------------------------|-----------|------------|
| NUSP                                     | Nome                      | Vínculo   | Função     |
| 3442534                                  | Sandro Rogerio de Almeida | FCF - USP | Presidente |

---

**Última ocorrência:** Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

**Impresso em:** 03/12/2017 22:53:29

**José Roberto Fogaça de Almeida**Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/0260987577468436>

Última atualização do currículo em 03/12/2017

**Resumo informado pelo autor**

Graduado em Farmácia pela Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade São Judas Tadeu (2010) e Mestrado em Ciências pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (2013). Atualmente é aluno de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmácia no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas na Universidade de São Paulo / FCF-USP. Possui experiência na área de Microbiologia (ênfase em Micologia Clínica) e Imunologia. Atuando principalmente nos seguintes temas: Sporothrix spp., Paracoccidioides brasiliensis, resposta imune inata e adaptativa contra fungo, macrófagos, vacinas e imunoproteômica

**(Texto informado pelo autor)****Dados pessoais**

**Nome** José Roberto Fogaça de Almeida

**Filiação** Wilson Roberto de Almeida e Julia Fogaça da Silva de Almeida

**Nascimento** 22/11/1988 - Guarulhos/SP - Brasil

**Carteira de Identidade** 340193256 SSP - SP - 06/04/2004

**CPF** 365.715.728-00

**Formação acadêmica/titulação**

- 2013** Doutorado em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia).  
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil  
Título: Caracterização e avaliação da capacidade protetora dos peptídeos imunogênicos de Sporothrix brasiliensis  
Orientador: Prof. Dr. Sandro Rogerio de Almeida   
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2011 - 2013** Mestrado em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia).  
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil  
Título: Avaliação da virulência e da resposta imune de diferentes espécies de Sporothrix sp. na esporotricose experimental, Ano de obtenção: 2013  
Orientador: Prof. Dr. Sandro Rogerio de Almeida   
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2007 - 2010** Graduação em Farmácia.  
Universidade São Judas Tadeu, USJT, São Paulo, Brasil  
Título: Verificação da atividade antimicrobiana in vitro do extrato da casca da Schinus terebinthifolius Raddi sobre o Staphylococcus sp  
Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Lunardello

**Atuação profissional****1. Hospital das Clínicas - HC****Vínculo institucional**

- 2008 - 2009** Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Estagiário de farmácia , Carga horária: 30, Regime: Parcial  
Outras informações:  
Triagem de prescrições médicas para internações e para altas hospitalares seguido da atenção farmacêutica. Avaliação, separação e distribuição de medicamentos e outros produtos farmacêuticos, segundo as prescrições e requisições enviadas pelas unidades de internação e do ambulatório.

**2. Drogasil S. A - DROGASIL****Vínculo institucional**

- 2007 - 2008** Vínculo: CLT , Enquadramento funcional: Auxiliar de farmácia , Carga horária: 48, Regime: Integral  
Outras informações:  
Atendimento ao cliente, atenção farmacêutica e dispensação de medicamentos comuns e de controle especial que estão regidos pela portaria 344/98.

**3. Universidade de São Paulo - USP****Vínculo institucional**

- 2015 - 2015** Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Monitor , Carga horária: 6, Regime: Parcial  
Outras informações:

Programa de Aperfeiçoamento de Ensino - PAE - Estágio em Docência junto à disciplina de graduação FBC0415 - "Fisiopatologia I"

- 2013 - Atual** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Aluno de Doutorado , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva  
Outras informações:  
Realização do projeto de pesquisa intitulado "Caracterização e avaliação da capacidade protetora dos peptídeos imunogênicos de *Sporothrix brasiliensis*"
- 2012 - 2012** Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Monitor, Regime: Parcial  
Outras informações:  
Programa de Aperfeiçoamento de Ensino - PAE - Estágio em Docência junto à disciplina de graduação FBC 0517 - "Diagnóstico Laboratorial das Doenças Infecciosas e Parasitárias".
- 2011 - 2013** Vínculo: Bolsista CNPq , Enquadramento funcional: Aluno de mestrado , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva  
Outras informações:  
Realização do projeto de pesquisa intitulado "Avaliação da virulência e da resposta imune de diferentes espécies de *Sporothrix* sp. na esporotricose experimental"

#### 4. Diagnósticos da América S. A. - DASA

#### Vínculo institucional

- 2009 - 2011** Vínculo: CLT , Enquadramento funcional: Especialista de Laboratório Clínico , Carga horária: 40, Regime: Integral  
Outras informações:  
Triagem e análise microbiológica dos materiais clínicos. Coloração e leitura de bacterioscopias, bacioscopias assim como a realização de micológicos diretos. Interpretação e realização de testes de sensibilidade automáticos e manuais a agentes antimicrobianos. Liberação de resultados parciais e finais. Participação ativa no diagnóstico de infecções bacterianas e fúngicas.

