

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Tese** será disponibilizado somente a partir de 25/11/2021.



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas Campus de Araraquara

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

JULIANA APARECIDA JELLMAYER

**Avaliação de células dendríticas ativadas
como tratamento da esporotricose murina
em modelo experimental**

ARARAQUARA – SP
2019



JULIANA APARECIDA JELLMAYER

Avaliação de células dendríticas ativadas como tratamento da esporotricose murina em modelo experimental

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, como pré-requisito para a obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área de concentração: Imunologia Clínica.

Orientador: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

Coorientador: Prof. Dr. Alexander Batista Duharte

ARARAQUARA – SP
2019

J49a Jellmayer, Juliana Aparecida.
Avaliação de células dendríticas ativadas como tratamento da esporotricose murina em modelo experimental / Juliana Aparecida Jellmayer. – Araraquara: [S.n.], 2019.
86 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Concentração Análises Clínicas: Imunologia Clínica.

Orientadora: Iracilda Zeppone Carlos.
Coorientador: Alexander Batista Duharte.

1. *Sporothrix schenckii*. 2. Vacina. 3. Células dendríticas. 4. Células dendríticas derivadas da medula óssea. 5. Esporotricose. I. Carlos, Iracilda Zeppone, orient. II. Duharte, Alexander Batista, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7

Esta ficha não pode ser modificada

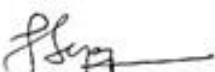


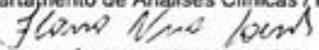
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

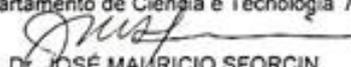
TÍTULO DA TESE: Avaliação de células dendríticas ativadas como tratamento da esporotricose murina em modelo experimental

AUTORA: JULIANA APARECIDA JELLMAYER
ORIENTADORA: IRACILDA ZEPPONE CARLOS
COORDENADOR: ALEXANDER BATISTA DUHARTE

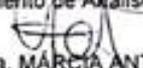
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. IRACILDA ZEPPONE CARLOS
Departamento de Análises Clínicas / FCF - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. FLÁVIO VIEIRA LOURES
Departamento de Ciência e Tecnologia / UNIFESP


Prof. Dr. JOSÉ MAURÍCIO SFORCIN
Departamento de Microbiologia e Imunologia / IB/Botucatu - Unesp


Prof. Dr. PAULO INÁCIO DA COSTA
Departamento de Análises Clínicas / FCF - UNESP - Araraquara


Profa. Dra. MÁRCIA ANTONIAZI MICHELIN
Departamento de Ciências Biológicas / UFTM

Araraquara, 25 de novembro de 2019

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP) com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo 2015/04023-0) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por meio da concessão de Bolsa de Doutorado.



O ESPELHO

Para nos sentirmos bem é preciso
atualizarmos a mente, os pensamentos,
os valores e a forma de encararmos os desafios.
É mais fácil nos revoltarmos contra os outros
do que olharmos para dentro!

Paramos? Retrocedemos? Deixamos de lutar.
Inseguranças cristalizadas, sonhos abandonados,
princípios corrompidos... resultados frustrados.

É hora de trocarmos as roupas,
arrancarmos as máscaras e o mais difícil:
encararmos nós mesmos no espelho da nossa vida.
Olho por olho! Sonho por sonho! Você por Você!

Antes de se entregar à derrota, levante a cabeça,
se dê a oportunidade, vá a luta e coragem
para enfrentar o desconhecido com o pensamento:
EU QUERO, PORTANTO EU FAÇO! E VOCÊ?

(Bento Augusto)

DEDICATÓRIA

Àqueles que são minha essência:

Minha Família

Meus pais, Claudio e Ana

Minhas Irmãs, Jessica e Rainara

Meu Cunhado, Felipe

Minha afilhada, Lara

Meu noivo, Tiago

Eu só tenho a agradecer por ficarem sempre do meu lado, me dando apoio, cuidando de mim e me mostrando o que é o certo e o que é o errado. Palavra nenhuma será capaz de mostrar o quanto eu amo vocês e o quanto eu preciso de vocês ao meu lado. Sou muito grata a Deus pela nossa Família!

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por estar sempre presente em minha vida, iluminando e guiando meus caminhos, pelos obstáculos vencidos e pela certeza de que tudo daria certo.

Aos meus pais, **Cláudio** e **Ana**, por todo incentivo e por não medirem esforços para a realização desta etapa.

Às minhas irmãs **Jessica** e **Rainara** e meu cunhado **Felipe**, por sempre estarem ao meu lado.

Ao meu noivo, **Tiago**, por me apoiar e me fazer feliz.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. **Iracilda Zeppone Carlos**, pelo direcionamento acadêmico durante todos estes anos, pela oportunidade de tornar possível essa conquista acadêmica e pela confiança depositada em mim.

Ao meu Co-orientador Prof, Dr. **Alaxander Batista-Duarte**, por sempre me incentivar, tirar minhas dúvidas, me orientar e estar sempre presente para tudo que preciso.

À técnica do laboratório, **Marisa Campos Polesi Placeres**, pela ajuda durante todas as etapas, pela companhia diária, apoio, carinho e amizade.

Ao amigo de trabalho, **Lucas Souza Ferreira**, pela ajuda nos experimentos e no desenvolvimento da tese e artigos.

À equipe do Laboratório de Imunologia Clínica, **Amanda, Camila, Carol, Deivys, Damiana, Francine** e **Maria Luísa**, pela amizade e pelos momentos compartilhados.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da Bolsa de Doutorado.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Aos **professores** que compõem a banca, pela disposição e interesse em avaliar este trabalho.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, cujos nomes não foram citados, mas sabem da sua importância para que este dia chegasse.

MUITO OBRIGADA A TODOS !!!

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - Graus Celsius
APC - Allophycocyanin
APCs - Células apresentadoras de antígenos
ATCC - American Type Culture Collection
BCA- Método do ácido bicinonínico
BHI - Brain heart infusion
BM- Precusores medula óssea
BMDCs - Células Dendríticas derivadas da Medula Óssea
BSA - Soro albumina bovina
CBA- Cytometric Bead Array
CD - Cluster of Differentiation (Grupo de Diferenciação)
CLR - Lectina-C receptors
CO₂ - Dióxido de Carbono
DAMP - Damage-associated molecular pattern
DCs - Células dendríticas
DC-SIGN- DC-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin
DP - Desvio padrão
DTT - Dithiothreitol (Ditiotreitól)
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FITC - Isotiocianato de fluoresceína
g - Força gravitacional
g - Grama
GM-SCF - Fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos
H - hora
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
H₂SO₄ - Ácido Sulfúrico
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
i.p.- intraperitoneal
IFN- γ - Interferon gama
Ig- Imunoglobulina
IL - Interleucina
kDa - Kilodaltons
LPS - Lipopolissacarídeo
M - Molar
Mg - Miligrama
MHC - Complexo principal de histocompatibilidade
min - Minutos
mL - Mililitro
mM - Milimolar
MR- Receptores de manose
MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
NaOH - Hidróxido de sódio
NK - Natural Killer
NLR- NOD-like
nm - Nanômetro

NO - Óxido Nítrico
NOD - Domínio de oligomerização e ligação de nucleotídeo
PAMPs - Pathogen-associated molecular patterns (Padrões Moleculares Associados ao Patógeno)
PBS - Solução salina tamponada de fosfatos
PE – Ficoeritrina
PE-Cy7 - Phycoerythrin-Cy7
pg - Picogramas
pH - Potencial hidrogeniônico
PI - Iodeto de propídeo
PMSF- Phenylmethylsulfonyl Fluoride (Fluoreto de fenil metil sulfonil)
PRR - Pattern recognition receptor (Receptores de Reconhecimento Padrão)
PSCs - Proteínas da Superfície Celular
RLR- RIG-I-like
Rpm - Rotações por minutos
RPMI- Meios Roswell Park Memorial Institute
SDS - Sodium Dodecyl Sulfate (Dodecil Sulfato de Sódio)
SFB - Soro Fetal Bovino
SSTI - Sporothrix schenckii termo- inativado
TCA - Ácido Tricloroacético
TCR - receptor de células T
TGF- β - Transforming Growth Factor β
Th - Linfócito T helper
TLR - Toll-like receptor
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
Treg - Linfócitos T reguladores
UFC - Unidades formadoras de colônias
 μm - Micrómetro
 μg - Micrograma
 μL - Microlitro
 μmols - Micromols

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição mundial de casos de esporotricose.....	22
Figura 2. Relações filogenéticas entre os membros das Clades – espécies clínicas e ambientais do Complexo <i>Sporothrix</i> com base nas sequências de calmodulina (exão 3-5).....	27
Figuras 3. Manifestações clínicas.....	29
Figura 4. Conjuntivite granulomatosa do olho direito.....	30
Figura 5. Esquema de obtenção e diferenciação de células dendríticas a partir de precursores da medula óssea dos camundongos.....	44
Figura 6. Perfil eletroforético das PSC de <i>Sporothrix schenckii</i>	50
Figura 7. Caracterização fenotípica das células dendríticas diferenciadas a partir de precursores da medula óssea.....	51
Figura 8. Avaliação da viabilidade das células dendríticas.....	52
Figura 9. Microscopia óptica demonstrando a morfologia.....	53
Figura 10. Expressão dos marcadores de ativação das BMDCs, antes e após estimulação com PSC de <i>S. schenckii</i>	54
Figura 11. Quantificação das citocinas no sobrenadante da cultura de BMDCs estimuladas ou não com as PSC de <i>S. schenckii</i>	55
Figura 12. Frequência da expressão de células Th17+ e IFN+ nos esplenócitos após 48h cultura na presença do fungo termo-inativado <i>S. schenckii</i>	57
Figura 13. Quantificação das citocinas no sobrenadante da cultura de esplenócitos após 48h cultura na presença do fungo termo-inativado <i>S. schenckii</i>	59

Figura 14. UFC recuperadas do linfonodo poplíteo e baço de camundongos infectados com <i>S. schenckii</i> após a vacinação com DCs estimuladas ou não com PSC desse fungo.....	60
Figura 15. Quantificação de IgG anti-PSC nas amostras de soro dos animais coletado 14 dias pós-infecção <i>S. schenckii</i> em animais.....	61
Figura 16. Frequência da expressão de células Th IL-17+ e INF+ no linfonodo.....	62
Figura 17. Quantificação das citocinas no sobrenadante da cultura de esplenócitos após 48h cultura na presença do fungo termo-inativado <i>S. schenckii</i>	64

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Casos notificados suspeitos de Esporotricose.....24

Tabela 2 - Dosagem de PSC de *S. schenckii* na fase de crescimento logarítmico.....25

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1 - Frequência (%) de casos confirmados de Esporotricose.....	25
--	----

Sumário

RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1. Esporotricose e epidemiologia.....	21
2.2. O fungo <i>Sporothrix schenckii</i>	26
2.3. Manifestações clínicas.....	28
2.4. Mecanismos envolvidos na resposta imune contra <i>S. schenckii</i>	30
2.5. Aspectos terapêuticos e limitações.....	33
2.6. Células dendríticas (DCs).....	35
2.7. Imunoterapia com DCs.....	37
3. OBJETIVOS.....	39
3.1. Objetivo geral.....	39
3.2. Objetivos específicos.....	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1. Animais.....	40
4.2. Microrganismo e condições de cultivo.....	40
4.3. Extração das proteínas da parede celular do fungo <i>S. schenckii</i>	40
4.4. Separação de proteínas por SDS-PAGE.....	41
4.5. Preparação do fungo <i>S. schenckii</i> termo-inativado (SSTI).....	42
4.6. Obtenção e diferenciação de células dendríticas a partir de precursores da medula óssea dos camundongos (BMDC).....	42
4.7. Estimulação das BMDCs.....	44
4.8. Citometria de fluxo.....	45
4.9. Avaliação da morte celular das células dendríticas.....	45
4.10. Terapia com células dendríticas.....	45
4.10.1. Infecção dos animais.....	45
4.10.2. Obtenção de amostras de soro dos animais.....	46
4.10.3. Quantificação de proteínas IgG anti-parede celular de <i>S. schenckii</i> (PSCs) por ELISA.....	46
4.10.4. Esplenócitos totais.....	47
4.10.5. Análise Th1 e Th17 por citometria de fluxo.....	47

4.10.6. Carga fúngica no baço e linfonodo poplíteo	48
4.10.7. Análise de citocinas relacionadas com Th1 / Th2 / Th17 por meio de citometria de esferas (CBA).....	48
4.11. Análise estatística	48
5. RESULTADOS	49
5.1. Obtenção das proteínas da parede celular do fungo <i>S. schenckii</i>	49
5.2. Obtenção e diferenciação de células dendríticas a partir (BMDC)	51
5.3. Estimulação e imunofenotipagem das BMDCs	54
5.4. Imunização com BMDCs estimuladas com PSC.....	56
5.5. Avaliação da eficácia da vacinação com BMDCs ativadas na terapia da esporotricose experimental em camundongos	60
6. DISCUSSÃO	65
7. CONCLUSÃO	70
8. REFERÊNCIAS.....	71
9. ANEXO	86

RESUMO

A esporotricose é uma micose de distribuição universal causada por fungos termodimórficos do complexo de espécies *Sporothrix schenckii* (*S. schenckii*). No Brasil, a esporotricose é considerada endêmica, sendo normalmente adquirida pela inoculação acidental do seu agente causal através da pele ou através da transmissão zoonótica por gatos infectados. As formas clínicas podem variar entre cutânea, linfocutânea e sistêmica, esta última sendo mais comumente observada em pacientes imunodeprimidos. A ineficácia do tratamento antifúngico contra esta micose, especialmente em pacientes imunocomprometidos, tem levado à busca de terapias mais eficazes e seguras. Com base em vários estudos que mostram a eficiente utilização de células dendríticas como ferramenta para o desenvolvimento de vacinas contra diferentes fungos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade protetora de células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs) ativadas com as proteínas da superfície celular de *S. schenckii* (PSCs) em camundongos infectados com *S. schenckii* strictu sensu. As BMDCs foram estimuladas com PSCs e analisadas quanto à expressão superficial de moléculas co-estimulatórias, bem como à secreção de citocinas pró-inflamatórias. Posteriormente, camundongos sádios foram vacinados com uma ou duas doses de BMDCs para avaliar a sua imunogenicidade e, por último, foi avaliado o efeito das BMDCs em camundongos infectados por *S. schenckii*. Nossos resultados mostram que as PSCs foram capazes de ativar as BMDCs. A imunização de camundongos saudáveis com BMDCs estimulados por PSCs induziu uma resposta imune com perfil Th17, com aumento da frequência de células IL-17A⁺ e da liberação de IL-17 e IL-6. Já a vacinação com BMDCs estimuladas com PSCs nos camundongos infectados com *S. schenckii* levou à redução da carga fúngica no baço desses animais, além do aumento da frequência de células Th IL-17⁺ e Th IFN⁺ e uma maior secreção de IL-10, IL-17 e IFN- γ , induzindo uma resposta Th1/Th17 mista. Como um todo, nossos resultados mostram que a vacinação com BMDCs estimuladas com PSCs foi capaz de conferir proteção nos animais vacinados, o que nos leva a crer que é possível, com os ajustes adequados, utilizar DCs como ferramenta terapêutica contra a esporotricose.

Palavras-chave: *Sporothrix schenckii*, vacina, células dendríticas, células dendríticas derivadas da medula óssea, esporotricose

ABSTRACT

Sporotrichosis is a universally distributed mycosis caused by thermodimorphic fungi of the *Sporothrix schenckii* (*S. schenckii*) species complex. In Brazil, sporotrichosis is considered endemic and is usually acquired by accidental inoculation of its causative agent through the skin or through zoonotic transmission by infected cats. Clinical forms may vary between cutaneous, lymphocutaneous and systemic, the latter being more commonly observed in immunosuppressed patients. The ineffectiveness of antifungal treatment against this mycosis, especially in immunocompromised patients, has led to the search for more effective and safe therapies. Based on several studies showing the efficient use of dendritic cells as a tool for the development of different fungal vaccines, the aim of this work was to evaluate the protective capacity of bone marrow derived dendritic cells (BMDCs) activated with cell surface proteins of *S. schenckii* (ScCWP) in mice infected with *S. schenckii* strictu sensu. The BMDCs were stimulated with PSCs and analyzed for surface expression of costimulatory molecules and the secretion of proinflammatory cytokines. Subsequently, healthy mice were vaccinated with one or two doses of BMDCs to assess their immunogenicity, and finally the effect of BMDCs on *S. schenckii* infected mice was evaluated. Our results show that the ScCWPs were able to activate BMDCs. Immunization of healthy mice with ScCWPs-stimulated BMDCs induced a Th17 profile immune response, with increased Th IL-17A⁺ cell frequency and IL-17 and IL-6 release. Vaccination with ScCWPs-stimulated BMDCs in mice infected with *S. schenckii* led to a reduction in the fungal load in the spleen of these animals, as well as increased frequency of Th IL-17⁺ and Th IFN⁺ cells and increased IL-10, IL-17 and IFN- γ secretion, inducing a mixed Th1/Th17 response. Overall, our results show that vaccination with ScCWPs-stimulated BMDCs was able to provide protection in vaccinated animals, leading us to believe that it is possible, with appropriate adjustments, to use DCs as a therapeutic tool against sporotrichosis.

Keywords: *Sporothrix schenckii*, vaccine, dendritic cells, bone-marrow-derived dendritic cells, sporotrichosis

1. INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas causam prejuízos significativos nos seres humanos e são um problema crescente devido ao aumento da utilização de antifúngicos de amplo espectro e terapias imunossupressoras (Veerdonk *et al.*, 2015), as terapias atuais podem causar diversos efeitos colaterais ao paciente em razão ao seu longo período de tratamento e alta toxicidade dos fármacos utilizados (Rochette *et al.*, 2003). Por esse motivo, muitos estudos vêm sendo realizadas no intuito de desenvolver vacinas contra fungos oportunistas e endêmicos (Cassone, 2008; Edwards, 2012; Portuondo *et al.*, 2016; Ueno, 2016; Spech, 2017).

A esporotricose é uma infecção subaguda ou crônica causada por fungos termodimórficos do gênero *Sporothrix*. Embora a doença tenha uma distribuição geográfica cosmopolita, ocorre principalmente em regiões tropicais e subtropicais e é considerada a micose subcutânea mais frequente na América Latina, sendo endêmica (Orofino-costa, 2017). Normalmente, a infecção se desenvolve após a inoculação traumática de solo contaminado, plantas e matéria orgânica na pele ou mucosa. Alternativamente, a infecção pode ocorrer por transmissão zoonótica, que tem sido principalmente associada com arranhões ou mordidas de gatos infectados (Rodrigues *et al.*, 2016).

Para minimizar os danos causados por infecções fúngicas, o corpo humano desenvolveu um conjunto de mecanismos de defesa únicos e sofisticados, nos quais a imunidade inata do hospedeiro desempenha um papel crucial. As células dendríticas (DC) constituem a primeira linha de defesa em múltiplos órgãos (Zhi Li *et al.*, 2019) e fornecem uma ponte essencial entre a imunidade inata e adaptativa, enquanto seus fortes recursos de ativação imune e propriedades adjuvantes naturais as tornam um veículo valioso para a entrega de antígenos. Elas estão envolvidas na vigilância de vários patógenos e danos ao tecido microambiental e possuem características especializadas que lhes permitem capturar, processar e apresentar antígenos com eficiência, além de serem únicas em seu papel de destaque na ativação, polarização e regulação das respostas imunes adaptativas (Srivastava, 2019; Quinello, 2018; Chen, 2016; Banchereau, 2000).

Muitas proteínas encontradas na parede celular do fungo *Sporothrix schenckii* (*S. schenckii*) são importantes indutores de respostas imunes mediadas por anticorpos e células e, portanto, boas candidatas a estratégias profiláticas e terapêuticas contra a

esporotricose (Alba-Fierro *et al.*, 2014). Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que a imunização com DCs estimuladas com leveduras de *S. schenckii* ou seu exoantígeno foi capaz de induzir *in vitro* uma resposta Th1/ Th17 mista (Verdan *et al.*, 2012), a última desde então associada com controle da infecção por *S. schenckii* in vivo (Ferreira *et al.*, 2015). Posteriormente, duas formulações de vacina à base de PSCs de *S. schenckii* adsorvidas por hidróxido de alumínio foram avaliadas quanto à imunogenicidade e propriedade protetora em um modelo de camundongo com infecção sistêmica por *S. schenckii*, concluindo que ambas as formulações eram imunogênicas e capazes de promover a produção de anticorpos que fornecem proteção após a imunização. (Portuondo *et al.*, 2016). Um número crescente de candidatos à vacina antifúngica está sendo avaliado em estudos pré-clínicos, como parte do interesse renovado no uso potencial de vacinas, para reduzir o uso de drogas antifúngicas e, portanto, limitar a resistência e a toxicidade da droga (Portuondo *et al.*, 2015).

As DCs são atores centrais do sistema imunológico que operam na interface da imunidade inata e adaptativa. As DCs em camundongos e humanos são células profissionais que apresentam antígenos, dotadas da capacidade de estimular células T *naive* e, dependendo do subconjunto de DCs e do tipo de estímulo recebido, as DCs orquestram a natureza das respostas das células T. Ordenados por conjuntos discretos de fatores de transcrição, e dependentes do fator de crescimento de DCs flt3-ligante, os subconjuntos de DCs se desenvolvem a partir de precursores medula óssea (BM) que podem dar origem a DCs convencional (c), aquelas DCs com as habilidades de apresentação de antígeno mais potentes (Macri *et al.*, 2018; Worbs *et al.*, 2017), quando ativadas, carregadas com antígeno, iniciam a diferenciação de células T específicas do antígeno em células T efetoras que exibem funções exclusivas e perfis de citocinas. A maturação de DCs está associada a uma ampla variedade de alterações celulares, incluindo diminuição da atividade de captura de antígenos, aumento da expressão e moléculas de MHC classe II e moléculas co-estimulatórias, aquisição de receptores de quimiocinas que orientam sua migração e a capacidade de secretar diferentes citocinas que controlam a diferenciação de células T (Constantino *et al.*, 2017; Palucka e Banchereau, 2013).

Com o objetivo de desenvolver estratégias alternativas para a terapia da esporotricose, determinar a capacidade que as DCs possuem de transportar antígenos é um ponto de partida promissor (Magalhães, 2012), devido ao seu papel fundamental no sistema imunológico e à capacidade de regular todos os processos relacionados à

imunidade. Nosso estudo teve como objetivo estudar a interação de BMDCs estimuladas com PSCs de *S. schenckii* com a resposta imune gerada contra o fungo em um modelo experimental de esporotricose em camundongo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Esporotricose e epidemiologia

A esporotricose é uma infecção micótica causada pelo gênero *Sporothrix* (Chakrabarti, 2015), que pode evoluir na forma subaguda ou crônica com lesões nodulares cutâneas ou subcutâneas e, com menor frequência disseminada em pessoas com comprometimento imunológico (Barros *et al.*, 2011).

O *S. schenckii* foi isolado pela primeira vez em 1896 por Benjamin Schenck, um estudante de medicina do Hospital Johns Hopkins em Baltimore, onde relatou um paciente de 36 anos, masculino, apresentando lesões na mão e braço direito. O isolado, obtido a partir do abscesso do paciente, em seguida, foi estudado pelo micologista Erwin Smith, que concluiu que o fungo pertencia ao gênero *Sporotrichum* (Barros *et al.*, 2011; Carlos e Batista-Duarte, 2015).

A infecção em humanos é geralmente adquirida pela inoculação traumática do agente na pele, por meio do contato com solos e objetos contaminados ou por arranhadura, mordedura ou contato direto com lesões de gatos infectados e menos comumente, pela inalação de esporos (La Hoz *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2014; Chakrabarti *et al.*, 2015; Rodrigues, 2016). Até surgir a transmissão zoonótica, o contágio se dava pelo contato humano com o fungo, e era associado a ocupações profissionais como jardinagem, agricultura, pecuária e veterinária estão mais associadas à infecção (Marimon *et al.*, 2007; Ramos-e-Silva *et al.*, 2007; Cruz, 2013; Chakrabarti *et al.*, 2015). Epidemias recentes, porém, demonstraram o potencial zoonótico da doença, associando o gato doméstico como a principal fonte de infecção. Em humanos, casos graves de esporotricose são raros, mas no gato doméstico o quadro clínico é bastante diverso, podendo apresentar formas sistêmicas fatais. Embora haja descrição de outros animais como possíveis transmissores da doença, nenhum deles apresenta um potencial zoonótico importante como o do gato (Gremião, 2017).

O *S. schenckii* pode ser encontrado em quase todo o mundo (**Figura 1**), porém as regiões tropicais e subtropicais com alta temperatura e umidade exibem a maior incidência, principalmente na América Latina, Japão, Índia, África do Sul, China e Malásia (Carrada-Bravo e Olveras-Macias, 2013; Bonifaz e Velázquez, 2010; La Hoz; Baddley, 2012; Zhao *et al.*, 2015; Carlos & Batista-Duarte, 2015). Mais

especificamente, entre as diferentes espécies de *Sporothrix*, o *S. globosa* tem sido relatado em vários países com uma frequência muito baixa, sendo prevalente na Ásia, embora sua baixa diversidade genética possa sugerir uma associação com outra fonte de infecção ambiental. O *S. brasiliensis* é descrito como uma espécie altamente virulenta em surtos epidêmicos tanto para humanos quanto para gatos, sendo predominante no sul e sudeste do Brasil. Outra espécie patogênica, *S. luriei*, foi isolada em apenas quatro casos na África do Sul, Itália, Espanha e Índia e de um caso de esporotricose canina. Uma espécie que foi recentemente posicionada no ranking de espécies com base em suas características fenotípicas e análise de sequência multilocus foi a *S. mexicana* que tem sido isolada em um caso clínico em Portugal, três casos no Brasil, e de material vegetal e de solo no México. Finalmente, devemos mencionar *S. pallida*, relatada como causadora de ceratite fúngica em uma úlcera corneana de um caso humano de onicomicose. A *S. pallida* foi isolada no ambiente e atualmente é sinônimo de *S. albicans* (Carlos e Batista-Duharte, 2015; Alba-Fierro *et al.*, 2016).

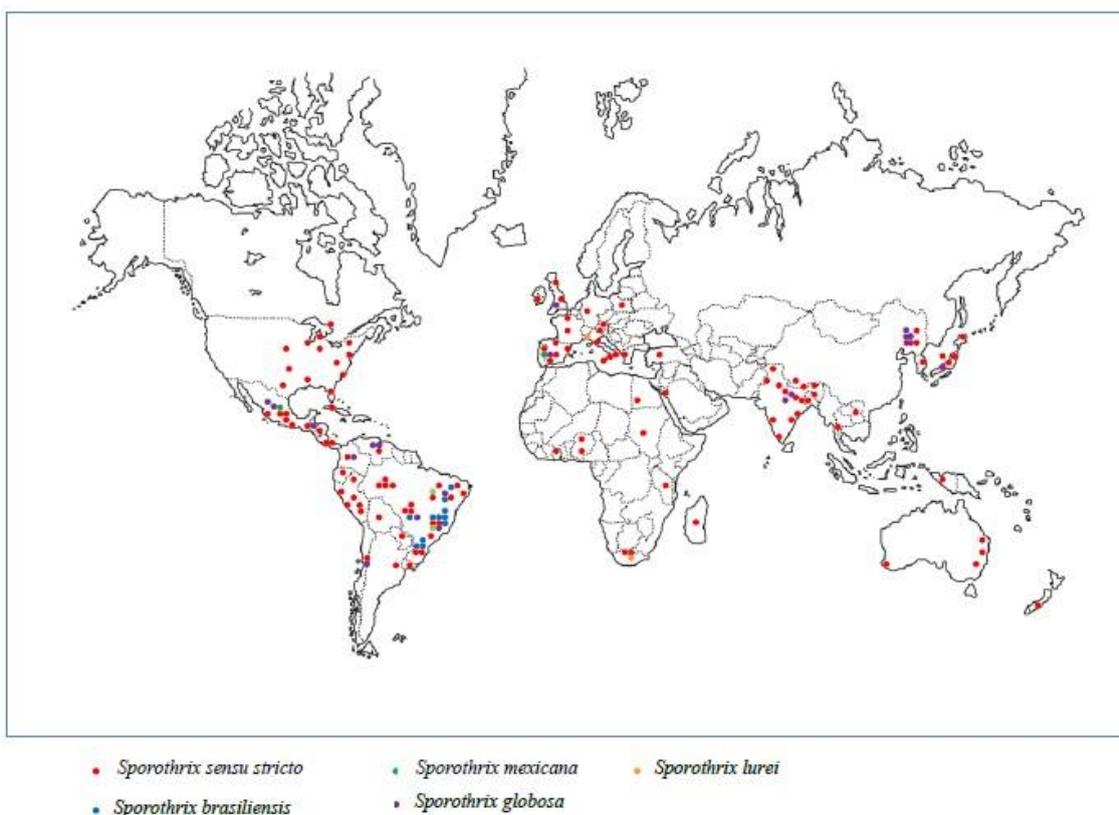


Figura 1. Distribuição mundial de casos de esporotricose. Fonte: Carlos e Batista-Duharte, 2015.