## Áreas de atuação

1. Micologia Clínica
2. Imunologia
3. Microbiologia
4. Imunologia de micoses

## Produção

#### Produção bibliográfica

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. [doi](#) KAIHAMI, GILBERTO HIDEO; BREDI, LEANDRO CARVALHO DANTAS; **DE ALMEIDA, JOSÉ ROBERTO FOGAÇA**; DE OLIVEIRA PEREIRA, THAYS; NICASTRO, GIANLUCCA GONÇALVES; BOECHAT, ANA LAURA; DE ALMEIDA, SANDRO ROGÉRIO; BALDINI, REGINA LÚCIA  
The atypical response regulator AtvR is a new player in *Pseudomonas aeruginosa* response to hypoxia and virulence. INFECTION AND IMMUNITY. [JCR](#), v.85, p.IA1.00207-17 - , 2017.
2. [doi](#) ROMERA, LAV?NIA MARIA DAL?MAS; KAIHAMI, GILBERTO HIDEO; JANNUZZI, GRASIELLE PEREIRA; **DE ALMEIDA, JOSÉ ROBERTO FOGAÇA**; DE ALMEIDA, SANDRO ROGÉRIO  
The Critical Role of Notch1?TLR 4 Signaling in the Inflammatory and Fungicidal Activity of Macrophages Against Paracoccidioides brasiliensis Strain Pb18. MYCOPATHOLOGY. [JCR](#), v.3, p.123 - , 2017.
3. [doi](#) ALMEIDA, J. R. F.; SANTIAGO, K. L.; KAIHAMI, G. H.; MARANHÃO, A. Q.; BRIGIDO, M. M.; ALMEIDA, S. R.  
The Efficacy of Humanized Antibody against the *Sporothrix* Antigen, gp70, in Promoting Phagocytosis and Reducing Disease Burden. Frontiers in Microbiology. [JCR](#), v.8, p.345 - , 2017.
4. [doi](#) JANNUZZI, GRASIELLE PEREIRA; SOUZA, NICOLE DE ARAÚJO; FRANÇOZO, KÁTIA SANCHES; PEREIRA, RONEY HENRIQUE; SANTOS, RAQUEL POSSEMOZER; KAIHAMI, GILBERTO HIDEO; **ALMEIDA, JOSÉ ROBERTO FOGAÇA DE**; BATISTA, WAGNER LUIZ; AMARAL, ANDRÉ CORRÊA; MARANHÃO, ANDRÉA QUEIROZ; ALMEIDA, SANDRO ROGÉRIO DE; FERREIRA, KAREN SPADARI  
Therapeutic treatment with scFv-PGLA nanoparticles decreases pulmonary fungal load in a murine model of Paracoccidioidomycosis. MICROBES AND INFECTION. [JCR](#), v.1, p.1 - , 2017.
5. [doi](#) JANNUZZI, GRASIELLE PEREIRA; TAVARES, ALDO HENRIQUE F. P.; KAIHAMI, GILBERTO HIDEO; **DE ALMEIDA, JOSÉ ROBERTO FOGAÇA**; DE ALMEIDA, SANDRO ROGÉRIO; FERREIRA, KAREN SPADARI  
scFv from Antibody That Mimics gp43 Modulates the Cellular and Humoral Immune Responses during Experimental Paracoccidioidomycosis. Plos One. [JCR](#), v.10, p.e0129401 - , 2015.
6. [doi](#) KAIHAMI, GILBERTO HIDEO; **ALMEIDA, JOSÉ ROBERTO FOGAÇA DE**; SANTOS, SUELEN SILVANA DOS; **NETTO, LUIS EDUARDO SOARES**; ALMEIDA, SANDRO ROGÉRIO DE; BALDINI, REGINA LÚCIA  
Involvement of a 1-Cys Peroxiredoxin in Bacterial Virulence. PLoS Pathogens (Online). [JCR](#), v.10, p.e1004442 - , 2014.
7. [doi](#) **DE ALMEIDA, J. R. F.**; KAIHAMI, G. H.; JANNUZZI, G. P.; **DE ALMEIDA, S. R.**  
Therapeutic vaccine using a monoclonal antibody against a 70-kDa glycoprotein in mice infected with highly virulent *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. Medical Mycology (Oxford, Print). [JCR](#), v.53, p.42 - 50, 2014.

#### Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. JANNUZZI, G. P.; ALMEIDA, J. R. F.; ALMEIDA, S. R.; FERREIRA, K. S.  
Therapy with scfv transfected-dendritic cells induce a decrease levels of specific IgG2b upon Paracoccidioides brasiliensis infection In: XVIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2013, São Paulo.  
**Brazilian journal of pharmaceutical sciences.** São paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas/USP, 2013. v.49. p.55 - 55
2. ALMEIDA, J. R. F.; JANNUZZI, G. P.; KAIHAMI, G. H.; SANTIAGO, K. L.; ALMEIDA, S. R.  
Virulence and immune response activation in experimental sporotrichosis induced by different *Sporothrix* strains In: XVIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2013, São Paulo.  
**Brazilian journal of pharmaceutical sciences.** São paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas/USP, 2013. v.49. p.12 - 12
3. ALMEIDA, J. R. F.; JANNUZZI, G. P.; KAIHAMI, G. H.; SANTIAGO, K. L.; ALMEIDA, S. R.

- Virulence and immune response induced by different *Sporothrix* strains in experimental sporotrichosis In: 1st International Meeting on Sporothrix and Sporotrichosis, 2013, Rio de Janeiro.
- 1º International Meeting on Sporothrix and Sporotrichosis.** Rio de Janeiro: Letra Capital, 2013. v.P017. p.70 - 70
4. ALMEIDA, J. R. F.; JANNUZZI, G. P.; KAIHAMI, G. H.; ALMEIDA, S. R. Comparison of virulence and immune response of different strains in experimental sporotrichosis In: XXXVII Congress of the Brazilian Society of Immunology V extra section of clinical immunology, 2012, Campos do Jordão. **IMMUNOLOGY OF INFECTIOUS AND PARASITIC DISEASES.**, 2012.
  5. JANNUZZI, G. P.; ALMEIDA, J. R. F.; ALMEIDA, S. R.; FERREIRA, K. S. Phenotypic characterization of dendritic cells transfected with SCFV derived from monoclonal anti-idiotypic antibody Ab2-beta, which mimics the antigen Gp43 *Paracoccidioides brasiliensis* In: XVII Pharmaceutical Science and Technology Meeting, 2012, São paulo. **Brazilian journal of pharmaceutical sciences.** São paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas/USP, 2012. v.48. p.44 - 44
  6. KAIHAMI, G. H.; SANTOS, S. S.; ALMEIDA, J. R. F.; ALMEIDA, S. R.; BALDINI, R. L. *Pseudomonas aeruginosa* 1-cys peroxiredoxin Isfa is involved in virulence In: XXXVII Congress of the Brazilian Society of Immunology V extra section of clinical immunology, 2012, Campos do Jordão. **IMMUNOLOGY OF INFECTIOUS AND PARASITIC DISEASES.**, 2012.
  7. JANNUZZI, G. P.; ALMEIDA, J. R. F.; ALMEIDA, S. R.; FERREIRA, K. S. Therapy with SCFV transfected-dendritic cells induce a decrease levels of specific IgG upon *paracoccidioides brasiliensis* infection In: XXXVII Congress of the Brazilian Society of Immunology V extra section of clinical immunology, 2012, Campos do Jordão. **IMMUNOLOGY OF INFECTIOUS AND PARASITIC DISEASES.**, 2012.
  8. ALMEIDA, J. R. F.; JANNUZZI, G. P.; ALMEIDA, S. R. TH1/TH2 Immune response in experimental sporotrichosis In: XVII Pharmaceutical Science and Technology Meeting, 2012, São paulo. **Brazilian journal of pharmaceutical sciences.** São paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas/USP, 2012. v.48. p.72 - 72