Desde o primeiro caso de esporotricose humana descrita em 1907 por Lutz e Splendore vem ocorrendo um aumento considerável dos casos clínicos. No Brasil, a transmissão zoonótica da esporotricose por gatos atingiu proporções epidêmicas como em nenhum outro lugar e tendo sido reportada de forma crescente ao longo das últimas décadas (Rodrigues *et al.*, 2013), acometendo regiões com dificuldades socioeconômicas e ambientais, envolvendo a transmissão por gatos infectados (Schubach *et al.*, 2008; Barros *et al.*, 2010; Ramos-e-Silva *et al.*, 2012; Chakrabarti *et al.*, 2015). Duas espécies patogênicas têm sido associadas às áreas endêmicas: *S. schenckii* e *S. brasiliensis* (Castro *et al.*, 2013). Casos de esporotricose já foram relatados nos Estados do Rio de Janeiro (Pereira *et al.*, 2014), São Paulo (Montenegro *et al.*, 2014), Rio Grande do Sul (Madrid, 2010; Rodrigues *et al.*, 2014), Minas Gerais (Rodrigues *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2014) e Espírito Santo (Oliveira *et al.*, 2013), vale ressaltar que Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo são estados que fazem divisa com o Rio de Janeiro.

Na cidade do Rio de Janeiro, a doença tem assumido proporções epidêmicas alarmantes (Rodrigues *et al.*, 2013). A sua grande incidência levou a Secretaria Estadual de Saúde deste estado a incluir a esporotricose na lista de doenças de notificação compulsória (publicado no Diário oficial da União em 16 de julho de 2013), no entanto até o momento não é possível conhecer a real incidência ou dimensionar a endemia desta doença nesse estado (Martin, 2014). O risco de contrair a infecção é ainda maior devido ao fato de o gato ser a principal fonte de infecção do fungo, estando vinculado aproximadamente a 91% dos casos de esporotricose em humanos (Cruz, 2013; Freitas *et al.*, 2010, Freitas *et al.*, 2014). A primeira epidemia, de cunho zoonótico, no Brasil, foi descrita neste estado a partir do final da década de 1990, e vem se perpetuando ao longo dos anos. Deste modo, o município do Rio de Janeiro é considerado o epicentro da esporotricose felina no Brasil. Entre os anos 1998 e 2009 o IPEC/Fiocruz diagnosticou a esporotricose em aproximadamente 2200 seres humanos e 3244 gatos. A Clínica Labovet, com sede no Rio de Janeiro, no período 2005 a 2012 analisando por meio de citologia e cultivo de 741 materiais coletados da superfície de lesões cutâneas ulceradas de gatos, identificou a presença de *S. schenckii* em 325 amostras, perfazendo 43,86 % do total (Cruz, 2013). Entre os anos de 2013 e 2014, a Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro analisando o

banco de Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN/RJ), confirmou 830 novos casos, o que evidencia o aumento progressivo da incidência (Ministério da Saúde, 2014). Durante o período de 2015 a 2017 observa-se uma média de 1.097 casos notificados suspeitos de Esporotricose no estado do Rio de Janeiro, com percentuais de confirmação acima de 60%. No início do ano de 2018, até 18 de maio, foram notificados 319 casos suspeitos com um percentual de confirmação de 68,7% (Tabela 1). Destacam-se os percentuais elevados de confirmação da doença, podendo justificar-se tanto por uma facilidade de confirmação dos casos através da história clínica e epidemiológica dos pacientes quanto por uma maior sensibilidade para a notificação dos casos já confirmados da doença (Ministério da Saúde, 2018).

Tabela 1 - Casos notificados suspeitos de Esporotricose, segundo classificação final e ano de início de sintomas, Estado do Rio de Janeiro, anos 2015, 2016, 2017 e 2018*

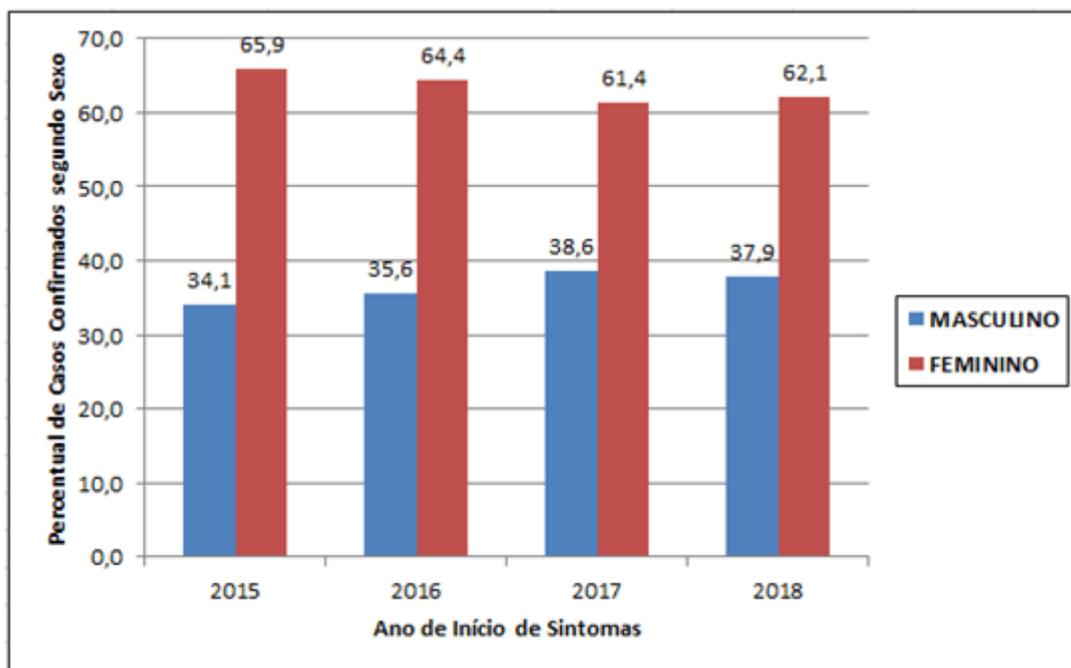
Esporotricose	Casos Confirmados		Casos Descartados		Casos Ignorados/Branco		Total de Casos Notificados Suspeitos
	N	%	N	%	N	%	
2015	792	67,3	30	2,5	355	30,2	1177
2016	1124	75,7	21	1,4	340	22,9	1485
2017	1375	79,0	22	1,3	344	19,8	1741
2018*	219	68,7	1	0,3	99	31,0	319

*2018: até 18 de maio.

Fonte: SINAN, GDTVZ, SES/RJ, dados atualizados em 18 de maio de 2018.

A análise dos casos confirmados entre 2015 e 2018 aponta para uma maior ocorrência da doença em pessoas do sexo feminino: acima de 60% dos casos; podendo refletir um comportamento feminino de maior proximidade com os gatos e, portanto, maior risco de exposição à doença (Gráfico 1) (Ministério da Saúde, 2018).

Gráfico 1 - Frequência (%) de casos confirmados de Esporotricose, segundo sexo e ano de início de sintomas, Estado do Rio de Janeiro, anos 2015, 2016, 2017 e 2018*.



*2018: até 18 de maio.

Fonte: SINAN, GDTVZ, SES/RJ, dados atualizados em 18 de maio de 2018.

Neste estado, o atendimento público veterinário e o fornecimento gratuito do tratamento aos animais doentes eram realizados somente pelo INI/FIOCRUZ, que não consegue atender toda a demanda de casos envolvidos na epidemia. Após 2013, o Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman e o CCZ do município do Rio de Janeiro começaram a distribuição de medicamentos para tratamento em felinos acometidos pela esporotricose. Infelizmente, mesmo com a assistência provida, o abandono ao tratamento é frequente nos casos de esporotricose felina, representando um importante obstáculo no controle da doença (Pereira, 2014).

Nas últimas décadas, no estado de São Paulo foi relatado um número basal de casos de esporotricose, quase sempre sem relação com a transmissão zoonótica relacionada aos gatos (Rodrigues *et al.*, 2014; Borges *et al.*, 2013). Porém desde 2011, o número de casos de esporotricose vem crescendo nesse estado e em dois municípios vizinhos (Diadema e Guarulhos), os casos confirmados chegam a quase 200 em 2013 (Montenegro Freitas *et al.*, 2014). Em decorrência do crescente número de casos confirmados de esporotricose em humanos e gatos no Município de Guarulhos, a

doença ganhou o status de “notificação compulsória” pela portaria nº. 064/2016, publicado no Diário Oficial do Município em 27 de Julho de 2016. O objetivo desta portaria visa que os serviços de clínicas veterinárias notifiquem o Centro de Controle de Zoonoses o maior número de casos suspeitos felinos com esporotricose, auxiliando no mapeamento e distribuição da doença bem como no planejamento de medidas de controle. Os casos em seres humanos devem ser comunicados à Vigilância Epidemiológica Municipal.

A esporotricose também tem sido encontrada em Minas Gerais e no estado do Rio Grande do Sul, porém em menor proporção (Barros *et al.*, 2013). Atualmente esta doença é a micose subcutânea mais importante que afeta os animais no estado de São Paulo. Em um estudo retrospectivo realizado no Serviço de Dermatologia de um hospital veterinário do estado de São Paulo entre janeiro de 1993 e dezembro de 2011 foi constatado que o gato, a exceção dos cães, foram os responsáveis por 45,9% da infecção nos humanos e animais que com ele coabitavam (Rossi *et al.*, 2013). Em outro estudo mais recente, entre o mês de março de 2011 a abril de 2014 foi identificado um aumento considerável de casos de esporotricose felina nas cidades de Itaquera e Itaim Paulista, com 83 e 56 casos respectivamente (Montenegro *et al.*, 2014).

2.2. O fungo *Sporothrix schenckii*

As espécies do gênero *Sporothrix*, pertencem à Divisão Ascomycota, classe Pyrenomycetes, ordem Ophiostomatales e família Ophiostomataceae (Romeo e Criseo, 2013). Por muito tempo pensou-se que o fungo *S. schenckii* era o único agente etiológico da esporotricose (Barros *et al.*, 2011; Carrada-Bravo *et al.*, 2013), porém sobre a base de estudos de sequenciamento do gene da calmodulina, características nutricionais (como assimilação de diferentes fontes de carbono) e fenotípicas (como diâmetro das colônias e morfologia dos conídios) em distintos meios de cultura e velocidade de crescimento a diferentes temperaturas, a espécie *S. schenckii* passou a ser reconhecida como um complexo de espécies crípticas, das quais são de interesse clínico: *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix luriei*, *Sporothrix schenckii sensu stricto*, *Sporothrix mexicana* e *Sporothrix pallida* (Marimon *et al.*, 2006; Marimon *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2013). Mais recentemente, foi proposta

uma nova espécie, o *Sporothrix chilensis* sp. (Rodrigues *et al.*, 2015). Essas espécies estão hoje organizadas em diferentes grupos ou Clades (**Figura 2**), a saber *S. brasiliensis* (Clade I), *S. schenckii* sensu stricto (Clade IIa e Clade IIb), *S. globosa* (Clade III), e *S. luriei* (Clade VI), *S. mexicana* (Clade IV) e *S. pallida* (Clade V) (Rodrigues *et al.*, 2013).

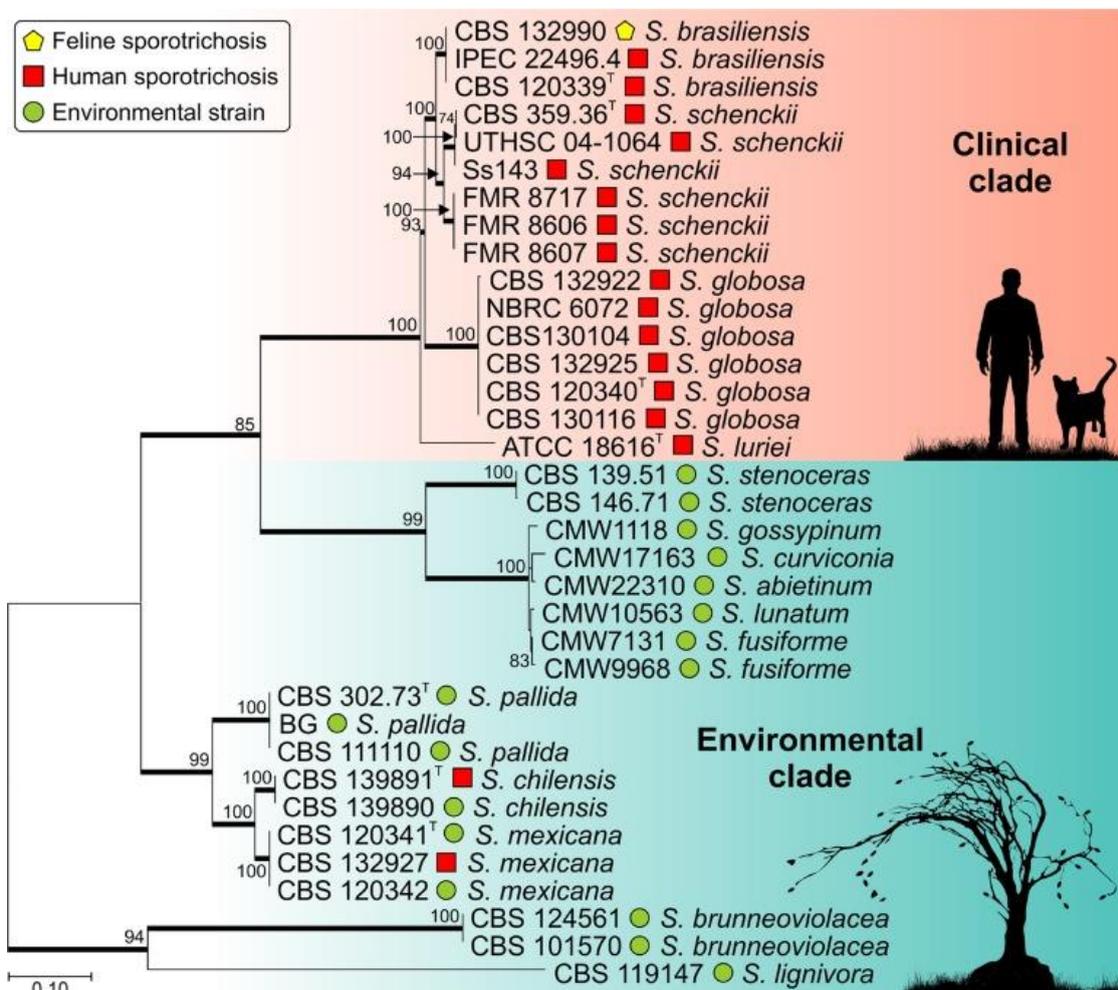


Figura 2. Relações filogenéticas entre os membros das Clades – espécies clínicas e ambientais do Complexo *Sporothrix* com base nas seqüências de calmodulina (exão 3-5). Disponível no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) (Orofino-Costa *et al.*, 2017).

S. schenckii é um fungo saprófita, podendo ser encontrado no solo, plantas e materiais orgânicos em decomposição. No meio ambiente este microrganismo pode potencializar a sua virulência conforme sua exposição a fatores adversos, ou seja, contaminantes físicos, químicos ou biológicos (Téllez *et al.*, 2014). Por ser um fungo termo-dimórfico, a temperatura é um fator determinante da sua morfologia e o tempo do seu cultivo pode influenciar e induzir mudanças na composição da parede celular,

causando uma diminuição da virulência (Fernandes *et al.*, 2013). Em temperaturas que variam de 25 a 30°C o fungo cresce na forma miceliar, desenvolvendo rapidamente colônias de coloração cinza com hifas aéreas curtas. A análise microscópica mostra micélio fino, ramificado, hialino e septado com formação de esporos assexuados (conídios) que estão localizados em ambos os lados das hifas formando rosetas no final. Quando cultivado a 37°C, *S. schenckii* assume a forma leveduriforme, com elementos unicelulares em forma de “charuto” (Almeida-Paes *et al.*, 2009; Ramos-e-Silva *et al.*, 2012). Assim, na natureza o fungo normalmente apresenta-se na forma miceliar e, quando instalado no hospedeiro, através de lesões cutâneas causadas por plantas ou animais contaminados, o mesmo converte-se para sua forma de levedura (López-Romero *et al.*, 2011). A transição induzida é uma importante adaptação morfológica para a infecção em mamíferos virulência (Orofino-Costa *et al.*, 2017).

Os fatores de virulência são elementos constitutivos ou induzíveis em determinados microrganismos que tem uma função importante na colonização e invasão do patógeno no hospedeiro e determinam a patogenicidade. Existem evidências de que muitos destes fatores mudam dependendo das características do patógeno, das condições estressantes do meio ambiente e das defesas do hospedeiro, fenômeno conhecido como “dual effect” (Casadeval *et al.*, 2003; Téllez *et al.*, 2014; Orofino-Costa *et al.*, 2017).

2.3. Manifestações clínicas

De modo geral, a rota de infecção, a virulência da cepa e fundamentalmente o estado imunológico do hospedeiro, influenciam no aparecimento das manifestações clínicas identificadas na esporotricose (Fernandes *et al.*, 2013). Uma vez que o fungo penetra no organismo, ele pode permanecer restrito ao local da inoculação gerando a formação de nódulos pequenos que podem ulcerar dando origem à forma cutânea fixa - aparecendo entre duas a quatro semanas após o trauma ou ainda pode se disseminar pelos linfonodos adjacentes desenvolvendo diferentes nódulos ao longo dos canais linfáticos, para cima ou para baixo dependendo do local anatômico, podendo supurar, ulcerar e drenar pus correspondendo à forma linfocutânea- após algumas semanas (Vasquez-del-Mercado *et al.*, 2012), a qual é responsável por 70-80 % dos casos cutâneos de esporotricose (Vikram *et al.*, 2014). Posteriormente, esses nódulos podem ulcerar, fistular e curar, caracterizando uma goma (**Figuras 3A e 3B**). A forma cutânea

fixa consiste em uma única lesão, geralmente semelhante ao câncer de inoculação, sem disseminação linfática regional (**Figura 3C**). Em algumas ocasiões, a doença pode aparecer como úlceras maiores, com bordas bem definidas e emolduradas, ou lesões eritematosas, escamosas, papulopustulares, vegetativas, infiltrativas ou crocantes (**Figuras 3D-3F**). Alguns pacientes apresentam múltiplas lesões cutâneas disseminadas no tegumento, sem invasão sistêmica e aparência polimórfica, todas surgindo ao mesmo tempo. Em geral, esses pacientes são indivíduos imunocompetentes que descrevem ter múltiplos traumas (Orofino-Costa *et al.*, 2017).



Figuras 3. Manifestações clínicas. **A.** Forma linfocutânea em adultos (linfangite ascendente); **B.** forma linfocutânea no rosto de uma criança (linfangite descendente); **C.** forma cutânea fixa nas costas da mão; Forma sistêmica **D, E, F.** com lesões cutâneas disseminadas em paciente com AIDS (Orofino-Costa *et al.*, 2017).

Embora qualquer membrana mucosa possa ser afetada pela esporotricose, a mucosa ocular é mais comumente envolvida, causando conjuntivite, episclerite, uveíte, coroidite e lesões retrobulbares, entre outras (Kurosawa *et al.*, 1988; Curi *et al.*, 2003) (**Figura 4**). Quando o ducto lacrimal é afetado, a dacriocistite pode ocorrer como sequelas (Freitas *et al.*, 2014; de Macedo *et al.*, 2015). As lesões retrobulbares, como a coriorretinite, estão mais frequentemente relacionadas à disseminação hematogênica, e as lesões anteriores estão associadas à inoculação fúngica. O acometimento simultâneo da mucosa ocular e dos linfonodos regionais não é raro e é uma das causas da síndrome de

Parinaud (Ferreira *et al.*, 2014).



Figura 4. Conjuntivite granulomatosa do olho direito (Yamagata *et al.*, 2017).

Ocasionalmente, o fungo pode disseminar-se por via hematogênica, atingindo os ossos e articulações. A doença pulmonar pela inalação de conídios é rara sendo caracterizada por tosse, febre baixa, perda de peso, linfadenite mediastinal, cavitação, fibrose e outros sinais clínicos que lembram a tuberculose (Vikram *et al.*, 2014). As formas mais graves da esporotricose têm sido associadas a pacientes alcoólatras, transplantados de órgãos, indivíduos sob corticoterapia e em pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Yelverton *et al.*, 2006), o que sugere que o *S. schenckii* é um patógeno oportunista emergente (Freitas *et al.*, 2011, 2014).

2.4. Mecanismos envolvidos na resposta imune contra *S. schenckii*

A resposta imune contra os fungos requer uma adequada colaboração entre o sistema imune inato e adaptativo e estas parecem ser desencadeadas por diferentes tipos de antígenos obtidos do fungo *S. schenckii* (Carlos *et al.*, 1992, 1994, 1999, 2003, 2009; 2015; Maia *et al.*, 2006; Sassá *et al.*, 2009, 2012; Fortino *et al.*, 2012; Alegranci *et al.*, 2013; Negrini *et al.*, 2013, 2014). A resposta imune é desencadeada pelo reconhecimento de patógenos através de receptores expressos pelas células apresentadoras de antígenos (APCs – células dendríticas, monócitos/macrófagos e linfócitos B imaturos), os quais podem estar localizados na superfície celular ou em compartimentos intracelulares. Esses receptores são denominados receptores de

reconhecimento de padrões (PRRs) e reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) encontrados em uma ampla variedade de microrganismos. Possuem, portanto, a capacidade de discriminar entre os microrganismos e o próprio (Banchereau e Steinman, 1998; Aderem e Underhill, 1999; Janeway e Medzhitov, 2002; Akira *et al.*, 2006).

Os PAMPs presentes no fungo, como os carboidratos (β -glucanas), glicoproteínas (mananas), ácidos nucleicos (DNA e RNA), glicolípidos (lipopolissacarídeos), peptidoglicano, lipoproteínas e outros, são reconhecidos pelo menos por um dos receptores presentes dentre as quatro grandes famílias de PRRs (“Pattern Recognition Receptors”), que operam de forma cooperativa para reconhecer patógenos e sinais de stress produzidos pelas células durante infecção ou injúria celular: 1) receptores de lectina C (CLRs), como Dectina- 1 e Dectina- 2, “DC-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin” (DC-SIGN), mincle e receptor de manose; 2) receptores semelhantes a NOD (domínio de oligomerização e ligação de nucleotídeo), como o inflamassomo NALP3; 3) receptores scavenger (CD5 e CD36) e 4) fundamentalmente a família de receptores parecido a “Toll-like” (TLR), considerada a maior classe de reconhecimento inato em vertebrados (Netea *et al.*, 2006; Levitz, 2010, Romani, 2011; Jellmayer *et al.*, 2017). Por outro lado as opsoninas, como as imunoglobulinas, coletinas e componentes do complemento (C3bi) aumentam o repertório de reconhecimento antigênico favorecendo a internalização e morte dos microrganismos pelos macrófagos (Stuart e Ezekowitz, 2005). A ativação dos PRRs desencadeia uma cascata de eventos intracelulares produzindo a ativação de moléculas co-estimulatórias como CD40, CD80 e CD86 nas APCs e a produção de IL-1, IL-6, TNF- α , IL-12 (Lahiri *et al.*, 2008) e quimiocinas, cuja função é modular a resposta antifúngica (Goodridge e Underhill, 2007).

Na grande família dos Toll-like receptors (TLRs), estudos em nosso laboratório demonstraram na esporotricose que macrófagos de animais C3H/HeJ infectados (com mutação pontual natural no gene TLR-4) foram deficientes na produção de H₂O₂, IL-1 β e IL-6 *ex vivo*, em resposta à liberação aos extratos lípidos quando comparados com animais HePas/C3H, competentes para esse receptor (Carlos *et al.*, 2009; Sassá *et al.* 2012). O envolvimento dos receptores TLR-2 também já foi comprovado em estudos prévios, nos quais, animais “Knockout” para esse receptor tiveram menor porcentagem de leveduras internalizadas por macrófagos e diminuição na produção das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-12 e IL-10 quando comparados com os

animais portadores do receptor (Negrini *et al.* 2013). Na sequência, outro estudo demonstrou que a ausência de TLR-2 interferiu na produção de mediadores pró-inflamatórios e NO, e que a produção de IL-17 foi independente desse receptor, levando-nos à conclusão de que a ausência de resposta Th1 em animais “Knockout” foi concomitante com a produção de IL-17, sugerindo que o receptor TLR-2 interfere com o curso da infecção induzida pelo fungo *S. schenckii* (Negrini *et al.*, 2014). Em relação aos NLRs, em estudo prévio, Gonçalves *et al.* 2015, mostraram a importância da interação entre caspase-1 e as citocinas IL-1 β e IL-18 na defesa do hospedeiro contra a infecção por *S. schenckii*, pois a diminuição da atividade de caspase-1 foi acompanhada pela secreção reduzida dessas citocinas, sugerindo uma participação do inflamassoma na esporotricose. Curiosamente, essa redução transitória da atividade das caspase-1 ocorreu em um período de tempo que segue de perto o período de aumento da carga fúngica e imunossupressão relatado antes em modelos semelhantes (Carlos *et al.* 2009). Dentre os receptores de lectinas tipo C não clássicas (CLRs), encontramos a Dectina-1 (Rappleye *et al.*, 2007), que reconhece a β -glucana nas paredes celulares de fungos, e é um receptor crucial para a imunidade protetora contra os agentes fúngicos patogênicos. A interação das β -glucanas com a dectina-1 expressa em monócitos aumentam a fagocitose das leveduras de *S. schenckii*, produzem espécies reativas de oxigênio, tais como, NO, H₂O₂ e sintetizam citocinas IL-10, TNF- α e IL-1 β , sugerindo que o receptor Dectina-1 pode participar no reconhecimento do *S. schenckii* (Jellmayer *et al.*, 2017).

Tradicionalmente, a resposta imune Th1, produtoras de IFN- γ e IL-12 tem sido considerada essencial para conferir imunidade protetora contra fungos, enquanto que as respostas Th2 mediadas pela IL-4 e IL-5 levam ao aumento da suscetibilidade à infecção por esses patógenos (Antachopoulos e Roilides, 2005). Já foi demonstrado o desenvolvimento de resposta imune celular durante a infecção murina por *S. schenckii* (Carlos *et al.*, 1992) e, posteriormente que as respostas Th1 e Th2 são induzidas de modo antígeno-específico contra componentes da parede celular desse fungo (Maia *et al.*, 2006). Células com padrão Th17 compreendem um novo subtipo de célula T que possuem um papel emergente na imunidade adaptativa para uma variedade de fungos (Romani,2011), incluindo *S. schenckii*, conforme demonstrado recentemente em camundongos infectados com este fungo que conseguiram eliminar a infecção no período de 20 dias caracterizada pela alta produção da citocina IL-17 (Ferreira *et al.*, 2015), confirmando o papel relevante deste subtipo celular na defesa contra *S. schenckii*. A resposta imune humoral, na dependência da quantidade e qualidade dos

anticorpos, pode proteger o hospedeiro contra as infecções fúngicas de diferentes formas, seja prevenindo a aderência, a neutralização de toxinas, opsonizando para favorecer o processo de fagocitose ou mediando a citotoxicidade celular dependente do complemento (Pérez et al., 2013). Essas observações têm sido suportadas por diferentes estudos; por exemplo, na identificação de anticorpos protetores e não protetores na infecção induzida por *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*, indicando que a resposta imune humoral contra os fungos pode gerar anticorpos de variada eficácia (Blanco e Garcia, 2008; Edwards, 2012). No caso de *S. schenckii* foi demonstrado que animais tratados com um anticorpo monoclonal contra a gp70 antes e depois da infecção com o fungo foram capazes de induzir proteção, evidenciado pela diminuição na carga fúngica no baço e o fígado (Nascimento et al., 2008).