#### Produção técnica

#### Demais produções técnicas

1. ALMEIDA, JOSÉ ROBERTO FOGAÇA DE; JANNUZZI, G. P. **Micologia clínica**, 2017. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)
2. ALMEIDA, JOSÉ ROBERTO FOGAÇA DE **SBM-especialização em microbiologia clínica**, 2016. (Especialização, Curso de curta duração ministrado)
3. ALMEIDA, J. R. F. **SBM-Especialização em microbiologia clínica**, 2015. (Especialização, Curso de curta duração ministrado)

## Eventos

#### Eventos

#### Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **HFP 2017. Human Fungal Pathogens. France**, 2017. (Congresso)  
The immunogenic *Sporothrix brasiliensis* peptides promoted proliferation in CD3CD4 cells, being vaccine candidates in experimental sporotrichosis.
2. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **Cell Symposia: 100 Years of Phagocytes. Italy**, 2016. (Congresso)  
Identification of immunogenic peptides from *Sporothrix brasiliensis*: Possible candidates for a vaccine in experimental sporotrichosis.
3. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **IMMUNO 2016. XLI Congress of the Brazilian Society of Immunology**, 2016. (Congresso)  
Immunoproteomics of *Sporothrix brasiliensis* for the vaccine development.
4. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XLI Congress of the Brazilian Society of Immunology 2016**, 2016. (Congresso)  
Immunoproteomics of *Sporothrix brasiliensis* for the vaccine development.
5. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **28º Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 2015. (Congresso)  
CHARACTERIZATION OF IMMUNOGENIC PEPTIDES FROM OF *SPOROTHRIX BRASILIENSIS*.
6. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XL Congress of the Brazilian Society of Immunology**, 2015. (Congresso)  
IDENTIFICATION OF IMMUNOGENIC PEPTIDES FROM *SPOROTHRIX BRASILIENSIS*.
7. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XX Semana Farmacêutica De Ciências e Tecnologia**, 2015. (Congresso)  
Characterization of Immunogenic Peptides From *Sporothrix brasiliensis*.
8. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **1st International Meeting on Sporothrix and Sporotrichosis UERJ**, 2013. (Encontro)  
Virulence and immune response induced by different *Sporothrix* strains in experimental sporotrichosis.
9. **V Simpósio da Pós-Graduação em Análises Clínicas USP**, 2013. (Simpósio)
10. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XVIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia USP**, 2013. (Outra)  
Therapy with scfv transfected-dendritic cells induce a decrease levels of specific IgG2b upon *Paracoccidioides brasiliensis* infection.
11. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XVIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia USP**, 2013. (Outra)  
Virulence and immune response activation in experimental sporotrichosis induced by different *Sporothrix* strains.
12. **IV Simpósio da Pós-Graduação em Análises Clínicas USP**, 2012. (Simpósio)
13. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XVII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia USP**, 2012. (Outra)  
TH1/TH2 Immune response in experimental sporotrichosis.
14. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XXXVII Congress of Brazilian Society of Immunology/ V Extra Section of clinical immunology**, 2012. (Congresso)  
Comparison of virulence and immune response of different strains in experimental sporotrichosis.
15. **XII Expofarma e XIII Jofarma USJT**, 2010. (Outra)

16. Simpósio de atualização em farmacologia clínica USJT, 2009. (Simpósio)

#### Citações

 Web of Science

Total de trabalhos: 6

Total de citações: 22

Fator H: 2

Almeida, José Roberto Fogaça

#### Totais de produção

##### Produção bibliográfica

|                                           |   |
|-------------------------------------------|---|
| Artigos completos publicados em periódico | 7 |
| Trabalhos publicados em anais de eventos  | 8 |

##### Produção técnica

|                                                    |   |
|----------------------------------------------------|---|
| Curso de curta duração ministrado (extensão)       | 1 |
| Curso de curta duração ministrado (especialização) | 2 |

##### Eventos

|                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| Participações em eventos (congresso) | 8 |
| Participações em eventos (simpósio)  | 3 |
| Participações em eventos (encontro)  | 1 |
| Participações em eventos (outra)     | 4 |

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 03/12/2017 às 23:06:29.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

d279c de Almeida, José Roberto Fogaça  
Caracterização e avaliação da capacidade protetora dos peptídeos imunogênicos de *Sporothrix brasiliensis* / José Roberto Fogaça de Almeida. - São Paulo, 2017.  
93 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Orientador: de Almeida, Sandro Rogério

1. *Sporothrix brasiliensis*. 2. Esporotricose. 3. Vacina. 4. Imunoproteômica. I. T. II. de Almeida, Sandro Rogério, orientador.