Na infecção por *S. schenckii* ocorre uma depressão característica da resposta imune celular durante a fase aguda da infecção em modelo murino de esporotricose sistêmica (Carlos *et al.*, 1992; 1994; 2009). Em modelo experimental a reação de hipersensibilidade tardia (*in vivo*) e o teste de transformação linfocitária (*in vitro*) mostraram que a resposta imune celular desses animais está deprimida entre a 4^a e a 6^a semanas de infecção, quando as células do baço destes animais foram estimuladas com um antígeno solúvel obtido a partir do fungo em sua forma leveduriforme (Carlos *et al.*, 1994). Neste período também se pôde observar um aumento na multiplicação fúngica no fígado e baço dos camundongos infectados. Essa depressão na imunidade freqüentemente indica um agravamento da infecção, com maior comprometimento do hospedeiro (Carlos *et al.*, 1992, Carlos *et al.*, 1999; Carlos *et al.*, 2015). Esta deficiência na imunidade celular em camundongos infectados pelo *S. schenckii* pode em parte, ser devida à geração anormal de interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) pelos macrófagos ativados, prejudicando assim a amplificação da resposta imune (Carlos *et al.*, 1994).

2.5. Aspectos terapêuticos e limitações

A escolha do tratamento antifúngico para controlar esta doença, está relacionada ao tipo de manifestação clínica desenvolvida pelo paciente. O tratamento da esporotricose pode ser difícil principalmente devido às complicações do paciente em razão do longo período de tratamento e da alta toxicidade do fármaco utilizado (Rochette *et al.*, 2003). Segundo as recomendações atuais o itraconazol é um fármaco

de amplo espectro de ação nas micoses superficiais e sistêmicas e efeitos tóxicos bastante reduzidos. Este antifúngico inibe a enzima citocromo P450 lanosterol 14 α -demetilase que converte lanosterol para o ergosterol, o principal esterol na parede celular fúngica (Mahajan *et al.*, 2014). Entretanto, o itraconazol é considerado o fármaco de escolha para o tratamento da esporotricose nas formas cutânea e linfocutânea em humanos e pequenos animais (Rochette *et al.*, 2003; Guterres *et al.*, 2014).

O iodeto de potássio, o qual tem preço mais acessível e tem sido usado nos países desenvolvidos com grande sucesso nas formas cutâneas da esporotricose, também tem mostrado sérias limitações, atribuídas ao desconhecimento do seu mecanismo de ação e à alta frequência de reações adversas, como alergias, edema pulmonar, angioderma, mialgia, linfadenopatia, urticária, vasculite, psoríase pustular, acidose metabólica e iododerma, lacrimejamento, expectoração abundante, coriza, espirros, insônia e problemas tireoidianos (Silva e Pereira, 2009). O fluconazol, sendo parte do grupo dos azóis como o itraconazol, devido a menor eficácia é utilizado apenas como uma opção terapêutica de segunda linha (Francesconi *et al.*, 2009).

A terbinafina é pertencente ao grupo das alilaminas, outro fármaco alternativo ao itraconazol para o tratamento de formas menos agressivas da esporotricose devido a sua baixa ligação (aproximadamente 5%) com o sistema enzimático P450, diminuindo a probabilidade de interagir com outros fármacos metabolizados por este sistema, como foi explicado anteriormente, no entanto ainda não há consenso sobre a dose e a duração do tratamento (Chapman *et al.*, 2004, Kauffman *et al.*, 2007; Francesconi *et al.*, 2009).

A anfotericina B lipossomal e desoxicolato são os fármacos de escolha junto com o itraconazol para o tratamento de formas graves da esporotricose, tais como a osteoarticular, pulmonar, meningeal e disseminada (Kauffman *et al.*, 2007) que ocorrem geralmente em pacientes HIV positivos. A terapia com as diferentes formas farmacêuticas de anfotericina B nos pacientes imunodeprimidos é difícil devido às reações adversas como a hipocalemia, hipomagnesemia, anemia normocítica e principalmente nefrotoxicidade (Vikram *et al.*, 2014).

Resumidamente, as principais limitações das opções terapêuticas são: a longa duração do tratamento associada com um aumento da resistência aos fármacos antifúngicos e toxicidade, as interações com outros fármacos, o custo excessivo do tratamento especialmente em pacientes imunocomprometidos que sofrem a forma

disseminada da esporotricose. Além dos efeitos colaterais como náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia, dores de cabeça, alopecia leve, hepatotoxicidade e aumento da bilirrubina e transaminases (Cunha-Azevedo *et al.*, 2011).

Diversas ferramentas para o tratamento da esporotricose encontram-se disponíveis, porém as terapias atuais podem causar diversos efeitos colaterais aos doentes, tornando-se cada vez mais importante a busca de novos métodos terapêuticos que visem resultados menos tóxicos e que propiciem a redução do tempo de tratamento. Nos últimos anos, muitos estudos vêm sendo realizados no intuito de desenvolver vacinas para infecções fúngicas oportunistas e endêmicas, uma variedade de proteínas da parede celular de muitos fungos patogênicos diferentes foram avaliadas quanto à sua imunogenicidade, segurança e potencial de proteção (Edwards, 2012). Visando estratégias alternativas para o tratamento da esporotricose, torna-se relevante avaliar a ação das células dendríticas como tratamento dessa doença.

2.6. Células dendríticas (DCs)

Um dos componentes da resposta imune inata muito importante para o desenvolvimento da resposta adaptativa são as DCs, que estão presentes em todos os tecidos periféricos e acumulam-se nos locais de entrada dos agentes patogênicos. Estas células são especializadas em ligar as respostas imunes inatas e adaptativas (Kusuhara *et al.*, 2014), por este motivo apresenta maior capacidade de decifrar as informações associadas a infecções na pele e tecidos subcutâneos, e traduzi-las através de mecanismos que partem do reconhecimento específico do microrganismo através de seus receptores (TLR), transmissão das informações às células T e, como consequência, desencadear respostas imunes específicas; além da contenção das respostas inflamatórias através da indução da tolerância pelas células T reguladoras (Treg) (Perruccio *et al.*, 2004; Bozza *et al.*, 2004; Gulubova *et al.*, 2012).

São conhecidas atualmente duas classes de DCs: plasmocitóides, uma linhagem distinta que produz grande quantidade de IFN- α , principalmente em resposta a uma infecção viral (Bruno *et al.*, 2014); e mielóides, que são as células que participam diretamente na apresentação de antígenos e ativação de células T naïve (Altfeld *et al.*, 2011).

As DCs possuem a capacidade de capturar e processar moléculas antigênicas

e/ou microrganismos infecciosos, por esse motivo agem como sentinelas do sistema imunológico e tem um papel central na geração da imunidade antifúngica (de Jong *et al.*, 2005). Sua interação com os patógenos contribui para diferentes tipos de imunidade adaptativa e as citocinas específicas expressas por ela dependem da estimulação por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e/ou aos padrões moleculares associados a danos (DAMPs), por esse motivo as DCs podem estimular uma resposta imune em uma direção específica, como Th1, Th2, Th17 ou Treg (Wculek *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2018).

A resposta imune antifúngica gerada pelas DCs inicia-se pelo reconhecimento do fungo, internalização e processamento do mesmo no vacúolo citoplasmático gerando, em seguida, o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II ligado ao peptídeo processado que será apresentado na superfície da célula dendrítica às células T (Ramachandra *et al.*, 1999). Sua maturação é induzida e/ou regulada por diversos fatores. Seu estado de ativação e maturação é definido pela reduzida capacidade de processamento do antígeno, pelos altos níveis de MHC, altos níveis de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 e CD40, além da produção de citocinas, permitindo assim a interação com células T e diferenciação e expansão clonal dessas células (Banchereau *et al.*, 2000; Joffre *et al.* 2009; Gulubova *et al.*, 2012). Após a estimulação do sistema imunológico, é essencial que as células T sejam ativadas para uma eliminação e desenvolvimento bem-sucedidos da imunidade protetora contra fungos. As citocinas específicas expressas pelas células APCs como DCs e macrófagos são cruciais para a diferenciação de células T CD4 + (LeidbundGut-Landmann *et al.* 2012, Rohatgi & Pirofski 2015) nos subtipos Th1 ou Th17, que uma vez ativados produzem citocinas pró-inflamatórias como interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa e interleucina (IL) 17/22 (Wüthrich *et al.* 2012).

Embora o papel das células dendríticas na resposta ao fungo *S. schenckii* não esteja completamente elucidado, estudos prévios em nosso laboratório demonstraram que, o reconhecimento de *S. schenckii* por células dendríticas (DCs) leva ao desenvolvimento de uma resposta Th1/Th17 *in vitro* (Verdan *et al.*, 2012), além de induzir o desenvolvimento de células Th17 e Th1/Th17 mistas *in vivo*, assim como a liberação antígeno-específica de IL-17 e IL-22 *ex vivo* (Ferreira *et al.*, 2015). Devido as suas funções, as células dendríticas são importantes para o desenvolvimento das respostas imunes para eliminação de infecção subcutânea por *S. schenckii*.

DCs ativadas com diferentes antígenos podem ser utilizadas como vacinas pela

sua capacidade de regular as respostas celulares. Devido a esta função têm sido uma das estratégias no campo de desenvolvimento de imunoterapias contra o cancro, autoimunidade, doenças infecciosas, que requerem a participação da imunidade de células T (Chen *et al.*, 2015). Alguns estudos têm sido realizados mostrando a utilização de DCs ativadas na terapia contra diferentes infecções. Várias proteínas localizadas na parede celular do fungo *S. schenckii* são importantes indutoras de respostas imune celular e humoral e, contudo, podem ser consideradas potenciais candidatos para fins de diagnóstico e para a sua utilização como ferramentas ao estudo de vacinas para prevenção e terapia de esporotricose (Alba-Fierro *et al.*, 2014).

2.7. Imunoterapia com DCs

As DCs representam uma estratégia terapêutica promissora devido à sua habilidade única para apresentar antígenos e ainda pela capacidade de estimular outras células do sistema imunológico (Constantino *et al.*, 2015). Ela vem sendo utilizadas em diversas terapias, especialmente na imunoterapia anti-tumoral (Chen *et al.*, 2015; Koido, 2016). As vacinas de DCs representam um método pelo qual estas células são utilizadas como APCs profissionais, estimulando células T específicas para os antígenos tumorais, para que estas sejam suficientemente potentes e de longa duração de ação, para promover a regressão do tumor resistente e/ou a sua eliminação (Palucka e Banchereau, 2012) e para seu desenvolvimento as DCs podem ser manipuladas de diversas maneiras. Na manipulação *ex vivo*, as DCs são maturadas e carregadas com o antígenos tumorais e administradas no doente, estas células migram para os tecidos linfóides desencadeando uma resposta inata e adaptativa após ativação de células TCD4+ e TCD8+, após esse processo migram do tecido linfóide para o tecido tumoral, inibindo o seu crescimento (Constantino *et al.*, 2015; Oliveira, Borges e Cruz, 2013; Silva, 2013). Por outro lado, a fusão de DCs com células tumorais intactas para gerar células de fusão DC-tumor (DC-tumor FCs), também designadas por “dendritomas”, é uma estratégia terapêutica alternativa na oncologia, que permite que as DCs sejam expostas à vasta gama de proteínas originalmente expressos por células tumorais intactas e que demonstraram induzir respostas imunes tumorais *in vivo* (Constantino *et al.*, 2015; Koido, 2016). Outra alternativa que representa um enorme avanço na imunoterapia anti-tumoral, consiste em carregar as DCs *in vivo*, permitindo ultrapassar a maior parte das limitações das vacinas geradas *ex vivo*. Esta abordagem permite a eliminação da obtenção de DCs autólogas,

que apenas poderiam ser usadas no próprio indivíduo (Constantino et al., 2015; Odegard, 2015). Outras abordagens, para além da manipulação *ex vivo* e do carregamento *in vivo*, exploram o potencial imunogênico das DCs na terapia do cancro (Constantino et al., 2015), foram testadas vacinas baseadas na administração de péptidos, proteínas ou ácidos nucleicos tumorais. Trabalhos demonstram que os antígenos presentes nas vacinas são capturados e processados por DCs, ativando uma resposta imunitária específica. No entanto, o sucesso clínico desta estratégia foi limitado (Constantino et al., 2015; Palucka e Banchereau, 2013). O aumento da eficácia da imunoterapia anti-tumoral relaciona-se com a compreensão dos mecanismos inerentes ao equilíbrio entre a imunidade e tolerância. Com o objetivo de aumentar a eficácia das DCs, estão a serem desenvolvidas estratégias que incluem a modificação genética destas, com o objetivo de aumentar a expressão de reguladores positivos imunogénicos e inibir os negativos (Oliveira, Borges e Cruz, 2013).

A utilização de vacinas de DCs também vem sendo estudada na infecção pelo HIV, a administração de DCs, é fundamentada nas estratégias de imunoterapia passiva e vacina terapêutica, unindo estas duas modalidades de intervenção. O racional para este tipo de intervenção apoia-se ainda na propriedade das DCs de estimular células infectadas latentes, auxiliando na eliminação dos reservatórios virais (Van der Sluis et al., 2013; Norton et al., 2015). Estratégias de imunização utilizando DCs pulsadas com antígeno têm se mostrado uma forma racional e promissora para indução de resposta imune contra o HIV (Engelmayer et al., 2001).

As estratégias de vacinas antivirais e antitumorais alavancaram o papel central das DCs na condução das respostas imunes. Diante desses resultados a utilização das DCs como terapia para as infeções fúngicas tem despertado grande interesse. Vários trabalhos sugerem que pode ser possível criar uma vacina antifúngica que conceda proteção contra vários patógenos fúngicos (Wuthrich et al., 2011; Stuehler et al., 2011; Cassone e Rappuoli, 2010). Os avanços tecnológicos na entrega de antígenos, combinados com uma maior compreensão da biologia das DC, devem permitir um arranjo e carregamento eficazes de DC com antígeno imunogénico *in vivo* (Roy et al 2012

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito de células dendríticas isogênicas ativadas como alternativa terapêutica na esporotricose em camundongos.

3.2. Objetivos específicos

- Obter das proteínas da parede celular do fungo *S. schenckii* (PSCs).
 - Determinar concentração de PSCs para ativação das DCs
- Obter células dendríticas isogênicas ativadas com PSCs:
 - Avaliar expressão de CD11c e MHCII
 - Avaliar expressão de moléculas co-estimulatórias: CD83, CD80, CD86 e CD40
 - Avaliar perfil de citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12
- Avaliar a imunogenicidade das dendríticas isogênicas ativadas em animais saudáveis:
 - Avaliar perfil dos linfócitos Th1 e Th17
 - Avaliar perfil de citocinas IL-10, IL-17, TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-4 e IL-2
- Avaliar a eficácia do tratamento com células dendríticas ativadas na terapia da esporotricose experimental em camundongos:
 - Avaliar carga fungica do linfonodo poplíteo drenante e baço
 - Avaliar produção de anticorpos IgG anti- PSCs
 - Avaliar perfil dos linfócitos Th1 e Th17
 - Avaliar perfil de citocinas IL-10, IL-17, TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-4 e IL-2 de esplenócitos totais

7. CONCLUSÃO

- ✓ Células dendríticas podem ser diferenciadas a partir precursores de medula óssea utilizando GM-CSF
- ✓ As células dendríticas no estudo apresentaram alta frequência de CD11c e maior expressão de duplo-marcadas CD11c+MHCII
- ✓ As proteínas extraídas da parede celular do fungo *S. schenckii* são capazes de ativar células dendríticas aumentando a expressão de moléculas co-estimulatórias e citocinas pró-inflamatórias.
- ✓ A imunização com BMDCs estimuladas com PSC favorece uma resposta imune induzida por Th17 *in vitro*.
- ✓ O protocolo de imunização interfere na liberação de citocinas IL-10, IL-17, TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-4 e IL-2
- ✓ BMDCs são capazes de conferir proteção terapêutica contra *S. schenckii*
- ✓ A regulação positiva da resposta inflamatória parece ser o principal fator no desencadeamento da proteção conferida pela BMDC, pois promove uma resposta Th1/Th17 mista.
- ✓ A vacinação com BMDCs estimuladas são fortes candidatas para a terapia da esporotricose.

8. REFERÊNCIAS

- Abdelsadik A, Trad A. Toll-like receptors on the fork roads between innate and adaptive immunity. *Human immunology* 2011; 72,12:1188-1193
- Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:593-623.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006;124:783-801.
- Alba-Fierro CA, Pérez-Torres A, López-Romero E, Cuéllar-Cruz M, Ruiz-Baca E. Revista Iberoamericana de Micología Cell wall proteins of *Sporothrix schenckii* as immunoprotective agents. *Rev. Iberoam. Micol.* 2014;31:86–89.
- Alba-Fierro CA, Pérez-Torres A, Toriello C, Romo-Lozano Y, López-Romero E, Ruiz-Baca E. Molecular Components of the *Sporothrix schenckii* Complex that Induce Immune Response. *Curr. Microbiol.* 2016;73:292–300.
- Alba-Fierro CA, Pérez-Torres A, López-Romero E, Cuéllar-Cruz M, Ruiz-Baca E. Cell Wall Proteins Of *Sporothrix Schenckii* As Immunoprotective Agents. *Rev Iberoam Micol.* 2014; Pii: S1130-1406(13)00114-9.
- Alba-Fierro CA, Pérez-Torres A, Toriello C, Pulido-Camarillo E, López-Romero E, Romo-Lozano Y, Gutiérrez-Sánchez G, Ruiz-Baca E. Immune response induced by an immunodominant 60 kda glycoprotein of the cell wall of *sporothrix schenckii* in two mice strains with experimental sporotrichosis. *J Immunol Res.* 2016;2016:6525831. Doi: 10.1155/2016/6525831. Epub 2016 Mar 14
- Alegranci P, Ribeiro, LC, Ferreira LS, Negrini TC, Maia D C, Tansini A, Gonçalves AC, Placeres MC, Carlos IZ. The predominance of alternatively activated macrophages following challenge with cell wall peptide-polysaccharide after prior infection with *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*, v.176, p.57-65, 2013.
- Almeida JR, Kaihami GH, Jannuzzi GP, De Almeida SR. Therapeutic vaccine using a monoclonal antibody against a 70-kDa glycoprotein in mice infected with highly virulent *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. *Med Mycol.* 2015; 53: 42–50.
- Almeida SR. Therapeutic monoclonal antibody for sporotrichosis. *Front Microbiol.* 2012; 3: 409.
- Almeida-Paes R, Bailão Am, Pizzini CV, Reis RS, Soares CM, Peralta JM, Gutierrez-Galhardo MC, Zancopé-Oliveira RM. Cell-free antigens of *Sporothrix brasiliensis*: antigenic diversity and application in an immunoblot assay. *Mycoses.* 2012 Nov;55(6):467-75.
- Almeida-Paes R, Frases S, Monteiro PCF, Gutierrezgalhardo MC, Zancopé-Oliveira RM, Nosanchuk JD. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. *Microbes Infect.* 2009;5:554-62.

Altfeld M, Fadda L, Frleta D, Bhardwaj N. DCs and NK cells: critical effectors in the immune response to HIV-1. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11: 176–186.

Bacci A, Montagnoli C, Perruccio K, Bozza S, Gaziano R, Pitzurra L, Velardi A, D'ostiani Cf, Cutler Je, Romani L. Dendritic cells pulsed with fungal RNA induce protective immunity to *Candida albicans* in hematopoietic transplantation. *J Immunol.* 2002;168(6):2904-13.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y-J, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:767-811.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y-J, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:767-811.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998;392: 245-52.

Barros MB, De Almeida Paes R, Schubach AO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clin. Microbiol* 2011, 24(4): 633-654.

Barros MBDL, De Almeida Paes R, Schubach AO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2011;24:633–654. doi: 10.1128/CMR.00007-11.

Barros MBL, Schubach TMP, Coll JO, Gremião ID, Wanke B, Schubach A. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. *Revista Panamericana de Salud Pública.* Washington, v. 27, n. 6, Jun, p.455-60, 2010.

Bellocchio S, Romani L. Dendritic cell-based vaccination against opportunistic fungi. *Vaccine.* 2004;22:857-64.

Bonifaz A, Vázquez-González D. Sporotrichosis: an overview. *G Ital Dermatol Venereol* 2010;145:6509-6657.

Borges TS, Rossi CN, Fedullo JD, Taborda CP, Larsson CE: Isolation of *Sporothrix schenckii* from the claws of domestic cats (indoor and outdoor) and in captivity in São Paulo (Brazil). *Mycopathol.* 2013. 176:129–137.

Boumpas DT, Austin HA RD, Vaughn EM, Klippel JH, Steinberg AD, Yarboro CH, Balow JE. Controlled trial of pulse methylprednisolone versus two regimens of pulse cyclophosphamide in severe lupus nephritis. *Lancet.* 1992;340(8822):741-5.

Bozza S, Montagnoli C, Gaziano R, Rossi G, Nkwanyuo G, Bellocchio S, Romani L. Dendritic cell-based vaccination against opportunistic fungi. *Vaccine.* 2004 Feb 17;22(7):857-64.

Bruno A, Pagani A, Pulze L, Albini A, Dallaglio K, Noonan D M, Mortara L. Orchestration of angiogenesis by immune cells. *Frontiers in Oncology.* 2014; 4(July), 131.

Buisman AM, Van Zwet TL, Langermans JA, Geertsma MF, Leenen PJ, Van Furth R. Different effect of granulocyte colony-stimulating factor or bacterial infection on bone-marrow cells of cyclophosphamide-treated or irradiated mice. *Immunol.* 1999;97:601-10.

Carlos IZ, Sassá MF, Da Graça Sgarbi DB, Placeres MC, Maia DC. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. *Mycopathologia.* 2009;168:1-10.

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

Carlos IZ, Sassa MF, Sgarbi DB, Placeres MC, Maia DC. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. *Mycopathologia.* v.168, p.1–10, 2009.

Carlos IZ, Sgarbi D B, Angluster J, Alviano CS, Silva CL. Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the systemic form of the disease. *Mycopathologia,* v.117, n.3, p.139-144, 1992.

Carlos IZ, Sgarbi DB, Santos GC, Placeres MC. *Sporothrix schenckii* lipid inhibits macrophage phagocytosis: involvement of nitric oxide and tumour necrosis factor-alpha. *Scand. J. Immunol,* v.57, n.3, p.214–220, 2003.

Carlos IZ, Zini MM, Sgarbi DB, Angluster J, Alviano CS, Silva CL. Disturbances in the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor in disseminated murine sporotrichosis. *Mycopathologia,* v.127, n.3, p.189-94, 1994.

Carlos IZ, Ferreira LS, Gonçalves AC . Models of Experimental Sporotrichosis and Immune Response Against *Sporothrix schenckii*. Sporotrichosis. 1ed.: Springer International Publishing, 2015, v. , p. 103-131.

Carnero LG, Pérez NL, Hernández SG, Álvarez JM. Immunity and Treatment of Sporotrichosis. *J Fungi (Basel).* 2018 Aug 20;4(3).

Carrada-Bravo T, Olvera-Macías MI. New observations on the ecology and epidemiology of *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Rev Latinoamer Patol Clin,* 2013, Vol. 60.

Cassone A, Rappuoli R. Universal vaccines: shifting to one for many. *MBio.* 2010;1(1):e00042–10.

Cassone A. Fungal vaccines: Real progress from real challenges. *Lancet Infect. Dis.* 2008;8:114–124. doi: 10.1016/S1473-3099(08)70016-1.

Castro RA, Kubitschek-Barreira PH, Teixeira PA, Sanches GF, Teixeira MM, Quintella LP, Almeida SR, Costa RO, Camargo ZP, Felipe MS, De Souza W, Lopes-Bezerra LM. Differences in Cell Morphometry, Cell Wall Topography and Gp70 Expression Correlate with the Virulence of *Sporothrix brasiliensis* Clinical Isolates. *PLoS One.* 2013;8:e75656.

Chakrabarti A, Bonifaz A, Gutierrez-Galhardo Mc, Mochizuki T, Li S. Global epidemiology of sporotrichosis. *Med Mycol.* 2015; 53(1):3-14.

Chapman SW, Pappas P, Kauffmann C. Comparative evaluation of the efficacy and safety of two doses of terbinafine (500 and 1000 mg day) in the treatment of cutaneous or lymphocutaneous sporotrichosis. *Mycoses* 2004; 47: 62–68.

Chen K, Kolls JK. Interleukin-17A (IL17A). *Gene.* 2017 May 30;614:8-14. doi: 10.1016/j.gene.2017.01.016. Epub 2017 Jan 22.

Chen P, Liu X, Sun Y, Zhou P, Wang Y, Zhang Y. Dendritic cell targeted vaccines: recent progresses and challenges. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2015.

Chen P, Liu X, Sun Y, Zhou P, Wang Y, Zhang Y. Dendritic cell targeted vaccines: recent progresses and challenges. *Dendritic cell targeted vaccines: recent progresses and challenges. Hum Vaccin Immunother.* 2016 Mar 3;12(3):612-22. doi: 10.1080/21645515.2015.1105415.

Constantino J, Gomes C, Falcão A, Cruz MT, Neves BM. Antitumor dendritic cell-based vaccines: lessons from 20 years of clinical trials and future perspectives. *Transl Res.* 2016 Feb;168:74-95. doi: 10.1016/j.trsl.2015.07.008. Epub 2015 Aug 3.

Constantino J, Gomes C, Falcão A, Neves Bm, Cruz MT. Dendritic cell-based immunotherapy: a basic review and recent advances. *Immunol Res.* 2017 Aug;65(4):798-810. doi: 10.1007/s12026-017-8931-1.

Cruz LCH. Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. *Vet. e Zootec.* 2013; 20 (Edição Comemorativa): 08-28.

Cruz-Chamorro L, Puertollano Ma, Puertollano E, Alvarez De Cienfuegos G, De Pablo MA. Examination of host immune resistance against *Listeria monocytogenes* infection in cyclophosphamide-treated mice after dietary lipid administration. *Clin Nutr.* 2007;26:631-9.

Cunha-Azevedo EP, SILVA JR, Martins OP, Siqueira-Moura MP, Bocca AL, FELIPE MSS, Tedesco AC, Azevedo RB. In Vitro Antifungal Activity and Toxicity of Itraconazole in DMSA-PLGA Nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology.* 2011; 11; 2308–2314.

De Oliveira S, Rosowski EE, Huttenlocher A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nat Rev Immunol.* 2016 May 27;16(6):378-91. doi: 10.1038/nri.2016.49.

De Souza Barros M, Ferrari HJ, De Rezende RS, Faria JL, Doherty NS. Selective effects of immunosuppressive agents against the delayed hypersensitivity response and humoral response to sheep red blood cells in mice. *Agents Actions*, v. 11, n. 3, p. 237-242, 1981.

Edwards JE. Fungal cell wall vaccines: An update. *J. Med. Microbiol.* 2012;61:895–903. doi: 10.1099/jmm.0.041665-0.

Engelmayer J, Larsson M, Lee A, Lee M, Cox WI, Steinman RM, et al. Mature dendritic cells infected with canarypox virus elicit strong anti-human immunodeficiency virus CD8(+) and CD4(+) T-cell responses from chronically infected individuals. *Journal of Virology*. 2001;75(5):2142-53.

Fernandes GF, Santos PO, Rodrigues AM, Sasaki AA, Burger E, De Camargo ZP. Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii sensu stricto* isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. *Virulence* 2013 Apr 1;4(3):241-9.

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

Fernandes KS, Mathews HL, Lopes Bezerra LM. Differences in virulence of *Sporothrix schenckii* conidia related to culture conditions and cell-wall components. *J Med Microbiol*. 1999;48:195-203.

Ferreira LS, Gonçalves AC, Portuondo DL, Maia DC, Placeres MC, Batista-Duharte A, Carlos IZ. Optimal clearance of *Sporothrix schenckii* requires an intact Th17 response in a mouse model of systemic infection. *Immunobiology*. 2015; 220(8):985- 92.

Fortino FV, Faleiros JC, Ferreira LS, Monnazi LGS, Maia DCG, Tansini A, Placeres, MCP, Santos Junior RR, Carlos IZ. Dendritic cell are able to differentially recognize *Sporothrix schenckii* antigens and promote Th1/Th17 response in vitro. *Immunobiology*, v.17, p.788-794, 2012.

Francesconi A, Valle S, Passos R, Reis And M Galhardo. “Terbinafine (250 mg/day): an effective and safe treatment of cutaneous sporotrichosis,” *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2009. vol. 23, no. 11, pp. 1273–1276.

Freitas DFS, Valle ACFD, Da Silva MBT, Campos DP, Lyra MR. Sporotrichosis: An Emerging Neglected Opportunistic Infection in HIV- Infected Patients in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 2014, 8(8): e3110.

Freitas DFSF, Lima IAR, Curi CL, Jordão L, Zancopé- Oliveira RM, Valle ACF, Galhardo MCG, Curi ALL. Acute acryocystitis: another clinical manifestation of sporotrichosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.109, n.2, p.262-264, 2014.

Freitas DF, Do Valle AC, De Almeida Paes R, Bastos FI. Esporotricose felina: primeiro relato de caso diagnosticado em Uberaba–Minas Gerais. *Veterinária Notícias* 2013, 18(2).

Fukao T, Matsuda S, Koyasu S, Alerts E. Synergistic Effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-Dependent IFN- γ Production by Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*. vol. 164 no. 1 64-71, 2012.

Galhardo MC. Zoonotic Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: a protracted epidemic yet to be curbed. *Clin Infect Dis.*, v.50, n.3, p.453, 2010.

Garcia M, Sertório SP, Alves GJ, Chate SC, Carneiro R, Lallo MA. Uso da ciclofosfamida em modelos de imunodepressão experimental em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 24:115-119, 2004.

Gonçalves AC, Maia DC, Ferreira LS, Monnazzi LG, Alegranci P, Placeres MC, Batista-Duarte A, Carlos IZ. Involvement of major components from *Sporothrix schenckii* cell wall in the caspase-1 activation, nitric oxide and cytokines production during experimental sporotrichosis. *Mycopathologia.* v.179, p.21-30, 2015.

Goodridge SH, Underhill MD. Host recognition of fungal pathogens. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 2007; 4, No. 4.

Guest L, Uetrecht J. Drugs toxic to the bone marrow that target stromal cells. *Immunopharmacol.* 2000;46:103-12.

Gulubova MV, Ananiev JR, Vlaykova TI, Yovchev Y, Tsoneva V, Manolova IM. Role of dendritic cells in progression and clinical outcome of colon cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2012;27:159-69.

Gulubova MV, Ananiev JR, Vlaykova TI, Yovchev Y, Tsoneva V, Manolova IM. Role of dendritic cells in progression and clinical outcome of colon cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2012;27:159-69.

Guterres KA, Matos CB, Osório LG, Schuch ID, Cleff MB. The Use of (1–3) b-Glucan Along with Itraconazole Against Canine Refractory Sporotrichosis. *Mycopathologia.* 2014; 177:217–221.

Guzman-Beltran S, Perez-Torres A, Coronel-Cruz C, Torres-Guerrero H. Phagocytic receptors on macrophages distinguish between different *Sporothrix schenckii* morphotypes. *Microbes Infect.* 2012 Oct;14(12):1093-101.

Hafizi A, Modabber FZ. Effect of cyclophosphamide on *Toxoplasma gondii* infection: reversal of the effect by passive immunization. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 33, p. 389-394, 1978.

Huyan XH, Lin YP, Gao T, Chen RY, Fan YM. Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice. *Int Immunopharmacol.* 2011;11(9):1293-7.

Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197-216.

Jang SE, Joh EH, Lee HY, Ahn YT, Lee JH, Huh CS, Han MJ, Kim DH. *Lactobacillus plantarum* HY7712 ameliorates cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. *J Microbiol Biotechnol.* 2013;23:414-21.

Jellmayer JA, Ferreira LS, Manente FA, Gonçalves AC, Polesi MC, Batista-Duarte A, Carlos IZ. Dectin-1 expression by macrophages and related antifungal mechanisms in a murine model of *Sporothrix schenckii* sensu stricto systemic infection. *Microb Pathog.* 2017 Sep;110:78-84

Joffre O, Nolte Ma, Spörri R, Reis E Sousa C. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev.* 2009;227: 234-247.

Kauffman CA, Bustamante B, Chapman SW, Pappas PG, “Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: update by the Infectious Diseases Society of America,” *Clinical Infectious Diseases*, 2007; vol. 45,no. 10,pp. 1255– 1265, 2007.

Kanakry CG, O'donnell PV, Furlong T, De Lima MJ, Wei W, Medeot M, Mielcarek M, Champlin RE, Jones RJ, Thall PF, Andersson BS, Luznik L. Multi-institutional study of post-transplantation cyclophosphamide as single-agent graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic bone marrow transplantation using myeloablative busulfan and fludarabine conditioning. *J Clin Oncol.* 2014;32(31):3497-505.

Koido S. Dendritic-Tumor Fusion Cell-Based Cancer Vaccines. *International Journal of Molecular Sciences.* 17:6 (2016) 1–16.

Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:485-517. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132710.

Kumar P, Monin L, Castillo P, Elsegeiny W, Horne W, Eddens T, Vikram A, Good M, Schoenborn AA, Bibby K, Montelaro RC, Metzger DW, Gulati AS, Kolls JK. Intestinal Interleukin-17 Receptor Signaling Mediates Reciprocal Control of the Gut Microbiota and Autoimmune Inflammation. *Immunity.* 2016 Mar 15; 44(3):659-671.

Kusuhara M, Qian H, Li X, Tsuruta D, Tsuchisaka A, Ishii N, Ohata C, Furumura M, Hashimoto T. Mouse bone marrow-derived dendritic cells can phagocytize the *Sporothrix schenckii*, and mature and activate the immune response by secreting interleukin-12 and presenting antigens to T lymphocytes. *Journal of Dermatology* 2014; 41: 386–392

La Hoz RM, Baddley JW. Subcutaneous Fungal Infections. *Curr Infect Dis Rep*, v.14, p.530–539, 2012.

Levitz SM. Innate recognition of fungal cell walls. *PLoS Pathog.* v.6:e1000758. 2010.

Liao S, Von DER Weid PY. Lymphatic system: an active pathway for immune protection. *J Fungi (Basel).* 2018 Sep 2;4(3). pii: E106. doi: 10.3390/jof4030106.

Lima Franco D, Nascimento RC, Ferreira KS, Almeida SR. Antibodies against *Sporothrix schenckii* enhance TNF- α production and killing by macrophages. *Scand J Immunol.* 2012; 75: 142–146.

Lin ZW, Wu LX, Xie Y, Ou X, Tian PK, Liu XP, Ou QJ. The expression levels of transcription factors T-bet, GATA-3, ROR γ t and FOXP3 in peripheral blood lymphocyte (PBL) of patients with liver cancer and their significance. *International Journal of Medical Sciences*, 12(1), 7–16, 2015.

Liu J, Cao X. Regulatory dendritic cells in autoimmunity: A comprehensive review. *J Autoimmun.* 2015 Sep;63:1-12. doi: 10.1016/j.jaut.2015.07.011. Epub 2015 Aug 5.

Lopes-Bezerra LM, Mora-Montes HM, Zhang Y, Nino-Vega G, Rodrigues AM, De Camargo ZP, De Hoog S. Sporotrichosis between 1898 and 2017: The evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents. *Med. Mycol.* 2018;56:S126–S143

Lopes-Bezerra LM, Schubach A, Costa RO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Ann. Brazil. Acad. Sciences*, v. 78, p. 293-308, 2006.

López-Romero E, Reyes-Montes MDEL R, Pérez-Torres A, Ruiz-Baca E, Villagómez-Castro JC, Mora-Montes HM, Flores-Carreón A, Toriello C. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. *Future Microbiol.* 2011;6:85-102.

M, Ruiz-Baca E. Cell wall proteins of *Sporothrix schenckii* as immunoprotective agents. *Rev Iberoam Micol.* 2014;pii: S1130-1406(13)00114-9.

Macri C, Pang Es, Patton T, O'keeffe M. Dendritic cell subsets. *Semin Cell Dev Biol.* 2018 Dec;84:11-21. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.12.009. Epub 2017 Dec 23.

Madrid IM, Mattei A, Martins A, Nobre M, Meireles M. Feline sporotrichosis in the southern region of Rio Grande do Sul, Brazil: Clinical, zoonotic and therapeutic aspects. *Zoonoses Public Health.* 2010. 57: 151- 154.

Magalhães A, Ferreira KS, Almeida SR, Nosanchuk JD, Travassos LR, Taborda CP. Prophylactic and therapeutic vaccination using dendritic cells primed with peptide 10 derived from the 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clin Vaccine Immunol.* 2012;19:23-9.

Magalhães A, Ferreira KS, Almeida SR, Nosanchuk JD, Travassos LR, Taborda CP. Prophylactic and therapeutic vaccination using dendritic cells primed with peptide 10 derived from the 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012;19:23–29.

Maia DC, Gonçalves AC, Ferreira LS, Manente FA, Portuondo DL, Velloso JC, Polesi MC, Batista-Duarte A, Carlos IZ. Response of Cytokines and Hydrogen Peroxide to *Sporothrix schenckii* Exoantigen in Systemic Experimental Infection. *Mycopathologia.* 2016 Apr;181(3-4):207-15. doi: 10.1007/s11046-015-9966-2. Epub 2015 Nov 24.

Maia DC, Sassa MF, Placeres MC, Carlos IZ. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia.*;161:11-9.

Mahajan VK. Sporotrichosis: an overview and therapeutic options. *Dermatol Res Pract.* 2014.

Marimon R, Cano J, Gene J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol* 2007; 45:3198-206.

Marimon R, Gene J, Cano J, Guarro J. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical

origin. *Med Mycol*, 2008, 46:621–25

Marimon R, Gené J, Cano J, Trilles L, Dos Santos Lazéra M, Guarro J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(9):3251-3256.

Martin C. Percepção do risco de zoonoses em pacientes atendidos no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, Brasil, Publicação seriada do Centro de Estudos Sociais, 2014.

Mcdermott AJ, Klein BS. Helper T-cell responses and pulmonary fungal infections. *Immunology*. 2018 Oct;155(2):155-163. doi: 10.1111/imm.12953. Epub 2018 Jun 14.

Milner JD, Holland SM. The cup runneth over: Lessons from the ever-expanding pool of primary immunodeficiency diseases. *Nat. Rev. Immunol*. 2013;13:635–648

Ministério Da Saúde. Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro. Boletim Epidemiológico 012/2014. Situação Epidemiológica da Esporotricose 2013/2014. Rio de Janeiro, 23 de dezembro de 2014.

Ministério Da Saúde. Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro. Boletim Epidemiológico 01/2018. Situação Epidemiológica da Esporotricose 2015/2018. Rio de Janeiro, 18 de Maio de 2018.

Montenegro H, Rodrigues AM, Dias MA, Da Silva EA, Bernardi F, De Camargo, ZP. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging animal infection in São Paulo, Brazil. *BMC Vet Res*2014;10(1), 269.

Negrini TC, Ferreira LS, Alegranci P, Arthur RA, Sundfeld PP, Maia DCG, Spolidorio LC, Carlos IZ. Role of TLR-2 and fungal surface antigens on innate immune response against *Sporothrix schenckii*. *Immunol Invest*, v.42, p.36-48, 2013.

Negrini TC, Ferreira L S, Arthur RA, Alegranci P, Placeres MC, Spolidorio LC, Carlos IZ. Influence of TLR-2 in the immune response in the infection induced by fungus *Sporothrix schenckii*. *Immunol Investigat*, v.43, p.370-390, 2014.

Netea MG *et al*. Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors. *Curr Pharm Des*. 2006; 12 (32): 4195-201.

Norton TD, Miller EA, Bhardwaj N, Landau NR. Vpx-containing dendritic cell vaccine induces CTLs and reactivates latent HIV-1 in vitro. *Gene Therapy*. 2015;22(3):227-36.

Odegard EH. Dendritic Cell-Targeted Vaccinations: A Promising Immunotherapeutic Approach to Cancer Treatment. [S.l.] : University Honors Theses, 2015. p.1–64.

Okada S, Puel A, Casanova JL, Kobayashi M. Chronic mucocutaneous candidiasis disease associated with inborn errors of IL-17 immunity. *Clin. Transl. Immunol*. 2016;5:e114.

Oliphant CJ, Barlow JL, McKenzie AN. Insights into the initiation of type 2 immune responses. *Immunology*. 2011 Dec; 134(4):378-85.

Oliveira MM, Almeida-Paes R, Gutierrez-Galhardo MC, Zancope-Oliveira RM. Molecular identification of the *Sporothrix schenckii* complex. *Rev Iberoam Micol.* v.31, n.1, p.2–6, 2014.

Oliveira MM, Maifrede SB, Ribeiro MA, Zancope-Oliveira RM: Molecular identification of *Sporothrix* species involved in the first familial outbreak of sporotrichosis in the state of Espírito Santo, Southeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013, 108:936–938.

Oliveira TG, Borges O, Cruz T. Imunoterapia anti-tumoral com células dendríticas. *Acta Farmacêutica Portuguesa.* 2013; 45–60.

Orofino-Costa R, Macedo PM, Rodrigues AM, Bernardes-Engemann AR. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. *An Bras Dermatol.* 2017 Sep-Oct; 92(5): 606–620

Palucka K, Banchereau J. Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. *Immunity*, 2013. Volume 39, Issue 1, 25 July 2013, Pages 38-48

Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature reviews. Cancer.* 2012; 265–277.

Parente-Rocha JA, Bailão AM, Amaral AC, Taborda CP, Pაცეც JD, Borges CL, Pereira M. Antifungal Resistance, Metabolic Routes as Drug Targets, and New Antifungal Agents: An Overview about Endemic Dimorphic Fungi. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:9870679

Pass GJ, Carrie D, Boylan M, Lorimore S, Wright E, Houston B, Henderson CJ, Wolf CR. Role of hepatic cytochrome p450s in the pharmacokinetics and toxicity of cyclophosphamide: Studies with the hepatic cytochrome p450 reductase null mouse. *Cancer Res.* 2005;65:4211-17.

Paul WE, Zhu J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol.* 2010 Apr; 10(4):225-35.

Pereira SA, Passos SR, Silva JN. Response to azolic anti-fungal agents for treating feline sporotrichosis. *Vet Rec.* 2010. 166: 290–294.

Pereira SA, Menezes RC, Gremião ID, Silva JN, Honse CO, FIGUEIREDO FB. Sensitivity of cytopathological examination in the diagnosis of feline sporotrichosis. *J Fel Med Surg.* 2011. 13:220-223.

Pereira SA, Gremião IDF, Kitada AAB, Boechat JS, Viana PG, Schubach TMP. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014. 47(3):392–3.

Perruccio K, Bozza S, Montagnoli C, Bellocchio S, Aversa F, Martelli M, Bistoni F, Velardi A, Romani L. Prospects for dendritic cell vaccination against fungal infections in hematopoietic transplantation. *Blood Cells Mol Dis.* 2004;33:248-55.

Portuondo DL, Batista-Duharte A, Ferreira LS, De Andrade CR, Quinello C, Téllez-Martínez D, De Aguiar Loesch ML, Carlos IZ. Comparative efficacy and toxicity of two vaccine candidates against *Sporothrix schenckii* using either Montanide™ Pet Gel A or aluminum hydroxide adjuvants in mice. *Vaccine*. 2017;35:4430–4436.

Portuondo DL, Batista-Duharte A, Ferreira LS, Martínez DT, Polesi MC, Duarte RA, De Paula E Silva AC, Marcos CM, Almeida AM, Carlos IZ. A cell wall protein-based vaccine candidate induce protective immune response against *Sporothrix schenckii* infection. *Immunobiology*. 2016;221:300–309.

Portuondo DL, Batista-Duharte A, Ferreira LS, Roberto C, Quinello CC, Téllez-Martínez, Loesch ML, Carlos IZ. Comparative efficacy and toxicity of two vaccine candidates against *Sporothrix schenckii* using either Montanide™ Pet Gel A or aluminum hydroxide adjuvants in mice. *Vaccine*, 2017, 35:4430-4436.

Quinello C, Ferreira LS, Picolli I, Loesch ML, Portuondo DL, Batista-Duharte A, Carlos IZ. *Sporothrix schenckii* Cell Wall Proteins-Stimulated BMDCs Are Able to Induce a Th1-Prone Cytokine Profile *In Vitro*. *J Fungi (Basel)*. 2018. 2, 4(3). pii: E106. doi: 10.3390/jof4030106

Ramachandra L, Chu RS, Askew D, Noss EH, Canaday DH, Potter NS, Johnsen A, Krieg AM, Nedrud JG, Boom WH, Harding CV. Phagocytic antigen processing and effects of microbial products on antigen processing and T-cell responses. *Immunol Rev*. 1999;168:217-39.

Ramos-E-Silva M, Lima CM, Schechtman RC, Trope BM, Carneiro S. Systemic mycoses in immunodepressed patients (AIDS). *Clin Dermatol*. 2012;30:616- 27.

Rappleye CA, Eissenberg LG, Goldman W. E. *Histoplasma capsulatum* α -(1-3)-glucan blocks innate immune recognition by the β -glucan receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 4 (104), 1366-70, Jan 23, 2007.

Rochette F, Engelen M, Vanden Bossche H. Antifungal agents of use in animal health-practical applications. *J Vet Pharmacol Ther*. 2003;26:31-53

Rodrigues AM, De Hoog GS, De Camargo ZP. *Sporothrix* species causing outbreaks in animals and humans driven by animal-animal transmission. *PLoS Pathog*. 2016.

Rodrigues AM, Kubitschek-Barreira PH, Fernandes GF, De Almeida SR, Lopes-Bezerra LM, De Camargo Z. Immunoproteomic analysis reveals a convergent humoral response signature in the *Sporothrix schenckii* complex. *Journal of proteomics* 2015, 115, 8-22.

Rodrigues AM, Cruz Choappa R, Fernandes GF, De Hoog GS, Camargo ZP. *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. *Fungal Biol*. 2015a;1–19.

Rodrigues AM, De Hoog GS, De Camargo ZP. Molecular Diagnosis of Pathogenic *Sporothrix* Species. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9, 1–22

Rodrigues AM, De Hoog GS, Zhang Y, De Camargo ZP. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. *Emerg Microbes Infect.* 2014; 3(5):e32.

Rodrigues AM, De Hoog GS, De Camargo ZP. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. *Diagn Microbiol Infect Dis.* Elsevier Inc.; 2014; 78, 383–7.

Rodrigues A M, Hoog S, Camargo ZP. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Medical Mycology*, v.51, 405–412, 2013.

Rodrigues AM, De Melo Teixeira M, De Hoog GS, Schubach TMP, Pereira SA, Fernandes GF. Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(6).

Romagnoli G, Nisini R, Chiani P, Mariotti S, Teloni R, Cassone A, Torosantucci A. The interaction of human dendritic cells with yeast and germ-tube forms of *Candida albicans* leads to efficient fungal processing, dendritic cell maturation, and acquisition of a Th1 response-promoting function. *J Leukoc Biol.* 2004;75(1):117-26.

Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* v.11, p.275– 288, 2011.

Romeo O, Criseo. What lies beyond genetic diversity in *Sporothrix schenckii* species complex? New insights into virulence profiles, immunogenicity and protein secretion in *S. schenckii* isolates. *Virulence* 2013 1;4(3):203-6.

Rossi CN, Odaguiri J, Larsson CE. Clinical and epidemiological characterization of sporotrichosis in dogs and cats (São Paulo, Brazil). *Semina: Ciências Agrárias, Londrina* 2013, v. 34, n. 6, suplemento 2, p. 3889-3896.

Sahoo A, Wali S, Nurieva R. T helper 2 and T follicular helper cells: Regulation and function of interleukin-4. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016 Aug;30:29-37. doi: 10.1016/j.cytogfr.2016.03.011. Epub 2016 Mar 31.

Sassá MF, Ferreira LS, Ribeiro LCA, Carlos I Z. Immune response against *Sporothrix schenckii* in TLR-4-Deficient mice. *Mycopathologia.* v.174, p.21-30, 2012.

Sassá MF, Sauri AE, Souza LF, Ribeiro LC, Sgarbi DB, Carlos IZ. Response of macrophage Toll-like receptor 4 to a *Sporothrix schenckii* lipid extract during experimental sporotrichosis. *Immunology*, v.128, p.301-309, 2009.

Shen H, Shi LZ. Metabolic regulation of TH17 cells. *Mol Immunol.* 2019 May;109:81-87. doi: 10.1016/j.molimm.2019.03.005. Epub 2019 Mar 20. Review.

Sidrim JJC, Rocha MFG. *Micologia Médica a Luz de Autores Contemporâneos.* 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004. 388 p.

Silva MA, Pereira JP. Esporotricose Humana: Conhecendo e cuidando em enfermagem *Rev. Enferm. Uerj*, Abr/Jun; 2009; 17(2):268-72.

Silva LBR, Dias LS, Rittner GMG, Muñoz JE, Souza ACO, Nosanchuk Jd, Travassos LR, Tabora CP. Dendritic Cells Primed with *Paracoccidioides brasiliensis* Peptide P10 Are Therapeutic in Immunosuppressed Mice with Paracoccidioidomycosis. *Front Microbiol.* 2017 Jun 14;8:1057. doi: 10.3389/fmicb.2017.01057. eCollection 2017.

Silva LBR, Taira CL, Dias LS, Souza ACO, Nosanchuk JD, Travassos LR, Tabora CP. Experimental Therapy of Paracoccidioidomycosis Using P10-Primed Monocyte-Derived Dendritic Cells Isolated From Infected Mice. *Front Microbiol.* 2019 Jul 31;10:1727. doi: 10.3389/fmicb.2019.01727. eCollection 2019.

Sistigu A, Viaud S, Chaput N, Bracci L, Proietti E, Zitvogel L. Immunomodulatory effects of cyclophosphamide and implementations for vaccine design. *Semin Immunopathol.* 2011;33:369-83.

Specht CA, Lee CK, Huang H, Hester MM, Liu J, Luckie BA, Santana MAT, Mirza Z, Khoshkenar P, Abraham A, Shen ZT, Lodge JK, Akalin A, Homan J, Ostroff GR, Levitz SM. Vaccination with Recombinant Cryptococcus Proteins in Glucan Particles Protects Mice against Cryptococcosis in a Manner Dependent upon Mouse Strain and Cryptococcal Species. *MBio.* 2017 Nov 28;8(6). pii: e01872-17. doi: 10.1128/mBio.01872-17.

Srivastava S, Jackson C, Kim T, Choi J, Lim M. A Characterization of Dendritic Cells and Their Role in Immunotherapy in Glioblastoma: From Preclinical Studies to Clinical Trials. *Cancers (Basel).* 2019 Apr; 11(4): 537.

Stuehler C, Khanna N, Bozza S, Zelante T, Moretti S, Kruhm M, Lurati S, Conrad B, Worschech E, Stevanovic S, Krappmann S, Einsele H, Latge JP, Loeffler J, Romani L, Topp MS. Cross-protective TH1 immunity against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. *Blood.* 2011;117:5881–5891

Tabora CP, Nosanchuk JD. Editorial: Vaccines, Immunotherapy and New Antifungal Therapy against Fungi: Updates in the New Frontier. *Front Microbiol.* 2017 Sep 8;8:1743.

Tacke PJ, Zeelenberg IS, Cruz LJ, Van Hout-Kuijper MA, Van De Glind G, Fokink RG, Lambeck AJ, Figdor CG. Targeted delivery of TLR ligands to human and mouse dendritic cells strongly enhances adjuvanticity. *Blood.* 2011;118:6836-44.

Thind SK, Tabora CP, Nosanchuk JD. Dendritic cell interactions with *Histoplasma* and *Paracoccidioides*. *Virulence.* 2015. 6, 424–432.

Trinchieri, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells., 204 (2): 239, 2007.

Ueno K, Urai M, Sadamoto S, Shinozaki M, Takatsuka S, Abe M, Otani Y, Yanagihara N, Shimizu K, Iwakura Y, Shibuya K, Miyazaki Y, Kinjo Y. A dendritic cell-based systemic vaccine induces long-lived lung-resident memory Th17 cells and ameliorates pulmonary mycosis. *Mucosal Immunol.* 2019 Jan;12(1):265-276. doi: 10.1038/s41385-018-0094-4. Epub 2018 Oct 2.

Ueno K, Kinjo Y, Okubo Y, Aki K, Urai M, Kaneko Y, Shimizu K, Wang Dn, Okawara A, Nara T, Ohkouchi K, Mizuguchi Y, Kawamoto S, Kamei K, Ohno H, Niki Y, Shibuya K, Miyazaki Y. Dendritic cell-based immunization ameliorates pulmonary infection with highly virulent *Cryptococcus gattii*. *Infect Immun*. 2015 Apr;83(4):1577-86. doi: 10.1128/IAI.02827-14. Epub 2015 Feb 2.

Uenotsuchi T1, Takeuchi S, Matsuda T, Urabe K, Koga T, Uchi H, Nakahara T, Fukagawa S, Kawasaki M, Kajiwara H, Yoshida S, Moroi Y, Furue M. Differential induction of Th1-prone immunity by human dendritic cells activated with *Sporothrix schenckii* of cutaneous and visceral origins to determine their different virulence. *Int Immunol*. 2006 Dec;18(12):1637-46. Epub 2006 Oct 11.

Ugur M, Mueller SN. T cell and dendritic cell interactions in lymphoid organs: More than just being in the right place at the right time. *Immunol Rev*. 2019 May;289(1):115-128. doi: 10.1111/imr.12753.

Van der Sluis RM, van Montfort T, Pollakis G, Sanders RW, Speijer D, Berkhout B, et al. Dendritic Cell-induced Activation of Latent HIV-1 Provirus in Actively Proliferating Primary T Lymphocytes. *Plos Pathogens*. 2013;9(3).

Vásquez-Del-Mercado E, Arenas R, Paadilla-Desgarenes C. Sporotrichosis. *Clinics in Dermatology*. v.30, p. 443-447, 2012.

Veerdonk FL, Joosten LA, Netea MG. The interplay between inflammasome activation and antifungal host defense. *Immunological Reviews* v.265, p.172–180, 2015.

Verdan FF, Faleiros JC, Ferreira LS, Monnazzi LG, Maia DC, Tansine A, Placeres MC, Carlos IZ, Santos-Junior RR. Dendritic cell are able to differentially recognize *Sporothrix schenckii* antigens and promote Th1/Th17 response in vitro. *Immunobiology*. 2012;217:788–794.

Verma A, Wüthrich M, Deepe G, Klein B. Adaptive Immunity To Fungi. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014 Nov 6;5(3):a019612. doi: 10.1101/cshperspect.a019612.

Vikram K. Mahajan. Sporotrichosis: An Overview and Therapeutic Options. *Dermatology Research and Practice*. Volume 2014, Article ID 272376, 13 pages.

Walker JA, McKenzie ANJ. T_H2 cell development and function. *Nat Rev Immunol*. 2018 Feb;18(2):121-133. doi: 10.1038/nri.2017.118. Epub 2017 Oct 30.

Wallet MA, Sen P, Tisch R. Immunoregulation of Dendritic 13 Cells, *Clinical Medicine & Research*. 2005. 3(3), 166–175.

Wan YY. GATA3: a master of many trades in immune regulation. *Trends in Immunology*, 35(6), 233–42, 2014.

Wiseman AC. Immunosuppressive Medications. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016;11(2):332-43.

Worbs T, Hammerschmidt SI, Förster R. Dendritic cell migration in health and disease. *Nature Reviews Immunology* volume17, pages30–48 (2017)

Wuthrich M, Gern B, Hung CY, Ersland K, Rocco N, Pick-Jacobs J, Galles K, Filutowicz H, Warner T, Evans M, Cole G, Klein B. Vaccine-induced protection against 3 systemic mycoses endemic to North America requires Th17 cells in mice. *J Clin Invest.* 2011;121:554–568.

Wynn TA. Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies. *Nat Rev Immunol.* 2015 May; 15(5):271-82.

Yelverton CB, Stetson CL, Bang RH, Clark JW, BUTLER DF. Fatal sporotrichosis. *Cutis.* 2006 Oct; 78(4):253-6.

Yuan S, Zhang S, Zhuang Y, Zhang H, Bai J, Hou Q. Interleukin-17 Stimulates STAT3-Mediated Endothelial Cell Activation for Neutrophil Recruitment. *Cell Physiol Biochem.* 2015;36(6):2340-56.

Zheng SG. Regulatory T cells vs Th17 : differentiation of Th17 versus Treg , are the mutually exclusive ?, *J Clin Exp Immunol* 2(1), 94–106, 2013.

Zhi Li, Gen L, Guangxun M. Pathogenic Fungal Infection in the Lung. *Front Immunol.* 2019; 10: 1524.

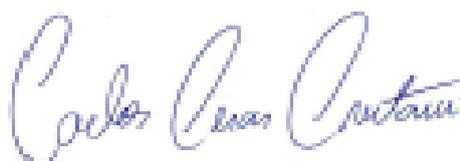
9. ANEXO

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação de células dendríticas ativadas como tratamento da esporotricose murina em modelo experimental", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAR: 07/2016, sob a responsabilidade de Juliana Aparecida Jellmayer e Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado ad-referendum pelo Coordenador da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em 18 de agosto de 2016.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Janeiro 2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Balb/c
Nº de animais	100
Peso/Idade	18 a 25 g 4 a 6 semanas
Sexo	Macho
Origem	CEMIB

Araraquara, 18 de agosto de 2016.



Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA