

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

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

MARIA LUIZA DE AGUIAR LOESCH

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ADESIVAS E
IMUNOGÊNICAS DA ENOLASE DE *Sporothrix* spp.**

ARARAQUARA - SP

2017

MARIA LUIZA DE AGUIAR LOESCH

Avaliação das propriedades adesivas e imunogênicas da enolase de *Sporothrix* spp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Campus de Araraquara, para a defesa de Dissertação de Mestrado, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

ARARAQUARA – SP
2017

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e
Documentação Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

L826a

Loesch, Maria Luiza de Aguiar

Avaliação das propriedades adesivas e imunogênicas da enolase de *Sporothrix* spp. /
Maria Luiza de Aguiar Loesch. – Araraquara, 2017.
83 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e
Biotecnologia Aplicada à Farmácia.

Orientadora: Iracilda Zeppone Carlos.

1. *Sporothrix*. 2. Enolase. 3. Adesão. 4. Esporotricose. I. Carlos, Iracilda Zeppone, orient.
II. Título.

CAPES: 40500005

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 (FAPESP), por meio da concessão da bolsa de mestrado (Processo nº2015/21501-3).

Dedicatória

Aos meus pais, Luiz e Tânia, que me mostraram com muito amor a importância da família, da honestidade e da persistência, e me apoiaram em todos os momentos, independente das dificuldades. E aos meus irmãos, Luiz Eduardo e Marta, que me incentivaram e sempre acreditaram em mim.

Agradecimentos

Agradeço, em primeiro lugar a Deus, por ser essencial em minha vida e ter me dado força e sabedoria durante esta caminhada.

Aos meus pais e irmãos, por me incentivarem sempre com um amor incondicional e não pouparem esforços para construir comigo meus sonhos.

À Prof^a Dr. Iracilda, pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de alguém com tanta sabedoria e pela confiança que depositou em mim. Meu respeito e admiração pela sua simplicidade e eficiência.

Aos alunos do laboratório de Imunologia Clínica, Amanda, Alexander, Camila, Camilla, Damiana, Deivys, Francine, Lucas, Lívia e Juliana, pela amizade e por compartilhar experiências, que foram extremamente importantes na minha formação acadêmica.

À Marisa, pelos ensinamentos técnicos, colaborações e por estar sempre presente, especialmente como amiga.

Ao Deivys, em especial, pela enorme ajuda na execução do trabalho e por me ensinar, orientar e cuidar de forma tão carinhosa.

Aos professores, funcionários e alunos da pós-graduação e do departamento de Análises Clínicas e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp de Araraquara, que gentilmente contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de Bolsa de Mestrado e apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Aos alunos e funcionários do Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Biofísica do Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo-USP e do Laboratório Multiusuário do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo de Piracicaba-SP, especialmente ao Prof. Dr. Júlio César Borges e Dr. Paulo Roberto Dores-Silva pela colaboração com parte dos experimentos.

À minha amiga, Veridiana, pelo companheirismo e por ter dividido comigo um lar de forma tão íntima e amorosa.

Aos meus familiares e amigos, que mesmo a distância contribuíram e torceram por essa conquista.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim, participando na construção e realização dos meus sonhos e fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

Madre Teresa de Calcutá

Lista de figuras e tabelas

Figura 1. Delineamento experimental desenvolvido

Figura 2. Padronização da curva de crescimento do isolado Ss250

Figura 3. Padronização da curva de crescimento do isolado Ss256

Figura 4. Perfil eletroforético das PSC de *Sporothrix spp.*

Figura 5. Gel de SDS-PAGE 10% para a expressão, indução e purificação da rEno.

Figura 6. Especificidade do soro sAnti-rEno contra rEno e imunoreatividade com as PSC de Ss250 e Ss256

Figura 7. Perfil eletroforético das PSC de *S. schenckii*16345 e immunoblotting com o *pool* de sAnti-rEno

Figura 8. Eletroforese bidimensional da proteína enolase de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* na fase leveduriforme.

Figura 9. Ligação da enolase aos componentes da MEC: fibronectina e plasminogênio

Figura 10. Titulação do soro sAnti-rEno por *immunoblotting*

Figura 11. sAnti-rEno inibe a adesão de Ss16345, Ss250 e Ss256 aos fibroblastos (Fb)

Figura 12. sAnti-Eno e sAnti-PSC favorecem a fagocitose dos dois isolados de *S. brasiliensis* por macrófagos peritoneais

Tabela 1 - Reagentes e volume para o preparo dos géis da eletroforese.

Tabela 2 - Coloração com nitrato de prata

Tabela 3 - Dosagem de PSC de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* (Ss250 e Ss256) na fase de crescimento logarítmico

Tabela 4 -Análise das proteínas dos isolados Ss250 e Ss256 sequenciadas através de espectrometria de massas

Lista de siglas e abreviaturas

ACN - Acetonitrila

AIDS- Síndrome de imunodeficiência adquirida

ANOVA - Análise de variância

BCA - Ácido bicinconínico

BHI -Infusão cérebro-coração

BSA- Albumina sérica bovina

D.O. - Densidade *óptica*

DTT- Ditioneitol

EDTA - Ácido etileno diamina tetra acético

ELISA - “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”

Fb - Fibroblastos

FcγR -Receptor para porção Fc de IgG.

FDR - Taxa máxima de descoberta de falso positivo

GFP - [glutamato sintase 1] *fibrinopeptídeo B*

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

IgG - Imunoglobulina G

IPTG - Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo

LC-MS -Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida

PAMPs - Padrões moleculares associados à patógenos

PBS - Solução salina tamponada de fosfatos

PBS-T - Solução salina tamponada de fosfatos com Tween 20

pI - Ponto isoelétrico

PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonilo

PRR - Receptor de reconhecimento de padrão

PSC- Proteínas da superfície celular

Q-TOF - Quadrupolo-tempo de voo

rEno - Enolase recombinante

sAnti-PSC - Soro de camundongo anti-PSC

sAnti-rEno - Soro de camundongo anti-rEno

sCI - Soro de camundongo infectado

sCNI - Soro de camundongo não infectado

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SFB -Soro fetal bovino

SINAN - Sistema Nacional de Agravos de Notificação

SPF - Livre de patógenos específicos

Ss16345 -Cepa de *Sporothrix schenckii* ATCC 16345

Ss250 - Isolado de gato de *Sporothrix brasiliensis* Ss250

Ss256 - Isolado de gato de *Sporothrix brasiliensis* Ss256

TBS-T - Solução salina tamponada com Tris com Tween 20

TEMED - Tetrametil-etodiamina

TFA - Ácido trifluoroacético

TLR - “Toll-like receptor”

UFC- Unidades formadoras de colônia

v/v - volume/volume

Sumário

Resumo	10
Abstract.....	11
1. Introdução	12
2. Revisão de literatura	13
2.1. Esporotricose e <i>Sporothrix</i> spp.....	13
2.2. Epidemiologia.....	14
2.3. A infecção e as formas clínicas	16
2.4. Fatores de virulência.....	18
2.5. Adesão e a enolase.....	20
2.6. Resposta imune.....	23
2.7. Tratamento e prevenção.....	25
3. Objetivos.....	27
3.1. Objetivos gerais	27
3.2. Objetivos específicos.....	27
4. Metodologia.....	28
4.1. Microrganismos	29
4.2. Condições de crescimento da cepa <i>S. schenckii</i> ATCC 16345.....	29
4.3. Condições de crescimento dos isolados de gatos Ss250 e Ss256	29
4.4. Extração de proteínas da superfície celular	30
4.5. Produção e purificação da enolase de <i>S. schenckii</i> ATCC 16345	31
4.6. Determinação da concentração de proteínas	32
4.7. Caracterização das proteínas por SDS-PAGE	32
4.8. Produção de soros policlonais em camundongos	33
4.9. <i>Immunoblotting</i> e titulação do sAnti-rEno	34
4.10. Purificação da enolase contida nas PSC por eletroeluição	35
4.11. Eletroforese bidimensional	35
4.12. Espectrometria de massas das PSC de <i>S. brasiliensis</i>	36
4.12.1. Digestão de <i>In-gel</i> de proteínas	36
4.12.2. Purificação das amostras	36
4.12.3. LC-MS ^E	37
4.12.4. Análise dos dados da espectrometria de massas.....	38
4.13. Ensaio de inibição da adesão	38
4.14. Obtenção de macrófagos para o ensaio de fagocitose	39
4.15. Ensaio de fagocitose	39

4.16. Determinação da capacidade de adesão da enolase a componentes da matriz extracelular	40
4.17. Análise estatística	41
5. Resultados.....	42
5.1. Padronização das curvas de crescimento dos isolados de gatos Ss250 e Ss256.....	42
5.2. Dosagem de proteínas.....	43
5.3. Caracterização das PSC por SDS-PAGE	44
5.4. Obtenção da enolase recombinante (rEno).....	44
5.5. Especificidade do sAnti-rEno e imunoreatividade com a enolase contida nas PSC de Ss250 e Ss256.....	45
5.6. SDS-PAGE das PSC e localização da Eno de Ss16345 por <i>immunoblotting</i>	46
5.7. Espectrometria de massas das PSC de <i>S. brasiliensis</i>	47
5.8. Eletroforese bidimensional da enolase da cepa <i>S. schenckii</i> ATCC 16345 e dos isolados Ss250 e Ss256.....	50
5.9. Titulação do sAnti-rEno por diluição seriada.....	51
5.10. Ensaio de inibição da adesão	52
5.11. Ensaio de fagocitose	53
5.12. Determinação da capacidade de adesão da enolase a componentes da matriz extracelular	54
6. Discussão	56
7. Conclusões.....	63
Referências	64

Resumo

A esporotricose é uma micose subcutânea aguda ou crônica causada por fungos termodimórficos do complexo de espécies de *Sporothrix schenckii* e pode acometer tanto animais como seres humanos. A doença tem distribuição mundial e no Brasil se tornou endêmica, sendo *S. schenckii* e *S. brasiliensis* as duas espécies patogênicas mais relacionadas à transmissão zoonótica associada principalmente ao gato. O tratamento convencional com antifúngicos é demorado e tem muitos efeitos adversos, especialmente em pacientes com imunocomprometidos. Logo, nos últimos anos tem-se focado a atenção sobre os componentes da parede celular de espécies do complexo *Sporothrix* que possam estar envolvidos na sua virulência, para serem utilizados como potenciais alvos antigênicos no diagnóstico e terapêutica contra a esporotricose. Recentemente, nosso grupo de trabalho demonstrou que um soro obtido em camundongos imunizados com um extrato de proteínas da superfície celular (PSC) de *S. schenckii* foi imunorreativo contra a enolase contida nesse extrato e uma outra proteína de função desconhecida. A capacidade desse soro de potencializar a fagocitose e inibir a adesão do fungo aos fibroblastos *in vitro*, e ainda a proteção por transferência passiva em animais infectados pelo fungo foi atribuída à sua atividade ligante de enolase. Diante disto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da enolase na adesão de *S. schenckii* ATCC 16345 e *S. brasiliensis* (Ss250 e Ss256) a fibroblastos assim como suas propriedades imunogênicas. A enolase de *S. schenckii* (rEno) foi obtida por via recombinante em *Escherichia coli* com alto grau de pureza, conferido por cromatografia de afinidade e exclusão molecular. O *immunoblotting* revelou a especificidade do soro anti-rEno e mostrou a reatividade desse soro com uma banda de proteína próxima a 50 kDa presente na PSC de Ss250 e Ss256. A enolase presente nessa banda e suas possíveis isoformas foram confirmadas por espectrometria de massas e eletroforese bidimensional, respectivamente. O alto título de anticorpos induzidos em camundongos contra a enolase em formulação ou não com o adjuvante de Freund revelou a imunogenicidade desta proteína. O soro anti-rEno foi capaz de reduzir a adesão das leveduras de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* a fibroblastos assim como potencializar a fagocitose das mesmas por macrófagos peritoneais. Esses resultados, unidos à capacidade de ligação da enolase a fibronectina e ao plasminogênio sugerem que a enolase de *Sporothrix spp* além de ser imunogênica pode estar envolvida na virulência do fungo, tornando-a um alvo relevante de estratégias vacinais e/ou terapêuticas na proteção contra a esporotricose.

Palavras-chave: *Sporothrix*. Enolase. Adesão.

Abstract

Sporotrichosis is an acute or chronic subcutaneous mycosis caused by thermophilic fungi from the *Sporothrix schenckii* species complex that can affect both humans and other animals. The disease is amply distributed worldwide and endemic in Brazil, with *S. schenckii* and *S. brasiliensis* being the two pathogenic species most associated to the zoonotic transmission which, in turn, involves mainly the domestic cat. The conventional antifungal therapy takes long and has adverse effects, especially in immunocompromised patients. In light of this, attention has been focused in recent years on the cell wall components of species from the *Sporothrix* complex that could be involved in their virulence, so that they could be used as potential antigenic targets in the diagnosis and therapy of sporotrichosis. Recently, we showed that a serum obtained from mice which had been immunized with a *S. schenckii* cell surface protein (CSP) extract reacted with enolase, found in the extract, and another protein of unknown function. The capacity of this serum to enhance phagocytosis and inhibit adhesion of the fungus to fibroblasts *in vitro*, as well as the protection afforded upon its passive transference into infected mice, was attributed to its enolase-binding activity. In face of the above, this study aimed to assess both the immunogenic properties and the role played by enolase in *S. schenckii* ATCC 16345 and *S. brasiliensis* (Ss250 and Ss256) adhesion to fibroblasts. The *S. schenckii* enolase (rEno) was obtained through the recombinant route in *Escherichia coli* in a highly purified form, as determined by both affinity and molecular exclusion chromatography. The specificity of the anti-rEno serum and its reactivity with a ~50 kDa protein band among the CSP from Ss250 and Ss256 was confirmed by immunoblotting. The presence of enolase in this band and the existence of possible isoforms were shown by mass spectrometry and two-dimensional electrophoresis, respectively. Moreover, the high anti-rEno titers induced in mice upon immunization with rEno alone or formulated with Freund's adjuvant showed that enolase is immunogenic. Furthermore, the anti-rEno serum was able to decrease the adhesion of *S. schenckii* and *S. brasiliensis* yeasts to fibroblasts, as well as to enhance their phagocytosis by peritoneal macrophages. These results, together with the fibronectin- and plasminogen-binding activity of enolase, suggest that the *Sporothrix* spp. enolase, besides being immunogenic, may have a role in the virulence of these fungi, making it a relevant target for therapeutic and/or vaccine strategies against sporotrichosis.

Keywords: *Sporothrix*. Enolase. Adhesion.

1. Introdução

A esporotricose é uma micose granulomatosa aguda ou crônica que embora seja distribuída por todo o mundo, está presente especialmente em zonas tropicais e subtropicais acometendo animais e seres humanos (MARIMON *et al.*, 2007, 2008; MESSIAS *et al.*, 2013; LOPES-BEZERRA *et al.*, 2006; ROMEO & CRISEO, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014). Baseado em estudos moleculares e de aspectos fisiológicos foi estabelecido que o agente causal da doença é um complexo de espécies *Sporothrix schenckii* (LOPES-BEZERRA *et al.*, 2006; MARIMON *et al.*, 2007, 2008, b; OLIVEIRA *et al.*, 2014; TÉLLEZ *et al.*, 2014) que inclui: *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix mexicana*, *Sporothrix luriei*, *Sporothrix pallida* e *S. schenckii sensu stricto* (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

As duas espécies mais patogênicas do complexo têm sido associadas às áreas endêmicas: *S. schenckii* e *S. brasiliensis* (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2012; CASTRO *et al.*, 2013; ALMEIDA-PAES *et al.*, 2014), sendo *S. brasiliensis* o agente etiológico prevalente da esporotricose felina no Brasil, especialmente no Rio de Janeiro, onde a doença assumiu proporções epidêmicas (de LIMA BARROS *et al.*, 2010; ALMEIDA-PAES *et al.*, 2012; RAMOS-E-SILVA *et al.*, 2012; BORGES *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2013a; RODRIGUES *et al.*, 2013b).

A infecção geralmente ocorre através de inoculação pós-traumáticas dos fungos, presentes nos solos, plantas e materiais orgânicos contaminados (LA HOZ *et al.*, 2012) ou através da transmissão zoonótica após inoculação por arranhões, mordidas ou contato com animais infectados (MARIMON *et al.*, 2007; RAMOS-E-SILVA *et al.*, 2007; CRUZ, 2013; LLORET *et al.*, 2013). Dependendo da rota de infecção e estado imunológico do hospedeiro (ARENAS, 2005; KONG *et al.*, 2006; FERNANDES *et al.*, 2013) as manifestações clínicas da esporotricose podem se apresentar como: cutânea fixa, linfocutânea, cutânea disseminada ou extracutânea geralmente associada a pacientes imunocomprometidos (TRAVASSOS & LLOYD, 1980; BARROS *et al.*, 2010), sendo a linfocutânea a mais freqüente e (BERNARDES-ENGEMANN *et al.*, 2009) caracterizada por lesões ulcerativas, ao longo dos vasos linfáticos (LYON *et al.*, 2003).

O tratamento desta micose com antifúngicos convencionais é demorado e tem muitos efeitos adversos (BARROS *et al.*, 2010). Neste sentido, nos últimos anos tem-se focado a atenção sobre os componentes da parede celular de espécies do complexo *Sporothrix* que possam estar envolvidos na sua virulência, como por exemplo, a enolase uma proteína

preditar recentemente como uma adesina de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* (PORTUONDO *et al.*, 2016) que pode ser utilizada como potencial alvo antigênico no diagnóstico e terapêutica contra a esporotricose (ALBA-FIERRO *et al.*, 2014).

2. Revisão de literatura

2.1. Esporotricose e *Sporothrix* spp.

Doenças causadas por fungos oportunistas são um problema crescente de saúde pública, especialmente para indivíduos imunocomprometidos. A esporotricose é uma micose subcutânea aguda ou crônica que acomete animais e seres humanos, a mesma é causada por fungos termodimórficos do complexo de espécies *Sporothrix schenckii* (MARIMON *et al.*, 2007, 2008). Em 1898, Benjamin Schenck (SCHENCKI B., 1898) descreveu um fungo isolado de lesões cutâneas de um quadro patológico semelhante ao típico da esporotricose. Dois anos depois, Hektoen e Perkins (HEKTOEN & PEERKINS, 1900) classificaram o fungo observado por Schenck como *Sporothrix schenckii*. As primeiras informações sobre esse fungo no Brasil foram feitas por Lutz e Splendore, em 1907, quando relataram os primeiros casos de esporotricose em pacientes brasileiros (LUTZ & SPLENDORE, 1907). Recentemente, com base em estudos moleculares, morfológicos e fisiológicos, as espécies de interesse clínico têm sido agrupadas em diferentes clades: *S. brasiliensis* (Clade I), *S. schenckii* sensu stricto (Clade IIa e Clade IIb), *S. globosa* (Clade III), e *S. luriei* (Clade VI) (ZHOU *et al.*, 2014), *S. mexicana* (Clade IV) e *S. pallida* (Clade V) identificadas como menos relacionadas à clínica (RODRIGUES *et al.*, 2013a).

Sporothrix schenckii é um organismo eucariótico, sem mobilidade e heterotrófico (BARROS *et al.*, 2011). Taxonomicamente, as espécies pertencem ao reino *Fungi*, filo *Ascomycota*, classe *Pyrenomycetes*, ordem *Ophiostomatales*, família *Ophiostomataceae* e gênero *Sporothrix* (GUARRO *et al.*, 1999; ROMEO & CRISEO, 2013). Os fungos do complexo *S. schenckii* são saprófitas ambientais que podem ser isolados a partir do solo e plantas contaminados (BARROS *et al.* 2011). Quando encontrados em solo rico em celulose, temperatura entre 25 e 30° C, pH entre 3,5 e 9,4, e alta umidade (NORIEGA *et al.*, 1993), apresenta-se na forma miceliar caracterizado por hifas hialinas finas, regularmente septadas, com conídios de 1-2µm de diâmetro, ovais, piriformes ou alongados (LOPES-BEZERRA *et al.*, 2006). À temperatura de 35° C a 37° C os fungos do complexo *S. schenckii* crescem em forma de leveduras, as quais são fusiformes e ovóides ou também observadas como células

alongadas de diferentes formas, geralmente descritas como elementos unicelulares em forma de “charutos”. (NICOT & MARIAT, 1973; GHOSH *et al.*, 2002).

2.2. Epidemiologia

Atualmente, estudos utilizando métodos moleculares ou de sequenciamento de genomas melhoraram a compreensão sobre a diversidade genética e relações filogenéticas entre os organismos, e também facilitaram a identificação de novas espécies ou o reconhecimento delas fora das regiões tradicionais de endemicidade (SCHWARTZ *et al.*, 2016). Entre as doenças causadas por fungos dimórficos, a esporotricose destaca-se por ter uma endemicidade muito difundida, os agentes etiológicos distribuídos no meio ambiente e possui características clínicas que variam entre as regiões geográficas (CHAKRABARTI *et al.*, 2015).

Baseado em estudos filogenéticos, foram classificadas as seis espécies do complexo *Sporothrix* (MARIMON *et al.*, 2006, 2008) as quais diferem um pouco na sua distribuição geográfica, por exemplo, *Sporothrix globosa* é encontrada em todo o mundo, descrita em amostras clínicas na Europa (Reino Unido, Espanha, Itália), Estados Unidos, América do Sul (México, Guatemala, Colômbia), e Ásia (Índia, China, Japão) (YU *et al.*, 2013; CHAKRABARTI *et al.*, 2015). Semelhantemente, *S. schenckii sensu stricto* também tem ampla distribuição geográfica e foi isolado das Américas (Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Guatemala, México, Peru, Estados Unidos, Venezuela), Europa (França, Itália, Reino Unido), África (África do Sul) e Ásia (Japão) (RODRIGUES *et al.*, 2014). Enquanto que *Sporothrix brasiliensis* é uma espécie emergente restrita ao Brasil e altamente patogênica para os seres humanos e animais (RODRIGUES *et al.*, 2013b). Vários países da América Latina, como México, Venezuela, Uruguai, Colômbia e Peru, apresentam uma elevada incidência e prevalência da esporotricose (RODRIGUES *et al.*, 2013a; CARLOS & BATISTA-DUHARTE, 2015) que de modo geral é comumente encontrada em regiões tropicais e subtropicais (BARROS *et al.*, 2011) embora surtos e casos isolados são reportados por todo o mundo (RODRIGUES *et al.*, 2013a).

Recentemente, foi relatado um surto de esporotricose na região sudeste do Brasil e *S. brasiliensis* descrita como a causadora (RODRIGUES *et al.*, 2013b), essa espécie é considerada a mais patogênica dentro do complexo *Sporothrix* para os seres humanos e animais (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2012, 2014; CASTRO *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2013). No Brasil, especialmente no estado do Rio de Janeiro a esporotricose tem se

tornado uma zoonose endêmica e um importante problema de saúde pública, tendo o gato como a principal fonte de infecção (RODRIGUES *et al.*, 2013b). A esporotricose também tem sido encontrada em outros estados como: Minas Gerais (de SOUZA BARROS *et al.*, 2013), Rio Grande do Sul (MADRID *et al.*, 2007) e São Paulo, porém em menor proporção. No Estado de São Paulo há relatos de casos eventuais, sendo que no período de 1956 a 2001 foram identificados 51 casos em gatos e 15 em pacientes humanos (NOBRE *et al.*, 2001). No município de São Paulo, 25 gatos com esporotricose foram atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), no período de 1986 a 2002 e entre 1993 a 2011 foram relatados 29 gatos mais oito cães diagnosticados no mesmo hospital (ROSSI *et al.*, 2013). Em um estudo feito entre 2011 e 2013 na região do Distrito Administrativo de Itaquera, São Paulo, do total de 1.463 domicílios pesquisados, em 77 (5,3%) foi detectada a presença de 114 felinos com esporotricose. Destes, 68,4% foram confirmados laboratorialmente e 31,6% dos casos por critério clínico epidemiológico. O número de humanos e de cães com esporotricose identificados neste estudo foram 12 e 1, respectivamente (SILVA *et al.*, 2015).

Em um estudo do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, no Rio de Janeiro, Brasil, 83% dos pacientes e 85% dos cães estudados tiveram contato com gatos, 56% dos humanos relataram ter sido mordido ou arranhado por um gato com esporotricose anteriormente à ocorrência da doença (SCHUBACH *et al.*, 2008). Noutro estudo, foi relatado que *S. brasiliensis* é altamente prevalente entre os gatos (96,9%) e que os genótipos dos fungos isolados dos gatos foram idênticos aos de *S. brasiliensis* de seres humanos (RODRIGUES *et al.*, 2013b). Neste estado, entre os anos 1998 e 2009, o instituto diagnosticou a esporotricose em aproximadamente 2200 seres humanos e 3244 gatos (BARROS *et al.*, 2010). Por conseguinte, *S. brasiliensis* tem sido significativamente associado a transmissão por gatos (ZHANG *et al.*, 2015).

Segundo a Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro, analisando o banco de Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN/RJ), foram confirmados 830 casos de esporotricose entre os anos 2013 e 2014, evidenciando o aumento progressivo da incidência (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Mais recentemente, foi divulgado o Boletim Epidemiológico Esporotricose 007/2016 o qual informa que durante os anos de 2013 a 2016 foram notificados 3.377 casos suspeitos de esporotricose no Estado do Rio de Janeiro. Durante este período o percentual de confirmação dos casos, tanto laboratorial quanto clínico epidemiológico, se manteve acima de 60%. Dentre

os casos confirmados foi observada uma elevada prevalência em pessoas do sexo feminino. E além disso, foi reiterado que a endemia de esporotricose humana não apresenta um aumento no número absoluto de casos, mas sim uma expansão geográfica da doença no Estado do Rio de Janeiro, refletindo um aumento do número de municípios com notificação de casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Outro dado relevante é que neste estado a doença acomete principalmente populações pobres, de regiões com dificuldades socioeconômicas e ambientais que têm uma determinada condição de pavimentação incompleta, casa com jardim, solo exposto, com presença de lixo, mato e entulho, condições propícias para a criação de roedores e consequentemente presença de felinos, que no caso, são os gatos relatados como um método eficaz para manter o controle de roedores (de LIMA BARROS *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2012, 2015). Um indicativo de transmissão domiciliar da doença, tendo o gato como transmissor, é que a esporotricose vem se manifestando principalmente em mulheres na idade adulta produtiva, porém fora do mercado de trabalho (SILVA *et al.*, 2012).

2.3. A infecção e as formas clínicas

A infecção geralmente ocorre através da via clássica de transmissão que é a inoculação pós-traumática dos fungos na pele do hospedeiro, ao manusear matéria orgânica, durante atividades ocupacionais e recreativas (CHAKRABARTI *et al.*, 2015); a maioria dos casos ocorre em homens adultos que têm contato direto com o solo (SAMPALIO *et al.*, 1954; da ROSA *et al.*, 2005) por exemplo, pessoas que passam muitas horas em atividades ao ar livre e são frequentemente expostas a arranhões por espinhos, lascas e farpas, manejo de cana, esfagno, feno, gramíneas (BHUTIA *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2011) ou pelo contato direto com animais infectados, como cães e gatos (NUSBAUM *et al.*, 1983; PEREIRA *et al.*, 2014). Atividades como jardinagem, agricultura, caça ou outras que envolvem contato com a vegetação (ROMEO & CRISEO, 2013) são mais propícias para inoculação do fungo, por isso a micose é conhecida como "doença de jardineiro" (ENGLE *et al.*, 2007) ou "toxina da cana" (SONG *et al.*, 2013). A inoculação também pode ocorrer por acidentes de trabalho em laboratórios manipulando espécimes infectadas com *Sporothrix* (BARROS *et al.*, 2011; KAUFFMAN, 1999).

O aparecimento das diferentes formas clínicas da esporotricose depende da rota de infecção, do tipo de cepa e especialmente do estado imunológico do hospedeiro (ARENAS, 2005; KONG *et al.*, 2006; FERNANDES *et al.*, 2013), sendo esta uma micose rara em pacientes imunocompetentes pois poucos casos foram documentados (YAGNIK *et al.*, 2017). Tanto em humanos quanto em gatos, a doença pode apresentar diferentes manifestações

clínicas e ser classificada como infecção cutânea, linfocutânea, cutânea disseminada e extracutânea ou esporotricose sistêmica (BARROS *et al.*, 2010).

A forma cutânea é localizada na pele e tecido subcutâneo e, limita-se ao sítio de injúria sem envolvimento linfático (de ARAUJO *et al.*, 2001). A infecção linfocutânea é a manifestação mais comum e é caracterizada por úlceras superficiais nodulares e papulares e/ou lesões em placas vegetativas na pele e ao longo da trajetória de drenagem dos vasos linfáticos, normalmente associadas a linfangite e linfadenopatia (LYON *et al.*, 2003). A forma disseminada consiste de múltiplas e distantes lesões na pele e vísceras envolvendo pulmão, articulações, ossos e outros órgãos devido à disseminação hematogênica do sítio de inoculação primário ou do linfonodo (LOPES-BEZERRA *et al.*, 2006), é uma forma rara e ocorre na maioria das vezes em pacientes imunocomprometidos (ROMERO-CABELLO *et al.*, 2011). Em casos de pacientes não imunossuprimidos a disseminação tem sido atribuída a inoculações múltiplas por gatos domésticos (de LIMA BARROS *et al.*, 2004; FREITAS *et al.*, 2010). A forma sistêmica geralmente é associada a pacientes imunocomprometidos, com HIV, diabetes e alcoolismo (YAGNIK *et al.*, 2017) ou em processo de tratamento com quimioterápicos ou corticóides (ROCHA *et al.*, 2001; LOPES-BEZERRA *et al.*, 2006; FREITAS *et al.*, 2012; RAMOS-E-SILVA *et al.*, 2012; CHANG *et al.*, 2013; TRAVASSOS & LLOYD, 1980), o que sugere que o fungo *S. schenckii* é um patógeno oportunista emergente (FREITAS *et al.*, 2014) e associado à AIDS nos países onde esta micose ocorre (CARLOS & BATISTA-DUHARTE, 2015).

Outra manifestação clinicopatológica, porém menos freqüente é a forma respiratória ou pulmonar primária que pode ser adquirida pela inalação de conídios em ambientes contaminados podendo resultar em infecção disseminada (AUNG *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014). Sinais respiratórios ocorrem em cerca de um terço dos casos em felinos, representando a manifestação não-cutânea mais frequente (LLORET *et al.*, 2013).

A correlação entre doença disseminada e imunossupressão foi demonstrada por Freitas e colaboradores (2012) que relataram 21 casos de esporotricose em pacientes com HIV no Rio de Janeiro, demonstrando um amplo espectro clínico da doença, o qual varia de formas localizadas em pacientes sem AIDS (sem sinais clínicos de imunodeficiência) a doença disseminada e grave levando à morte. Neste estudo, foram observadas grandes e numerosas lesões nodulares e císticas, perfuração do septo em pacientes com AIDS, esporotricose osteoarticular e neurotropismo de *Sporothrix spp.*

A esporotricose felina também tem um amplo espectro, incluindo casos subclínicos da infecção até doença sistêmica grave com disseminação hematogênica de *Sporothrix schenckii*, que pode ocorrer devido a autoinoculação (LLORET *et al.*, 2013). Os gatos são altamente susceptíveis à infecção por *Sporothrix*, desenvolvem múltiplas lesões cutâneas com envolvimento da mucosa, especialmente do trato respiratório, e presença de grande carga de leveduras (GREMIÃO *et al.*, 2015). Clinicamente, as lesões cutâneas são caracterizadas por nódulos e úlceras e podem ser encontradas em três ou mais regiões anatomicas, geralmente cabeça, principalmente próximo ao nariz (SCHUBACH *et al.*, 2004). Consequentemente, os gatos apresentam um grande potencial para disseminar a doença para outros animais e seres humanos em um curto período de tempo devido à sua mobilidade, não ficando apenas restritos ao ambiente doméstico (NOBRE *et al.*, 2001; PEREIRA *et al.*, 2014; GREMIÃO *et al.*, 2015; SANCHOTENE *et al.*, 2015). E a infecção em gatos normalmente precede sua ocorrência em seus proprietários e cães (SCHUBACH *et al.*, 2006).

2.4. Fatores de virulência

A virulência dos microrganismos são responsáveis por desencadear inúmeras respostas imunes inatas e adaptativas no hospedeiro que dificultam a disseminação do microrganismo invasor podendo levar à sua erradicação ou resultar em prejuízo ao hospedeiro, causando assim a doença (TRABULSI, 2004; ALBA-FIERRO *et al.*, 2014). Os fatores de virulência são considerados recursos que os microrganismos utilizam para sobreviver e proliferar no hospedeiro (CASADEVALL, 2012a), como por exemplo, alguns microrganismos possuem mecanismos para a aquisição de ferro, capacidade de formar biofilmes e também de produzir enzimas proteolíticas que levam a uma maior virulência (CASADEVALL, 2006).

Vários estudos já mostraram diferenças na virulência entre as espécies de *Sporothrix* em relação à apresentação clínica, origem geográfica, genótipo e termotolerância (DIXON *et al.*, 1991; TACHIBANA *et al.*, 1998; KONG *et al.*, 2006; ARRILLAGA-MONCRIEFF *et al.*, 2009). Em um estudo, *Sporothrix brasiliensis* mostrou maior virulência quando comparado com *S. schenckii* e *S. globosa*, visto que após inoculações dos fungos em camundongos, *Sporothrix brasiliensis* apresentou uma maior carga fúngica, maior capacidade de disseminação e de infiltração em tecidos (ARRILLAGA-MONCRIEFF *et al.*, 2009; CASTRO *et al.*, 2013; FERNANDES *et al.*, 2013). Essa alta virulência observada em *S. brasiliensis* se correlaciona com alto grau de patogenicidade em felinos (RODRIGUES *et al.*, 2013) e humanos (SILVA-VERGARA *et al.*, 2012).

Um dos fatores de virulência apresentado por *S. schenckii*, assim como por outros fungos patogênicos, é a sua termotolerância (CASADEVALL *et al.*, 2006), que compete a capacidade de suportar e crescer na temperatura corpórea dos hospedeiros endotérmicos (HOGAN *et al.*, 1996). A variação de temperatura influencia e induz mudanças na composição da sua parede celular, provocando alteração do seu efeito patogênico, sendo assim um fator determinante para sua fase de desenvolvimento (de LIMA BARROS *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2013a; FERNANDES *et al.*, 2013). Outro importante fator de virulência é a melanina, que está presente na parede celular tanto na fase leveduriforme como nos conídios. A melanina é utilizada como mecanismo de resistência a diversas condições ambientais e tem a capacidade de reduzir: a suscetibilidade à degradação enzimática e drogas antifúngicas, a toxicidade de metais pesados, UV, radiação nuclear e temperaturas extremas, além de dificultar a mecanismos imunes do hospedeiro, especialmente a fagocitose (WANG & CASADEVALL, 1994a;1994b; ROSAS & CASADEVALL, 1997,2001; TABORDA *et al.*, 2008; GESSLER *et al.*, 2014; TELLEZ *et al.*, 2014, van DUIN *et al.*, 2002; STEENBERGEN *et al.*, 2004; NOSANCHUK & CASADEVALL, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2014). Além disso, os fungos patogênicos são capazes de produzir de proteases e outras enzimas, como lipases e ureases, que têm papel reconhecido na virulência por facilitarem a adesão e penetração do fungo nas células e tecidos do hospedeiro (ABI-CHACRA *et al.*, 2013). Almeida-Paes e colaboradores (2012) demonstraram essa atividade proteolítica a 37°C, de 14 isolados de *S. brasiliensis* e 1 *S. schenckii* obtidos de pacientes do Rio de Janeiro, região considerada hiperendêmica para esporotricose.

As proteínas de parede celular são consideradas imunogênicas e também importantes fatores de virulência (HUNG *et al.*, 2002; MCGWIRE *et al.*, 2002), constituem uma importante classe de biomoléculas que têm inúmeras funções, como enzimas, moléculas de adesão, antígenos e receptores de superfície (HOYER *et al.* 2001;SUNDSTROM, 2002; CHATTERJEE *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2007;NOGUEIRA *et al.*, 2010). A parede celular fúngica é a principal estrutura envolvida na interação com o hospedeiro, é constituída por polissacarídeos insolúveis, como a quitina e β -glucanas o que faz dela uma estrutura dinâmica e complexa que confere proteção e rigidez à célula, e pode mudar continuamente de acordo com alterações na condição de cultivo e estresse ambiental (LATGÉ, 2007). Em *S. schenckii* a parede celular é composta por uma fina camada de compostos peptídico-polissacarídicos, glucanas, galactomananas, ramnomananas, quitina, glicoproteínas, glicolipídeos e melanina (TRAVASSOS *et al.*, 1977; TRAVASSOS & LLOYD, 1980;

LOPES-BEZERRA *et al.*, 2006; LÓPEZ-ROMERO *et al.*, 2011) que pode ser parcialmente liberada no meio de cultura por atrito, compreendendo uma série de produtos conjuntamente chamados de exoantígenos, presentes tanto na fase miceliar quanto na leveduriforme (CASTILLO *et al.*, 1990; CARLOS *et al.*, 2009).

A quitina responsável pela integridade da parede celular, é constituída por resíduos de N-acetilglicosamina unidos por ligações β -1,4 (MUNRO & GOW, 2001), estruturalmente dá forma a levedura e encontra-se associada a pequenas quantidades de β -1,6-glucana e β -1,3-glucana na camada interna. Já as glicoproteínas concentram-se mais externamente à parede, estão associadas aos polímeros insolúveis ou como componentes intersticiais e estão envolvidas no processo de interação parasito-hospedeiro (GOZALBO *et al.*, 2004). A fração glicoprotéica, contém 33,5% de ramnose, 57% de manose e 14,2% de proteína, chamada de peptídeo-ramnomanana foi isolada da parede celular do *S. schenckii* na fase leveduriforme (SHIMONAKA *et al.*, 1975). As ramnomanas com cadeias laterais monorramnosil predominam em leveduras e conídios, enquanto as cadeias laterais dirramnosil predominam nas hifas. Os principais polímeros de carboidratos (quitina, α -glucana e β -glucana) são polissacarídeos insolúveis propostos como os responsáveis pela integridade estrutural e forma da parede celular (KANETSUNA *et al.*, 1969), a qual conferem forma e rigidez e parecem influenciar na função dos macrófagos. Estudos *in vitro* têm mostrado que a fagocitose de leveduras por macrófagos peritoneais é inibida pelas galactomananos e rhamnomannans purificadas a partir da superfície de células de *S. schenckii* (ODA *et al.*, 1983) assim como pelo extrato lipídico (CARLOS *et al.*, 2003).

2.5. Adesão e a enolase

A capacidade de adesão de um fungo é importante na colonização de diferentes estratos ambientais, sendo assim essencial para o estabelecimento da infecção e a patogênese de vários fungos, incluindo *S. schenckii* (VERSTREPEN & KLIS, 2007). As adesinas são, em sua maioria, glicoproteínas microbianas específicas que medeiam essa adesão através da interação com algumas proteínas da matriz extracelular do hospedeiro (TEIXEIRA *et al.*, 2009). As glicoproteínas são muitas vezes determinantes antigênicos que possuem uma alta imunogenicidade, ou seja, são capazes de ativar linfócitos e induzir uma resposta imune específica (PILLAI *et al.*, 2015). Um dos mais bem definidos determinantes antigênicos encontrado na parede celular tanto na fase miceliar como na leveduriforme do fungo, é uma glicoproteína de 70 kDa, conhecida como gp70. Estudos de microscopia confocal realizados

por Ruiz-Baca e colaboradores (2009), entre outros realizados com *S. schenckii* e *S. brasiliensis* determinaram a presença deste componente de parede celular presente em ambas as espécies, a qual é secretada e age como adesina, mediando a adesão do fungo na matrix subendotelial e dérmica (NASCIMENTO *et al.*, 2008; RUIZ-BACA *et al.*, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2014).

A Gp70 e outra glicoproteína com peso molecular ligeiramente menor (67 kDa) foram detectadas em diferentes isolados, essa variação pode estar relacionada a diferenças na glicosilação e substituição de aminoácidos pós-traducionais (TEIXEIRA *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2015). Vários pesquisadores caracterizaram essa glicoproteína nomeada 3-carboximuconato ciclase presente na parede celular de várias espécies do complexo *S. schenckii*, a qual pode apresentar até seis isoformas com peso molecular variando de 55 a 73 kD e ponto isoelétrico de 4.33 a 4.85 (RODRIGUES *et al.*, 2015). A gp70 é considerada uma proteína imunogênica, compartilhada entre espécies patogênicas de *Sporothrix spp* e que desempenha papéis fundamentais em patogenicidade da esporotricose (RODRIGUES *et al.*, 2015).

Ruiz-Baca e colaboradores (2009) realizaram estudos com anticorpos policlonais contra gp70 que permitiram investigar algumas propriedades desta molécula, assim como sua contribuição para a aderência fúngica. Experimentos de adesão indicaram que as células na fase leveduriforme se aderem abundantemente à derme da cauda de camundongos e, anti-gp70 é capaz de reduzir essa aderência em 81,4%. A imunogenicidade da carboximuconato ciclase foi confirmada por meio de um anticorpo monoclonal específico contra essa proteína durante a infecção experimental de camundongos com *S. schenckii* (NASCIMENTO *et al.*, 2005; 2008) e *S. brasiliensis* (de ALMEIDA *et al.*, 2015) e também pela reatividade cruzada com o soro de coelhos e humanos (SCOTT *et al.*, 1989; de ALMEIDA *et al.*, 2015). A presença desta proteína em várias espécies de interesse clínico dentro do complexo *Sporothrix* sugere o seu uso como biomarcadores proteicos potenciais para o diagnóstico e o tratamento da esporotricose (RUIZ-BACA *et al.*, 2009; 2011; 2013).

A interação patógeno-hospedeiro envolve moléculas de adesão presentes na camada mais exterior da parede celular de leveduras e conídios de *S. schenckii* como a gp70 (LIMA *et al.*, 1999, 2001) que são responsáveis pelo reconhecimento de ligantes na superfície do hospedeiro ou algum constituinte da membrana basal, como por exemplo, fibrinogênio, laminina, colágeno ou fibronectina (FURTADO *et al.*, 1992; VICENTINI *et al.*, 1994; MC

MAHON *et al.*, 1995; MENDES-GIANINNI *et al.*, 2000; SULLIVAN *et al.*, 2004; MENDES-GIANINNI *et al.*, 2006).

Estudos demonstram que o fungo apresenta integrinas ou adesinas localizadas na superfície celular, que reconhecem a fibronectina humana (LIMA *et al.*, 2001, TEIXEIRA *et al.*, 2009) que é uma glicoproteína dimérica, multifuncional da matriz extracelular, tem um papel fundamental na adesão e propagação celular (MOHRI, 1996). A laminina também é um importante componente das membranas basais, está envolvida em vários processos de adesão, tais como a coesão no interior dos tecidos, diapedese, metástase de tumores e infecções (BECK *et al.*, 1990). O fibrinogênio presente na membrana basal é uma das principais glicoproteínas solúveis do plasma e atua como precursor da fibrina, principal componente dos coágulos sanguíneos (SCHERAGA&LASKOWSKI, 1957; DOOLITTLE, 1984). E o plasminogênio é uma glicoproteína que tem a função de dissolver coágulos de fibrina em defesa do hospedeiro, sendo assim um componente essencial para manter a homeostase (PLOW *et al.*, 1995) e de grande importância nas doenças infecciosas pois muitos patógenos possuem a capacidade de se ligarem ao plasminogênio (STIE *et al.*, 2009; CORK *et al.*, 2009).

Em estudos imunoproteômicos em *S. suis* foi identificada a enolase como um importante antígeno com capacidade de ligação tanto ao plasminogênio como a fibronectina (ESGLEAS & LI *et al.* 2008), mediando assim a sua adesão e invasão às células do hospedeiro (OEHMCKE *et al.*, 2004).

A enolase (2-fosfo-D-glicerato hidrolase) é uma metaloenzima citosólica com função *moonlighting*, ou seja, ela pode desempenhar diversas funções bioquímicas ou biofísicas fisiologicamente relevantes (JEFFERY, 1999), ser uma proteína citoplasmática, estar presente também na superfície celular (SCHAUMBURG *et al.*, 2004) e estar amplamente expressa em muitos organismos.

Exemplos típicos de proteínas *moonlighting* são as enzimas citosólicas que podem ter função de citocinas, chaperonas, componentes do citoesqueleto, compactadores de DNA, adesinas ou scaffolds, bem como transportador de cloreto que regula outro canal transmembranar, proteínas ribossômicas que se duplicam como fatores de tradução e proteína de ligação de DNA que se torna um componente da matriz extracelular (NOBELI *et al.*, 1996; JEFFERY, 2003a, b, 2009, PIATIGORSKY, 2007; GANCEDO & FLORES, 2008; HUBERTS& van der KLEI, 2010; HENDERSON& MARTIN, 2011, 2013;

GUO&SCHIMMEL, 2013). Essas proteínas *moonlightings* são encontradas em mamíferos, leveduras, vermes, bactérias, plantas, vírus e muitos outros organismos (JEFFERY, 2015).

A principal função da enolase é na via metabólica de catalisar a conversão reversível do 2-fosfoglicerato para fosfoenolpiruvato (PANCHOLI, 2001), porém o envolvimento da enolase em outras funções intra- ou extracelulares também tem sido relatadas em diferentes organismos (KELLER *et al.*, 1995; VANEGAS *et al.*, 2007; MARCOS *et al.*, 2012). Estudos recentes demonstraram que em muitas espécies patogênicas e em diferentes tipos de células, a enolase está presente na parede celular, em membranas celulares, e no núcleo celular. Como já descrito, foi encontrada na parede celular de *Candida albicans* (EROLES *et al.*, 1997), *Aspergillus fumigatus* (DENIKUS *et al.*, 2005) e *Paracoccidioides brasiliensis* (MARCOS *et al.*, 2014), favorecendo a invasão e colonização por meio da sua capacidade de ligação a componentes da matrix extracelular.

Castaldo e colaboradores (2009) e Ramiah e colaboradores (2008) demonstraram que a enolase quando encontrada na superfície celular está envolvida no processo de adesão bacteriana a componentes da matriz extracelular, tais como: fibronectina, colágeno, elastina, laminina e glicosaminoglicanas para aumentar sua virulência (KREIS&VALE, 1993). Em *Lactobacillus plantarum*, por exemplo, a enolase localizada na superfície tem a capacidade de se ligar à fibronectina (CASTALDO *et al.*, 2009), e em algumas espécies de *Streptococcus* do grupo A, ao plasminogênio (PANCHOLI&FISCHETTI, 1998). Além da adesão, a presença da enolase no meio extracelular pode ser uma estratégia de virulência microbiana, pois é uma proteína altamente conservada que consegue driblar o sistema imune do hospedeiro com maior facilidade (DREISBACH *et al.*, 2010).

Diante disso, alguns estudos têm sugerido o uso da enolase para o diagnóstico da candidíase sistêmica, assim como um candidato vacinal contra esta e outras doenças (PITARCH *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2012; CARABARIN-LIMA *et al.*, 2014; DUTTA *et al.*, 2015).

2.6. Resposta imune

Os mecanismos imunológicos de prevenção e controle das infecções por *Sporothrix spp.* envolve resposta imune inata que desempenha uma função protetora importante na patogênese da esporotricose (CARLOS *et al.*, 1992, 2009) e envolve também a imunidade adquirida, que é mediada principalmente por células T ativadas por macrófagos (SHIRAISHI *et al.*, 1992; TACHIBANA *et al.*, 1999). Células como as dendríticas, macrófagos, mastócitos, monócitos e neutrófilos são fagócitos profissionais que constituem a primeira

linha de defesa do hospedeiro, permitindo a apresentação e processamento de antígenos dos patógenos invasores através da fagocitose (de ALMEIDA *et al.*, 2017), um mecanismo de defesa importante contra o *Sporothrix schenckii* (CUNNINGHAM *et al.*, 1979; ODA *et al.*, 1983).

A fagocitose depende da interação entre fagócitos e fungos, pode ser dividida basicamente em: reconhecimento fúngico, processo de fagocitose e morte intracelular do fungo. Os fungos em geral possuem β -glucanos, quitina e manoproteínas na sua superfície celular, o que permitem o reconhecimento de forma direta, por um conjunto de receptores de reconhecimento (PRRs), tais como receptores toll-like (TLRs) e de lectinas (LR), o quais reconhecem os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) comumente encontrados em vários agentes patogênicos, porém não presentes nos mamíferos. Por exemplo, Sassá e colaboradores (2012) em um estudo sobre a resposta imune contra esporotricose demonstraram que os receptores Toll-like, como TLR-4, são responsáveis pelo reconhecimento de *Sporothrix schenckii* e podem afetar o desenvolvimento da resposta inflamatória através da produção de H_2O_2 e liberação de citocinas, sugerindo um papel importante de TLR4 na administração das funções dos macrófagos nesta infecção fúngica. Em estudos anteriores do nosso grupo demonstraram a importância dos macrófagos e o envolvimento também do TLR2 (NEGRINI *et al.*, 2013; NEGRINI *et al.*, 2014), Caspase 1 e inflamasoma (GONÇALVES *et al.*, 2014) no reconhecimento do fungo *S. schenckii*.

O reconhecimento pode ocorrer também de forma indireta através das opsoninas, que são moléculas do hospedeiro que ligam-se a superfície de microrganismos, são reconhecidas por receptores dos fagócitos e levam a internalização do agente patológico, liberação de citocinas pró-inflamatórias e possivelmente a depuração da infecção através da ativação da fagocitose (NICOLA *et al.*, 2008). Wellington e colaboradores (2007) demonstraram que leveduras e tubos germinativos de *C. albicans* revestidas com anticorpos específicos são internalizados e mortos de forma mais eficaz do que as células não opsonizadas, confirmando que a fagocitose de fungos é mais eficaz quando opsonizados por exemplo, por anticorpos específicos (de LIMA FRANCO, 2012). Outros estudos demonstraram que células de levedura *S. schenckii* não são eficientemente internalizadas por macrófagos peritoneais, a menos que eles sejam primeiramente opsonizados com concanavalina A ou tratados com neuraminidase (ODA *et al.*, 1983). Em outro estudos, Nascimento e colaboradores (2005) demonstraram que antígenos secretados *S. schenckii* induzem uma resposta humoral específica em animais infectados, principalmente contra a molécula de 70 kDa, indicando a possível participação de

anticorpos específicos contra esta molécula no controle da infecção. Alinhado com isso, de Lima Franco e colaboradores (2012) com o objetivo de estudar a capacidade dos macrófagos de remover o microrganismo ou estimular a produção de citocinas, descobriram que a fagocitose de *S. schenckii* por macrófagos na presença de soro de camundongos infectados previamente com leveduras é superior ao soro de camundongos não infectados. Portanto, um importante mecanismo de proteção mediado por anticorpo é a opsonização do microrganismo pela porção Fc (FcγR) (ALVAREZ *et al.*, 2008).

2.7. Tratamento e prevenção

O tratamento tradicional da esporotricose é considerado laborioso, pois requer longos períodos e pode ocorrer recidiva, principalmente em pacientes imunocomprometidos (de ALMEIDA *et al.*, 2017). Diferentes drogas são utilizadas como: terbinafina, iodeto de potássio, itraconazol, fluconazol e a anfotericina B (SONG *et al.*, 2011). O itraconazol é atualmente o medicamento de escolha para o tratamento das formas cutâneas e osteoarticulares da esporotricose (GUTERRES *et al.*, 2014; MAHAJAN, 2015). A associação com outros antifúngicos ou imunomoduladores, como por exemplo a anfotericina B e a β -glucana, respectivamente, é utilizada para as formas mais graves da doença (ROP *et al.*, 2009; GUTERRES *et al.*, 2014). Como o tratamento não é considerado fácil, o uso de anticorpos específicos contra proteínas do *Sporothrix spp.* tem grande relevância para o processo terapêutico da doença.

Estudos já demonstraram que algumas doenças fúngicas, como paracoccidioidomicose (BUISSA-FILHO *et al.*, 2008) e candidíase (MORAGUES *et al.*, 2003), o uso de anticorpos monoclonais (mAb) confere proteção, pois podem modificar o curso da infecção como observado em infecção experimental por *Cryptococcus neoformans* (RIVERA *et al.*, 2005). De Almeida e colaboradores (2017), em um estudo utilizando anticorpos monoclonais demonstraram que o mAb contra gp70 (P6E7) diminuiu significativamente as infecções de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* *in vivo* (NASCIMENTO *et al.*, 2008, de ALMEIDA *et al.*, 2015).

Atualmente, não há disponibilidade de nenhuma vacina eficaz para prevenir a esporotricose, porém em estudos recentes, Portuondo e colaboradores (2017) propuseram a vacinação de gatos como estratégia de controle no Brasil, demonstrando que uma formulação de proteínas da parede celular de *Sporothrix brasiliensis* com adjuvantes Pet Gel A ou hidróxido de alumínio é a seguro e eficaz na indução de resposta imune protetora contra o fungo, apontando uma alternativa para o desenvolvimento de uma futura vacina veterinária.

Além disso, a reatividade cruzada apresentada por de *S. brasiliensis* pode ser útil para a imunoprofilaxia de várias espécies do complexo *Sporothrix* (PORTUONDO *et al.*, 2017).

Apesar de nos últimos anos terem sido propostas novas estratégias para o controle da esporotricose no Brasil, a taxa de incidência continua aumentando e ao mesmo tempo acentuando a categoria de micose endêmica no país (BARROS *et al.*, 2010; 2011; CHAKRABARTI *et al.*, 2015), devido ao tratamento ser de longa duração, ter muitas reações adversas e haver a indisponibilidade de forma gratuita para humanos e especialmente para gatos (BARROS *et al.*, 2010), e além disso fungos do complexo *Sporothrix* apresentam alta resistência aos antifúngicos. O diagnóstico da esporotricose apresenta falhas ou dificuldade, devido a confusão muitas vezes com outras doenças (RUIZ-BACA *et al.*, 2014), por isso tem-se apontado à busca de novas ferramentas para o tratamento e o diagnóstico mais eficazes do que os atuais métodos (de SOUZA *et al.*, 2011; ALMEIDA, 2012; PORTUONDO *et al.*, 2015). Alinhado com isto, nos últimos anos tem-se focado a atenção sobre os componentes da parede celular do fungo *S. schenckii* que possam estar envolvidos na virulência do fungo para serem utilizados como potenciais alvos para esses fins de diagnósticos e terapêuticos (ALBA-FIERRO *et al.*, 2014).

Um estudo recente do nosso grupo demonstrou que o soro obtido de camundongos imunizados com um extrato de proteínas da parede celular de *S. schenckii* ATCC 16345 formulado com o adjuvante hidróxido de alumínio apresentou reatividade contra duas proteínas, uma de 71 kDa e outra de 47 kDa. Essa última foi identificada como a enzima enolase presente nas cepas *S. schenckii* ATCC 58251, *S. schenckii* 1099-18 e *S. brasiliensis* 5110 e predita como uma adesina pela base de dados FungalRV (PORTUONDO *et al.*, 2016). Além desse soro potencializar a fagocitose e inibir a adesão do fungo aos fibroblastos *in vitro*, sua transferência passiva induziu proteção contra a infecção por *S. schenckii* ATCC 16345 em camundongos, indicando ser um importante alvo imunogênico.

Com base nesses antecedentes o atual estudo visa avaliar as propriedades adesivas e imunogênicas da enolase presente na parede celular de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* para ser utilizada como alvo potencial no desenvolvimento de testes diagnósticos assim como na terapêutica e prevenção contra esporotricose.

3. Objetivos

3.1. Objetivos gerais

O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades adesivas e imunogênicas da enolase de *S. schenckii* e *S. brasiliensis*.

3.2. Objetivos específicos

- Padronizar e caracterizar as curvas de crescimento dos isolados de *S. brasiliensis* Ss250 e Ss256
- Caracterizar o perfil de proteínas expressas na parede celular dos fungos durante a fase de crescimento logarítmica
- Obter anticorpos policlonais anti-proteínas da superfície celular e anti-enolase em camundongos
- Determinar se os anticorpos anti-enolase inibem a adesão de *S. schenckii* e dos dois isolados de *S. brasiliensis* aos fibroblastos.
- Determinar se os anticorpos anti-enolase favorecem a fagocitose das leveduras dos fungos pelos macrófagos
- Verificar a interação da enolase com os componentes da matriz extracelular: fibronectina e plasminogênio através de ELISA.

4. Metodologia

A Figura 1 descreve o delineamento experimental que foi desenvolvido para atingir os objetivos proposto do presente trabalho. Resumidamente, os fungos *S. schenckii* ATCC 16345 (Ss16345) e os dois isolados de gatos de *S. brasiliensis* (Ss250 e Ss256), mantidos na sua forma miceliar em meio Mycosel foram revertidos a sua forma de levedura em meio BHI à temperatura de 37° C. Conforme as curvas de crescimentos de cada fungo, foram extraídas as proteínas da superfície celular (PSC) de Ss250 e Ss256 na fase logarítmica as quais foram caracterizadas por SDS-PAGE. A enolase foi localizada no gel, eletroeluída em tampão glicina e posteriormente submetida à focalização isoeletrica em eletroforese bidimensional. As PSC e a enolase recombinante (rEno) de *S. schenckii* foram formuladas com o adjuvante de Freund e administrados a camundongos Balb/c por via subcutânea. Em seguida, o soro anti-enolase (sAnti-rEno) foi utilizado como reagente para identificar proteínas imunorreativas da superfície celular de cada fungo por *immunoblotting*. Além disso, esses soros também foram utilizados para avaliar suas propriedades de inibição dos fungos Ss16345, Ss250 e Ss256 aos fibroblastos e capacidade de favorecer a fagocitose *in vitro* de leveduras por macrófagos peritoneais. Por fim, foi verificada a capacidade de adesão da rEno aos componentes da matriz extracelular, como fibronectina e plasminogênio.

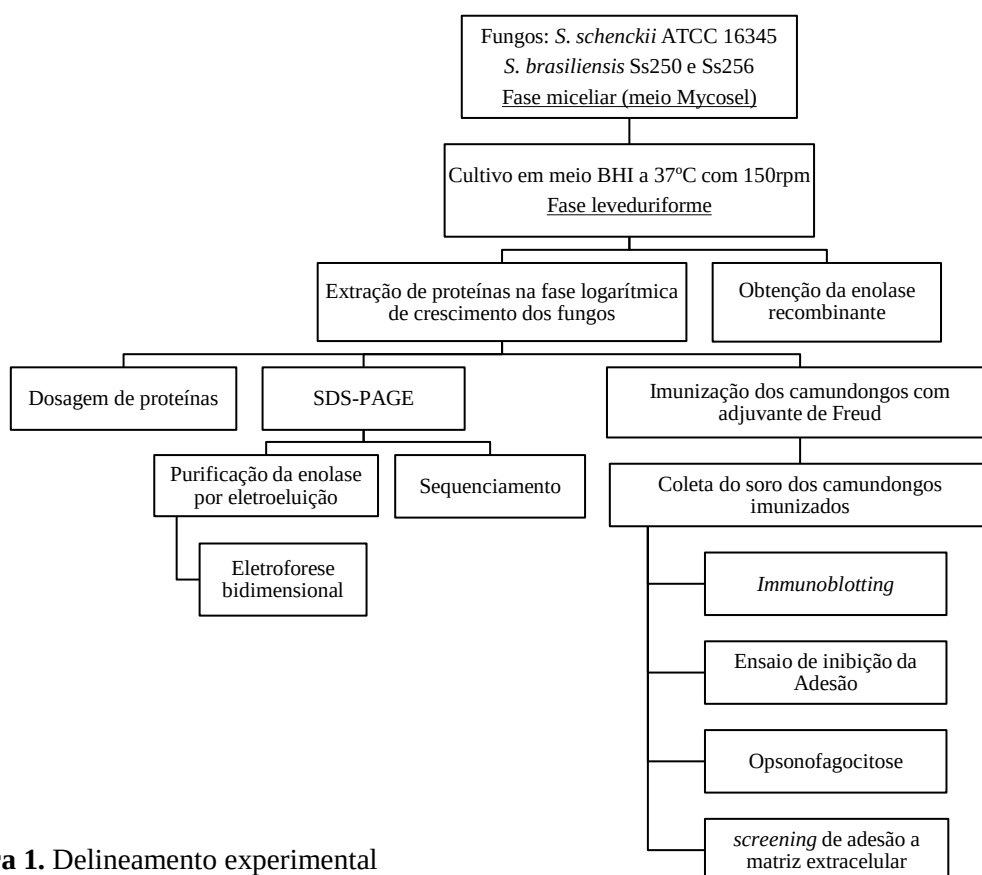


Figura 1. Delineamento experimental

4.1. Microrganismos

Neste estudo utilizou-se a cepa de *S. schenckii* ATCC 16345 (Ss16345), obtida de um caso de infecção pulmonar humano de esporotricose (Baltimore, MD) e cedida pelo Instituto Nacional de Infectologia (INI) Evandro Chagas da Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil. Também foram utilizados dois isolados de gatos de *S. brasiliensis* (Ss250 e Ss256), gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Sandro Antonio Pereira do laboratório de Pesquisa Clínica em Dematozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO) pertencente ao INI. Atualmente estas espécies são mantidas no Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Araraquara, na forma miceliar a 25° C em meio de cultura sólido Mycosel™ (BD Biosciences).

4.2. Condições de crescimento da cepa *S. schenckii* ATCC 16345

A forma de levedura da Ss16345 foi obtida conforme Ferreira e colaboradores (2015). Resumidamente, uma alíquota da fase miceliar a 25° C proveniente do meio de cultura sólido Mycosel™ (BD Biosciences) foi transferida para um Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio líquido BHI (Brain Heart Infusion, Difco) e cultivada a 37° C sob agitação constante de 150 rpm durante sete dias. Transcorrido esse tempo, uma alíquota contendo 2×10^7 leveduras do fungo foi transferida para um novo Erlenmeyer de 2000 mL, contendo 1000 mL de BHI e então cultivada por cinco dias nas mesmas condições anteriores. As leveduras obtidas neste tempo, o qual corresponde à fase logarítmica de crescimento do fungo, nas condições indicadas (FERREIRA *et al.*, 2015) foram utilizadas para a obtenção de proteínas da superfície celular descrito no item 4.4.

4.3. Condições de crescimento dos isolados de gatos Ss250 e Ss256

Para obter as formas de leveduras ou forma infectante de ambos os isolados de gatos Ss250 e Ss256, previamente foram determinadas e padronizadas suas curvas de crescimento em meio BHI seguindo as condições de cultura descrita no item anterior. Para isto, aproximadamente um centímetro quadrado do tapete celular da fase miceliar de ambos os fungos em meio Mycosel™ (BD Biosciences) foi transferido individualmente, para um frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio BHI e então cultivado a 37° C sob agitação constante (150 rpm) durante sete dias. Decorrido este tempo, uma alíquota de leveduras (2×10^5 leveduras) de Ss250 e uma de Ss256 foram transferidas para outros frascos de igual capacidade contendo 100 mL de meio BHI, e cultivadas nas mesmas condições anteriores de

agitação e temperatura. Alíquotas de 0,1 mL, correspondendo ao 0,1% do volume total da cultura foram retiradas diariamente a partir do terceiro dia até o décimo quarto dia de cultura. A partir destas amostras foi determinado a quantidade de leveduras, hifas, unidades fúngicas (aqui definidas como qualquer agrupamento de hifas e/ou leveduras em divisão) e o percentual de conversão de hifas-leveduras.

A viabilidade do fungo durante todo o experimento foi monitorada pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) crescida em placas de Petri contendo meio Mycosel, após três dias do plaqueamento e incubação à temperatura ambiente (MENDOZA *et al.*, 2012). O valor de cada variável assim como os ajustes das diluições feitas para monitorar o crescimento fúngico (100 – 150 colônias) foi obtido por contagem celular em câmara de Neubauer e os resultados foram expressos em função do tempo para a construção das curvas de crescimento.

4.4. Extração de proteínas da superfície celular

As PSC da cepa Ss16345 e dos dois isolados de gatos Ss250 e Ss256, foram extraídas na fase logarítmica de crescimento de cada fungo, seguindo o protocolo descrito por Castro e colaboradores (2013). Uma alíquota de leveduras (2×10^6 leveduras) de Ss250 e Ss256 obtidas de 7 dias de cultura em meio BHI foram transferida individualmente para um Erlenmeyer com capacidade 2000 mL contendo 1000 mL do mesmo meio e então cultivadas durante 5 dias nas mesmas condições descrita no item 4.3, sendo o quinto dia escolhido por estar dentro a fase logarítmica de crescimento das leveduras de ambos os isolados de gatos. Em seguida essas culturas e a da cepa Ss16345 obtida como descrito no item 4.2 foram centrifugadas a $1000 \times g$ durante 10 minutos e lavadas três vezes com 25mM de Tris-HCl pH 8,5 gelado. Em seguida, os *pellets* celulares foram incubados individualmente com solução de extração, contendo 2 mM de Ditioneitol (DTT) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), 1 μ M de PMSF e 5 mM de EDTA em 25 mM de Tris-HCl pH 8,5 e mantidos sob agitação leve durante 2 ou 3 horas a 4° C. Transcorrido esse tempo, o sobrenadante foi separado por centrifugação e filtrado com membrana de porosidade de 0,20 μ m. O filtrado foi dialisado contra água destilada a 4° C durante 48 horas com trocas de água a cada 12 horas e em seguida concentrado 100 vezes com sistema à vácuo Amicon (Millipore, EUA) utilizando uma membrana de celulose YM10 (Millipore) e posteriormente com tubos de filtração Amicon® Ultra-15 de 3 K (Millipore, EUA) conforme as orientações do fabricante. O extrato de proteínas de cada fungo foi alíquotado e estocado a -20° C. Para verificar a viabilidade celular das leveduras, assim como

a integridade da sua membrana, uma suspensão de leveduras corada com o “Kit”Live/Dead Yeast (MolecularProbes®, Life TechnologiesTM, Eugene, OR) antes e após serem tratadas com o tampão de extração de proteínas contendo DTT, conforme instruções do fabricante.

4.5. Expressão, produção e purificação da enolase de *S. schenckii*

O procedimento de obtenção da proteína enolase de *S. schenckii* por via recombinante foi realizado conforme Portuondo e colaboradores (2016). O DNA codificante da proteína enolase de 438 aminoácido (enolase *S. schenckii* ATCC 58251) (Genbank nº de referência ERS97971.1) a qual pertence ao cluster de identidade (Cluster ID) UniRef100_A0A0F2LYM2(http://www.uniprot.org/uniref/UniRef100_A0A0F2LYM2?sort=score) que inclui os fungos *S. schenckii* ATCC 58251, *S. schenckii* 1099-18 e *S. brasiliensis* 5110, foi sintetizado pela empresa Epoch Life Science Inc no vetor pET28a (pET28a::SsEno) com a expressão otimizada para *Escherichia coli*. O vetor pET28a possui como pontos estratégicos um gene que confere resistência à Kanamicina, o que torna possível selecionar as colônias positivas após o procedimento de transformação na cepa *E. coli*. A cepa *E. coli* DH5 α foi utilizada como hospedeiro nas rotinas de propagação do vetor pET28a::SsEno e a cepa *E. coli* BL21 (DE3) foi empregada como hospedeiro nas rotinas de expressão desta proteína. Para a expressão da enolase recombinante de *S. schenckii* ATCC 16345 (rEno) as células foram crescidas em meio LB (Luria-Bertani) à 37° C até D.O. = 0.6, quando então a temperatura foi reduzida para 30° C. A indução ocorreu durante 4 horas na presença de 0.2 mM de IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside).

Após indução as células foram centrifugadas à 8.000 rpm e a fração *pellet* foi congelada à -20° C. Para lise, as células foram ressuspensas em tampão Tris-HCl (pH=8,0) e 100 mM de KCl na presença de 5 U DNase (Promega) e 30 μ g/mL de lisozima (Sigma). O material foi incubado por 90 minutos em gelo. Após incubação a lise foi realizada por sonicação e o lisado bacteriano centrifugado por 15 minutos à 18.000 rpm. A fração sobrenadante contendo a proteína recombinante foi filtrada em membrana hidrofílica de 0.45 μ m e a purificação foi realizada por dois passos cromatográficos: i) cromatografia de afinidade ao Ni²⁺, em tampão 20 mM de imidazol, 20 mM de fosfato de sódio (pH 7.5), 100 mM de NaCl, e eluída no mesmo tampão contendo 500 mM de imidazol, ii) após a fase de polimento foi realizada por cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 pg (GE Healthcare Life Sciences). A proteína foi eluída em tampão Tris-HCl (pH=7.5), 100 mM

de NaCl e 2 mM de β -mercaptoetanol. Todas etapas de produção e purificação da rEno foram acompanhadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) descrito no item 4.7.

4.6. Determinação da concentração de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método do ácido bicinonínico (BCA), segundo as orientações do fabricante (ThermoScientific), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão de proteínas. Esse método baseia-se na redução do cobre II pelas proteínas, em meio alcalino, produzindo o cobre I e formando um complexo com o BCA o qual apresentam a máxima absorbância a 562 nm.

4.7. Caracterização das proteínas por SDS-PAGE

As PSC de cada fungo em estudo obtidas conforme o item 4.4, assim como a enolase recombinante foram caracterizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida segundo a técnica descrita por Laemmli (1970). A preparação do gel separador e de empilhamento foi realizada conforme os volumes dos reagentes descritos na tabela a seguir:

Tabela 1 - Reagentes e volume para o preparo dos géis da eletroforese.

Componentes	Gel separador 10% (mL)	Gel de empilhamento 3% (mL)
Água	7.13	5.52
Acrilamida/bisacrilamida 30%	6.67	0.80
Tris-HCl + TEMED (pH 8.9) 1,5 M	5.00	-
Tris-HCl + TEMED (pH 6.9) 0,5 M	-	1.00
Deodecil sulfato de sódio (SDS) 10%	0.2	0.08
Persulfato de amônio 12%	1.00	0.60

As amostras de proteínas e o marcador de peso molecular (BioRad) com os pesos de 2 kDa a 250 kDa foram diluídas em tampão da amostra “Lane MarkerSample Buffers” da ThermoScientific, contendo 0,3 M Tris-HCl, 5 % SDS, 50 % glycerol, 100 mM de DTT

na proporção de 16 µL de “Lane Marker Sample Buffers”/ 64µL das amostras. Após aquecidas a 100° C por 5 minutos, e depositadas nos poços do gel da eletroforese, a corrida foi realizada à temperatura ambiente em cuba de eletroforese da Thermoscientific em placas mini-gel (10x8) aplicando-se 100 V (EPS 301, GE Healthcare) durante aproximadamente 2 horas até que as amostras atingissem 0,5 cm do final do gel. O tampão da cuba constituiu-se de Tris base 0,25 M, glicina 2 M e SDS 1%. Os géis foram corados com Coomassie blue ou prata conforme o procedimento descrito na tabela a seguir:

Tabela 2 - Coloração com nitrato de prata

Coloração com nitrato de prata Etapa	Solução	Tempo (minutos)
Fixação	50% Metanol/etanol e 5% de ácido acético em água	20
Lavagem	50% Metanol/etanol em água	10
Lavagem	Água bidestilada	5
Lavagem	Água bidestilada	20
Sensibilização	0,025% Na ₂ SO ₃ em água	1
Lavagem (2x)	Água bidestilada	1
Coloração	0,15% AgNO ₃ em água gelada	20
Lavagem (2x)	Água bidestilada	Rápido
Revelação	3% Na ₂ CO ₃ e 0,05 % de formaldeído em água	
Interrupção (3x)	5 % de ácido acético em água	
Estoque	1 % de ácido acético à 4°C	

4.8. Produção de soros policlonais em camundongos

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram submetidos à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP e realizado de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), protocolo CEUA/FCF/CAr nº 39/2015.

Foram utilizados camundongos Balb/c SPF (“specific pathogen free”), machos, pesando entre 20 e 25 gramas com 5 a 7 semanas (quando realizada a primeira inoculação) obtidos do Biotério Geral da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto (PUSP-RP).

Estes animais foram mantidos em mini-isoladores, em grupos de até cinco, em condições ambientais estáveis ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 56% de umidade relativa do ar) e ciclos claro/escuro de 12 horas. Água e ração oferecidas *ad libitum*. Em cada experimento independente foram usados animais pareados por idade em todos os grupos.

As PSC obtidas no item 4.4 e a enolase recombinante foram individualmente emulsificadas com Adjuvante Completo de Freund e inoculadas em camundongos Balb/c por via subcutânea, três vezes com intervalos de 14 dias, sendo a segunda e terceira inoculação feita com Adjuvante incompleto de Freund. Após 7 dias da última inoculação os animais foram eutanasiados e o sangue extraído por punção cardíaca. O mesmo esquema de imunização foi feito inoculando apenas a rEno diluída em PBS. O sangue total assim obtido foi condicionado em tubos de microcentrifuga estéreis de 1,5 mL e então incubado em estufa a 37°C por 20 minutos. Em seguida, o sangue foi centrifugado para coleta do soro e transferido para outro tubo estéril e armazenado a -20°C até o momento do uso. Esses soros foram denominados sAnti-PSC ou sAnti-rEno.

O soro de camundongo infectado (sCI) utilizado como controle positivo foi produzido com inoculação por via intraperitoneal de 1×10^6 leveduras/mL de cada fungo diluídas em PBS estéril. E o soro de camundongo não infectado (sCNI) utilizado como controle negativo foi obtido através da inoculação via intraperitoneal de apenas PBS estéril. Esses animais foram mantidos por 20 dias, eutanasiados e os mesmos procedimentos, descritos acima, foram realizados para a obtenção dos soros.

4.9. Immunoblotting e titulação do sAnti-rEno

A rEno foi dissolvida em tampão de amostra *Lane Marker Sample Buffers* (ThermoScientific) e submetidas à SDS-PAGE conforme o item 4.7. Após a eletroforese, as PSC e a rEno foram transferidas para membranas de nitrocelulose de $0,45\ \mu\text{m}$ (GE Healthcare), recobertos com papel de filtro e comprimidos com esponjas de poliuretano. Todos os materiais foram previamente embebidos em tampão de transferência bicarbonato de sódio e metanol pH 9,9 e em seguida encaixados em placas acrílicas perfuradas e mergulhadas na câmara de transferência contendo o mesmo tampão. A transferência foi feita durante 5h com amperagem constante de 0,4 mA a 4°C em câmara de transferência para mini-gel 10x8 cm (ThermoScientific).

As membranas de nitrocelulose contendo os antígenos foram cortadas em tiras e incubadas com solução bloqueadora (BSA 5% em TBS-T, que contém 50 mM de *Tris*

Base, 150 mM de NaCl e 0,1% de Tween 20) por 4 horas. O sAnti-rEno foi colocado sobre as tiras de membranas contendo as PSC ou rEno. Uma diluição seriada do sAnti-rEno foi realizada em TBS-T (1:400; 1:800; 1:1600; 1:3200; 1:6400; 1:12800; 1:25600; 1:51200), e colocadas sobre as tiras com rEno e deixado sob agitação *overnight* à temperatura ambiente (T.A.). Como controle negativo foi utilizado soro de animais não infectados diluído 1:50. Todos diluídos em TBS-T. Em seguida, as tiras foram lavadas três vezes com TBS-T para a retirada do excesso do soro. Então, incubadas por 2 horas com um conjugado imunoenzimático anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (Sigma) na diluição de 1:500. O excesso de conjugado foi retirado com novo ciclo de lavagens. As tiras foram reveladas através de reação com o substrato cromógeno diaminobenzidina (Sigma, 5mg diluídos em 30 mL de TBS-T acrescido de 150 µL de peróxido de hidrogênio no momento do uso). E a reação interrompida com água destilada.

4.10. Purificação da enolase contida nas PSC por eletroeluição

Foram realizadas várias eletroforeses conforme o item 4.7 com o extrato de PSC de Ss16345, Ss250 e Ss256. Um gel foi transferido para membrana de nitrocelulose conforme o item 4.9 e o sAnti-rEno utilizado para localizar esta proteína. Os outros géis foram corados com Coomassie blue, e então utilizados para purificar a enolase por eletroeluição conforme Neophytou e colaboradores (1996). Resumidamente, a banda da enolase localizada nos géis, foi cortada e então eletroeluída em tampão glicina (192 mM Glicina; 25 mM Tris base, 0,1% SDS) com membrana de diálise a 10 mA, por 4 horas a 4° C. A purificação foi monitorada e verificada por SDS-PAGE.

4.11. Eletroforese bidimensional

A banda correspondente a enolase foi eletroeluída e submetida à focalização isoelétrica, utilizando um gradiente de pH de 3-10. A segunda dimensão foi realizada em gel de poliacrilamida 10% e o gel foi corado com Coomassie ou prata conforme o procedimento descrito no item 4.7.

4.12. Espectrometria de massas das PSC de *S. brasiliensis*

4.12.1. Digestão de *In-gel* de proteínas

Tanto a digestão das amostras quanto a preparação para as análises foram feitas segundo o protocolo descrito pelo Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas, Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” ESALQ, USP, Piracicaba, São Paulo.

As bandas selecionadas de Ss250 e Ss256 foram cortadas, segmentos de aproximadamente 1 mm³, com auxílio de um bisturi e acondicionados em tubos de microcentrífuga. Em seguida, foi adicionada solução de descoloração (50% v/v Acetonitrila (ACN) e 25 mM Bicarbonato de Amônio) até total retirada do corante.

Após desidratação com 100% de ACN, foi realizada redução e alquilação das bandas: os fragmentos de gel foram reidratados com 20 mM de DTT em 50 mM de bicarbonato de amônio e incubados por 40 minutos a 55°C. O líquido excedente foi removido e substituído por 55 mM de IAA em 50 mM de bicarbonato de amônio. Os fragmentos de gel foram mantidos no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente, o líquido excedente foi novamente removido e os fragmentos lavados com 25 mM de bicarbonato de amônio. Após serem novamente desidratados com 100% de ACN, os fragmentos foram reidratados com solução de 20 ng.µL⁻¹ de tripsina (Promega V5111) em 50 mM de bicarbonato de amônio. Após a reidratação total, os fragmentos de gel foram parcialmente cobertos com 25 mM de bicarbonato de amônio e a digestão, realizada a 37°C por 16 horas.

A ação da tripsina foi bloqueada pela adição de solução bloqueadora (50% ACN, 5% ácido fórmico, Água Milli-Q 45%) e os peptídeos eluídos dos fragmentos por lavagens sucessivas com solução de eluição I (60% metanol, 1% ácido fórmico, 39% Água Milli-Q), solução de eluição II (50% ACN, 1% ácido fórmico, 49% Água Milli-Q), seguidas da lavagem final com 100% de ACN. Em cada uma das etapas de eluição, os fragmentos de gel foram sonicados por 20 minutos a 45°C (sonicador Ultra Som, Thronton-IPEC Eletrônica Ltda) e o sobrenadante transferido. Os sobrenadantes de cada banda foram transferidos para tubo de microcentrífuga e o volume foi reduzido em concentrador a vácuo (Eppendorf modelo 5301), à temperatura ambiente.

4.12.2. Purificação das amostras

Às amostras secas a vácuo foram adicionados 10µL de solução 0,1% TFA em H₂O. Após esse passo cada uma foi purificada utilizando micro colunas de fase reversa (*Reverse phase Zip-Tip C18, Millipore*). Para isso, as colunas foram equilibradas em solução A [100%

acetonitrila (ACN), 0,1% (v/v) TFA], solução B [50% (v/v) ACN:H₂O, 0,1% (v/v) TFA] e solução C [100 % H₂O, 0,1% (v/v) TFA], respectivamente. Após o equilíbrio, as amostras proteicas puderam ser ligadas à coluna, seguindo-se lavagem com solução D [95% H₂O, 5% (v/v) metanol, 0,1% (v/v) TFA]. Para a eluição dos peptídeos, 10µL de solução B foram aspirados e acondicionados em tubos de vidro borosilicato (Waters Total Recovery vials). Seguiu-se nova concentração a vácuo.

4.12.3. LC-MS^E

As amostras foram ressuspensas em 20 µL de Formiato de amônio 20 mM pH10. Os peptídeos foram sequenciados no espectrômetro de massas *Synapt G2 HDMS* (Waters), acoplado ao sistema *Acquity UPLC MClass*, com tecnologia 1D Simulado (Waters). Os peptídeos foram capturados por uma coluna *Trap 2D Symmetry C18* (5 µm, 180 µm x 20 mm) (Waters). A separação foi realizada com uma coluna de primeira dimensão *Acquity UPLC M-Class peptide BEH C18* (5 µm, 300 µm x 50 mm) (Waters) e uma coluna analítica *Acquity UPLC M-Class peptide CSH C18* (1.7 µm, 75 µm x 150 mm) (Waters). As fases móveis da primeira dimensão são: solução de formiato de amônio 20 mM pH 10 e acetonitrila. Já na segunda dimensão os dois eluentes foram: A (100% água contendo 0,1% de ácido fórmico) e B (100% acetonitrila contendo 0,1% ácido fórmico). O gradiente da primeira dimensão se inicia com 97% de formiato de amônio e 3% de acetonitrila. Em 4,6 minutos é atingido 55% de formiato de amônio e 45% de acetonitrila e até completar 10 minutos a condição inicial é restabelecido. O fluxo foi de 2 uL/min. O gradiente da fase móvel analítico se inicia com 93% A e 7% B e por 92 minutos o gradiente muda linearmente para 60% A e 40% B e depois de 2 minutos é atingido 15% A e 85% B. Em dois minutos a coluna restabeleceu a condição inicial. O fluxo foi de 0,300 µL/min. Foi injetado 9 µl da amostra.

A aquisição dos dados foi realizada em um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF) *Synapt G2 MS*, equipado com uma fonte nanolockspray operando no modo positivo (Waters, Manchester, UK), com *ion mobility*. Para todas as análises, o espectrômetro de massas operou no modo “V”, com poder de resolução típico mínimo de 12500, com a cela de *ion mobility* ativada. O espectrômetro de massas foi calibrado com [Glu1] fibrinopeptídeo B (GFP) humana 1 pmol.µL⁻¹ e a mesma solução foi empregada para o "lock mass" utilizando-se o íon de dupla carga com uma amostragem a cada 30 segundos. Os experimentos foram realizados no modo HDMS^E (análise independente de dados) que consiste na aquisição alternada, entre espectros obtidos à baixa (3 eV) e alta (15-

50 eV) energia de colisão, aplicadas ao módulo *trap* do ‘*T-wave*’ CID, em presença de gás argônio, que produz íons precursoros e produtos em sequência. O tempo de varredura foi de 0,8 segundos em cada modo, no intervalo de *m/z* entre 50 e 2000.

4.12.4. Análise dos dados da espectrometria de massas

Os espectros de massas foram processados utilizando o *software ProteinLynx GlobalServer* (PLGS) versão 3.1, com o banco de dados reverso de *Sporothrix UNIPROT* (data do download: junho de 2017; 38078 proteínas). Os parâmetros de processamento incluíram: tolerância automática para precursoros e íons-produto; mínimo de três íons-fragmento correspondentes por peptídeo; mínimo de 7 íons-fragmento correspondentes por proteína; mínimo de 2 peptídeos correspondentes por proteína; um possível erro de clivagem pela tripsina; carbamidometilação de cisteína como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável; taxa máxima de descoberta de falso positivo (FDR) a 4%.

4.13. Ensaio de inibição da adesão

O ensaio de inibição da adesão de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* à linhagem de fibroblastos L929 foi realizado conforme Mendes-Giannini e colaboradores (2004), com algumas adaptações. A linhagem de fibroblastos murinos L929 expandida em meio DMEM (Gibco, Grand Island) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), penicilina (1 µg/mL), estreptomicina (1 µg/mL) e garamicina (1 µg/ml) a 37° C e 5% de CO₂ com passagem a cada três dias. As células foram removidas por tripsinização e centrifugadas a 300 x *g* durante 10 minutos a 4° C. A suspensão celular foi contada em câmara de Neubauer pela técnica de exclusão com azul de trypan e ajustada à concentração 2,5 x 10⁵ células/mL em meio DMEM. Alíquotas dessa suspensão foram transferidas para placas de 6 poços contendo uma lamínula quadrada estéril e então incubadas overnight em estufa a 37° C e 5% de CO₂. Em seguida, o meio foi descartado e cada poço lavados duas vezes com PBS estéril antes da realização do ensaio de inibição.

As leveduras de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* obtidas conforme os itens 4.2 e 4.3 foram lavadas duas vezes com PBS a 1000 x *g* por 5 minutos a 4° C, contadas em câmara de Neubauer e ajustadas à concentração de 2,5 x 10⁸ leveduras/mL. Alíquotas de 0,1 mL dessa suspensão foram incubadas durante 1 hora a 37° C com um pool de sAnti-PSC, sAnti-rEno, sCI ou sCNI com *S. schenckii* e *S. brasiliensis* como controles. Leveduras incubadas somente com PBS (não opsonizadas) também foram usadas como controle. Todos os soros foram

diluídos 1:50 em PBS. Após duas lavagens, as leveduras foram ressuspensas em PBS, transferidas para as placas de 6 poços contendo os fibroblastos e então incubadas por mais 3 horas a 37° C. Após esse tempo, os poços foram lavados com PBS e as lamínulas retiradas e coradas com a técnica de coloração de Gram para quantificação da adesão por microscopia óptica em aumento de 1000X. O índice de inibição foi calculado pela porcentagem de fibroblastos com pelo menos 1 levedura aderida multiplicado pela média da quantidade de leveduras unidas a esses fibroblastos (de LIMA FRANCO *et al.*, 2012).

4.14. Obtenção de macrófagos para o ensaio de fagocitose

Para realizar o ensaio de fagocitose foram utilizados macrófagos peritoneais obtidos do exsudato peritoneal de camundongos Balb/c, sadios. Previamente os animais foram inoculados com 3 mL de tioglicolato de sódio (DIFCO Lab. LTDA) a 3%, três dias antes de serem eutanasiados em câmara de CO₂. A pele da região abdominal foi retirada assepticamente em câmara de fluxo laminar classe 100 (Veco) e o peritônio exposto. Foram inoculados 5 mL de PBS pH 7,4 estéril gelado na cavidade abdominal, aplicando-se leve massagem para estimular a liberação das células. O líquido resultante foi colhido com auxílio de agulha e seringa, transferido para tubo cônico estéril de 15 mL e centrifugado a 400 x *g* por 5 minutos. O sedimento celular foi lavado 3 vezes com 3 mL de PBS, sendo ressuspendido após a última lavagem em 1 mL de meio de cultura RPMI-1640 completo (RPMI-1640-C, assim definido o meio RPMI-1640 básico contendo 20 µM de 2β-mercaptoetanol, 100 U/ml de penicilina e estreptomicina, 2 mM de L-glutamina e 5% de soro fetal bovino), para a contagem de células em câmara de Neubauer pela técnica de coloração com Líquido de Lázarus. As suspensões celulares foram então ajustadas para a concentração de 4x10⁵ células/mL para a realização dos testes propostos.

4.15. Ensaio de fagocitose

O ensaio de fagocitose foi realizado como descrito por de Lima Franco e colaboradores (2012), com modificações. Em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares foi colocado 1 mL de uma suspensão de macrófagos obtidos conforme o item 4.15 então incubadas por 4 horas em estufa a 37° C e 5% de CO₂. As leveduras de Ss16345, Ss250 e ss256 obtidas como em 4.2 e 4.3 respectivamente foram ajustadas à concentração de 4x10⁶ leveduras/mL e opsonizadas durante 1 hora a 37° C sob agitação leve com o sAnti-rEno, sAnti-PSC, sCI ou sCNI. Todos esses soros foram inativados a 56° C por 30 minutos e

diluídos 1:100 em PBS. Leveduras incubadas somente com PBS (não opsonizadas) foram usadas como controle. Em seguida, a suspensão de leveduras foi lavada e ressuspensa em 1 mL de RPMI-1640 acrescido de MOPS (RPMI-MOPS). Alíquotas dessa suspensão foram transferidas para placas de 24 poços contendo lamínula circular e os macrófagos previamente aderidos e então incubadas por 4 horas em estufa a 37° C e 5% de CO₂. Transcorrido esse tempo, os poços foram lavados exaustivamente com RPMI-MOPS para eliminar as leveduras não ligadas, as lamínulas foram retiradas dos poços e fixadas a uma lâmina para microscopia. As células foram fixadas com metanol absoluto durante 5 minutos e coradas com Giemsa durante 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico com aumento de 1000X. O índice fagocítico foi calculado pela porcentagem de macrófagos com leveduras fagocitadas multiplicado pela média da quantidade de leveduras fagocitadas.

4.16. Determinação da capacidade de adesão da enolase a componentes da matriz extracelular

Para determinar a capacidade de adesão da enolase a componentes da matriz extracelular foi utilizado placa de 96 poços que foi adsorvida com a matriz extracelular: plasminogênio ou fibrinectina na concentração de 10 µg/mL em tampão carbonato pH 9,6 e incubadas 18 horas à 4° C. Em seguida, a placa foi mantida a T.A. por 1 hora, lavada 3 vezes com PBS-T (PBS-Tween 20; 0,05%) e bloqueada com Soro Albumina Bovino 1% (BSA) à 37° C por 2 horas. Após a incubação, a placa foi lavada três vezes com PBS-T e em seguida adicionado 100 µL por poço da proteína, rEno, em diferentes concentrações (10, 25, 50 µg/mL) e incubada à 37° C por 15 horas. Como controles foram utilizados poços: 1) sem a matriz extracelular; 2) sem rEno; 3) sem rEno e sem o anticorpo Anti-rEno; 4) somente matriz extracelular. A placa foi lavada novamente com PBS-T, em seguida, adicionado sAnti-rEno no título 1:100 em PSB-T e BSA 0,5%, incubada por mais 1 hora à 37° C e posteriormente lavadas mais três vezes com PBS-T. Após lavagens foi adicionado o anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo) no título de 1:2000 em PBS-T e BSA 0,5% e incubada à 37° C por 1 hora. A placa foi lavada com PBS-T novamente e com a solução reveladora de fosfato de sódio/ ácido cítrico/ ortofenilenodiamino/ água oxigenada incubada à T.A. por 10 minutos no escuro. A reação foi interrompida com HCl 3N e a leitura realizada em espectrofotômetro UV/visível para microplacas em absorvância de 490 nm (MultiskanAscent, Labsystems). Os resultados foram expressos em pg/mL.

4.17. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo programa GraphPad Prism versão 6.01, aplicando-se análise de variância (ANOVA) de 1 ou 2 vias, com teste para comparações múltiplas de Tukey ou Sidak, respectivamente, conforme indicado em cada caso. O intervalo de confiança foi definido em 95%.

5. Resultados

5.1. Padronização das curvas de crescimento dos isolados de gatos Ss250 e Ss256

Nesse estudo, antes de caracterizar o perfil de proteínas presentes na parede celular das leveduras de Ss250 e Ss256, primeiramente foram determinadas suas curvas de crescimento em meio BHI durante um total de 14 dias, através da contagem de unidades, leveduras e UFC durante 14 dias.

Como pode ser observado nas Figuras 2 e 3 o isolado Ss256 mostrou um padrão de crescimento mais acelerado durante a fase logarítmica em relação ao Ss250 evidenciado pelo aumento na média das leveduras e unidades fúngicas formadas num período menor, no entanto ambos isolados mostraram pouca diferença durante a fase estacionária. A padronização de ambas as curvas de crescimento serviram como ponto de partida para a otimização do tempo de obtenção das PSC dos fungos afim de, escolher um preparado antigênico preferencialmente na fase logarítmica de crescimento de ambos os fungos.

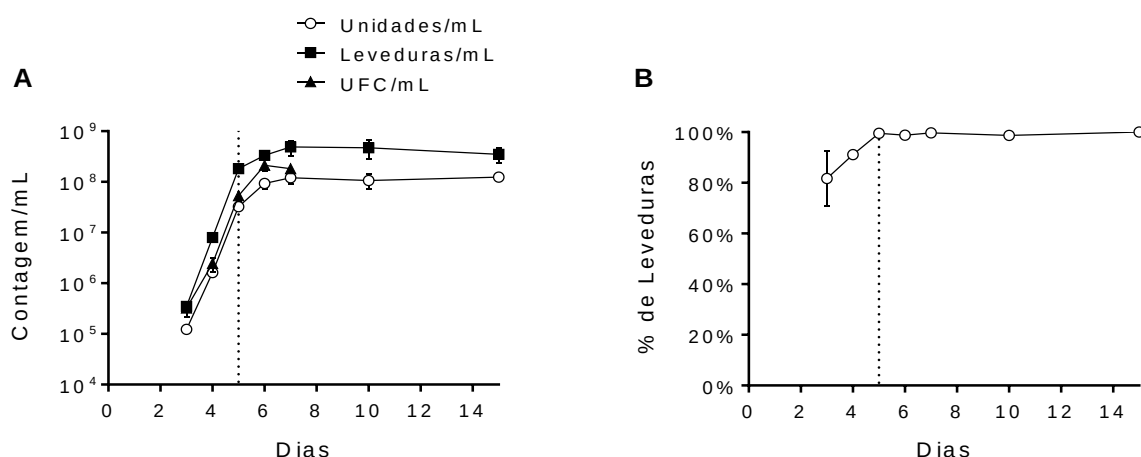


Figura 2. Padronização da curva de crescimento do isolado Ss250. Decorridos 5 a 6 dias de cultivo em meio líquido BHI, uma alíquota contendo 2×10^5 leveduras foi transferida para novo frasco contendo 100 mL do mesmo meio. Nos dias indicados, as culturas foram avaliadas quanto ao (A) número de unidades fúngicas, leveduras e UFC/mL, e (B) ao percentual de conversão hifa-leveduras. A medida de UFC/mL só é apresentada até o dia 7, uma vez que a viabilidade caiu abaixo de 1%, não permitindo a recuperação de UFC da cultura. Os resultados são apresentados como média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes

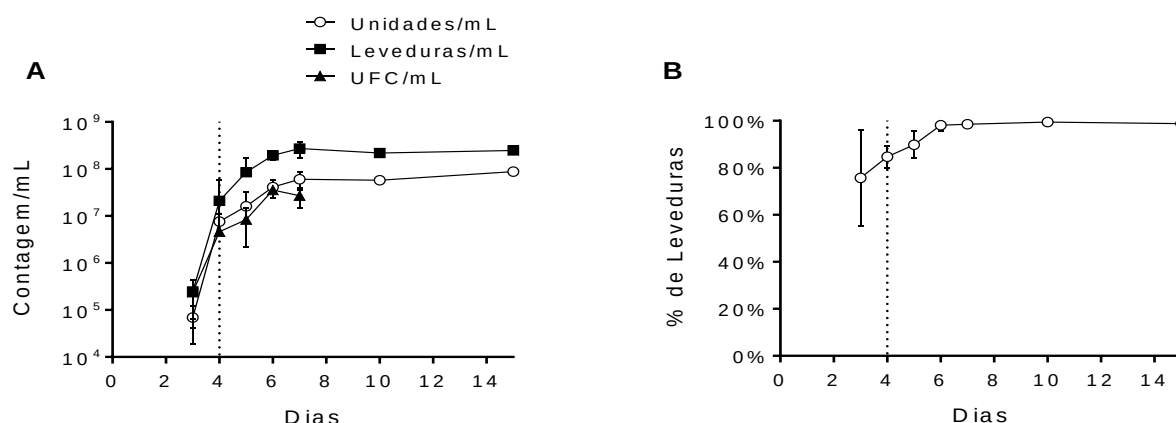


Figura 3. Padronização da curva de crescimento do isolado Ss256. Decorridos 5 a 6 dias de cultivo em meio líquido BHI, uma alíquota contendo 2×10^5 leveduras foi transferida para novo frasco contendo 100mL de meio líquido BHI. Nos dias indicados, as culturas foram avaliadas quanto ao (A) número de unidades fúngicas, leveduras e UFC/mL, e (B) ao percentual de conversão hifa-leveduras. A medida de UFC/mL só é apresentada até o dia 7, uma vez que a viabilidade caiu abaixo de 1%, não permitindo a recuperação de UFC da cultura. Os resultados são apresentados como média $\pm$ DP de 4 experimentos independentes.

5.2. Dosagem de proteínas

A Tabela 3 mostra a massa celular por litro de cultura dos fungos em estudo, assim como o teor proteico extraído dos mesmos após duas e três horas de exposição das leveduras com o reagente DTT. Os dados demonstram que conforme aumenta o tempo de exposição das leveduras ao tampão de extração, a liberação das PSC é maior, o que sugere uma ação mais eficaz do reagente DTT. Cabe ressaltar que a viabilidade celular das leveduras antes e após de cada extração realizada foi verificada pelo Kit live/dead, o que sugere que as proteínas obtidas poderiam ser preferencialmente da superfície celular e não do meio intracelular como produto da lise celular.

Tabela 3 - Dosagem de PSC de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* (Ss250 e Ss256) na fase de crescimento logarítmico

Fungos	Massa celular (g/L de cultura)	Extração das PSC (mg/massa celular)	
		2 horas	3 horas
<i>S. brasiliensis</i> Ss250	17, 9	1, 147	4,860
<i>S. brasiliensis</i> Ss256	15, 35	0, 635	4, 578
<i>S. schenckii</i> ATCC 16345	15, 25	0, 926	3, 002

*Os dados representam os valores médios de três extrações realizadas de cada fungo

5.3. Caracterização das PSC por SDS-PAGE

Na Figura 4 observam-se os perfis de proteínas expressas na parede celular da cepa Ss16345 e dos dois isolados Ss250 e Ss256 quando caracterizados por SDS-PAGE. A semelhança do perfil protéico apresentado nas PSC de cada fungo, poderia ser devido ao alto grau de relação que existe entre as diferentes espécies do complexo *Sporothrix schenckii* (Fernandes *et al.*, 2013). Além disso, duas bandas de proteínas com peso molecular entre 25 kDa e 37 kDa e uma próxima a 50 kDa aparecem altamente expressas pelo destaque e a alta resolução nestes fungos. Tendo em conta que o sAnti-rEno reagiu contra a banda de proteína altamente expressa próxima a 50 kDa no gel de eletroforese das PSC de Ss250 e Ss256 (resultado da Figura 6) sugere-se que a enolase de 47 kDa, pode estar altamente conservada dentro do gênero *Sporothrix*.

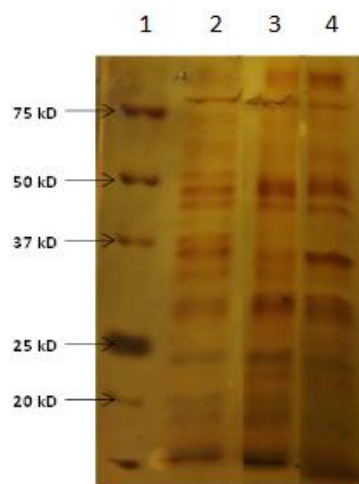


Figura 4. Perfil eletroforético das PSC de *Sporothrix spp.* As PSC foram extraídas com DTT, submetidas à eletroforese vertical em SDS-PAGE 10% e após coradas por prata. Linha 1: Marcador de peso molecular. Linha 2: PSC de Ss16345. Linhas 3: PSC de *S. brasiliensis* Ss250. Linhas 4: PSC de *S. brasiliensis* Ss256.

5.4. Obtenção da enolase recombinante (rEno)

A Figura 5 mostra a purificação da rEno e a qualidade da produção desta proteína após os procedimentos de purificação por cromatografia de afinidade e de exclusão molecular (linhas 4 e 5, respectivamente), sugerindo que a rEno foi expressa e obtida com alto grau de pureza.

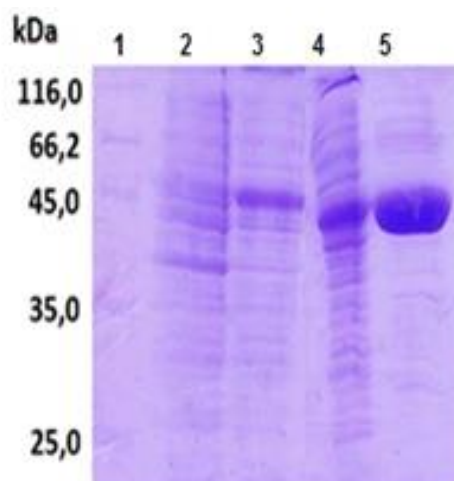


Figura 5. Gel de SDS-PAGE 10% para a expressão, indução e purificação da rEno. Para a expressão da rEno as células de *E.coli* BL21 foram induzidas na presença de IPTG e lisadas por sonicação, o sobrenadante com a proteína recombinante foi filtrado em membrana hidrofílica e purificado por cromatografia de afinidade e de exclusão molecular. Linha 1: Marcador de peso molecular; Linhas 2: Fração não induzida da rEno; Linha 3: Fração induzida da rEno; Linha 4: Purificação por afinidade ao níquel e Linha 5: Purificação por exclusão por tamanho da rEno.

5.5. Especificidade do sAnti-rEno e imunoreatividade com a enolase contida nas PSC de Ss250 e Ss256

A Figura 6A mostra a especificidade do soro policlonal (sAnti-rEno) obtido em camundongos contra a rEno por *immunoblotting*. Nas linhas 2 e 3 da Figura 6B pode-se observar que o sAnti-rEno também reagiu com a proteína altamente expressa próximo a 50 kDa presente nas PSC isoladas de Ss250 e Ss256, confirmando a presença da enolase na parede celular de *S. brasiliensis*.

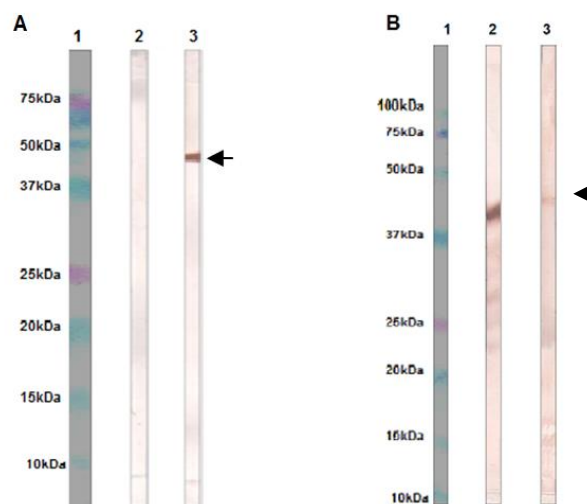


Figura 6. Especificidade do soro sAnti-rEno contra rEno e imunoreatividade com as PSC de Ss250 e Ss256. A rEno e as PSC obtidas de Ss250 e Ss256 foram submetidas à eletroforese vertical em SDS-PAGE 10% e após transferidas para membrana de nitrocelulose. As membranas contendo os antígenos foram cortadas em tiras, bloqueadas com BSA 5% em TBS-T e em seguida incubadas com sAnti-rEno ou soro de camundongos não infectados (sCNI) como controle de inespecificidade. Foi adicionado o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase e a formação dos complexos antígenos-anticorpos foi revelada com o cromógeno diaminobenzidina. (A) Linhas 1: Marcador de peso molecular; Linha 2: Membrana com rEno e sCNI (controle negativo); Linha 3: Membrana com rEno e sAnti-rEno; (B) Linha 1: Marcador de peso molecular; Linha 2: Membrana com PSC de Ss250 e sAnti-rEno; Linha 3: Membrana com PSC de Ss256 e sAnti-rEno. A seta indica a rEno (aproximadamente 47 kDa).

5.6. SDS-PAGE das PSC e localização da Eno de Ss16345 por *immunoblotting*

Com o intuito de localizar e purificar a enolase contida nas PSC isoladas diretamente das leveduras de Ss16345 foi realizado um novo gel de eletroforese e transferido para uma membrana de nitrocelulose para o *immunoblotting*. Na Figura 7A observa-se o gel de eletroforese vertical contendo as PSC extraídas do fungo *S. schenckii* na fase de levedura onde é possível observar 15 bandas de proteínas e entre elas foi localizada a enolase de 47 kDa descrita previamente por Portuondo e colaboradores (2016) a qual reagiu com sAnti-rEno (Figura 7B).

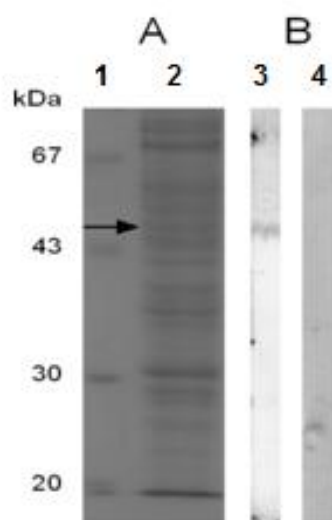


Figura 7. Perfil eletroforético das PSC de *S. schenckii*16345 e imunoblotting com o pool de sAnti-rEno. As PSC de Ss16345 obtidas na fase logarítmica de crescimento do fungo com tampão de extração contendo DTT foram separadas por eletroforese vertical em SDS-PAGE 10% (A) ou transferida para membrana de nitrocelulose (B). O gel de SDS-PAGE foi corado por Coomassie e a membrana de nitrocelulose foi bloqueada com BSA 5% em TBS-T, cortada em tiras e em seguida incubadas com sAnti-rEno ou sCNI como controle de inespecificidade. Foi adicionado o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase e a formação dos complexos antígenos-anticorpos foi revelada com o cromógeno diaminobenzidina. Linha 1: Marcador de peso molecular; Linha 2: PSC de Ss16345; Linha 3 e 4: Membranas de nitrocelulose contendo as PSC incubadas com sAnti-rEno ou com sCNI respectivamente.

5.7. Espectrometria de massas das PSC de *S. brasiliensis*

Utilizando a metodologia de extração com DTT esperamos que apenas proteínas da superfície celular estarão presente no extrato, porém o sequenciamento realizado da banda de proteínas excisada do gel de eletroforese das PSC de Ss250 e Ss256 revelou a presença de aproximadamente 118 e 73 proteínas, respectivamente, e supõe-se que muitas provavelmente são provenientes do meio intracelular. Analisando essas proteínas, observou-se que a maioria (57 proteínas) está presente em ambos os isolados de Ss250 e Ss256, como mostra a Tabela 4. Esta informação somada a resultados anteriores do presente estudo demonstram que os isolados de *S. brasiliensis* possuem características semelhantes. Vale ressaltar que entre as proteínas detectadas neste sequenciamento, foi identificada a presença da enolase sugerindo que está altamente conservada no gênero *Sporothrix*.

Tabela 4 - Análise das proteínas dos isolados Ss250 e Ss256 sequenciadas através de espectrometria de massas

	# de acesso UNIPROT	Proteína	Ss250		Ss256	
			Cov ^a (%)	score ^b	Cov (%)	score
1	U7Q486	Fosfoglicerato mutase 2,3-bisfosfoglicerato-independente	39.46	1078.807	8.24	317.3247
2	U7PV62	2-metilcitrato desidratase	22	772.3795	22.72	593.6436
3	U3PUQ3	3-carboximuconato ciclase	32.45	14540.67	33.17	17931.97
4	U7Q5P7	4-aminobutirato aminotransferase	33.05	1727.642	25.94	614.4686
5	U7PNG2	4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase	34.59	2108.512	24.53	832.9371
6	U7PWD4	5- metiltetrahidropteroiltriglutamato-homocisteína S-metiltransferase	9.91	438.9226	25.81	1106.714
7	U7PJ30	6-fosfogliconato desidrogenase descarboxilante	44.55	3176.85	20.86	751.1141
8	U7Q208	Adenosilhomocisteinase	37.64	9278.303	43.43	1407.49
9	A0A167TYE5	Alanina aminotransferase	18	785.6281	7.38	1028.415
10	A0A0C2EPN2	Alanina transaminase	42.89	3816.584	44.33	3771.413
11	A0A0C2IXA2	Álcool desidrogenase	28.16	948.8301	16.38	228.48
12	U7PJQ4	Aldeído desidrogenase	42.19	9257.135	39.76	3043.126
13	U7PT92	Alfa-trealose-fosfato sintase (formadora de UDP)	22.28	2645.206	20.29	937.3209
14	U7PT23	alfa-1,2-manosidase	18.49	950.6924	27.55	1058.634
15	A0A0C2IWK2	Proteína da família da aminotransferase	31.5	1534.785	20.72	471.7213
16	A0A0C2FFX8	Argininosuccinato liase	59.57	11793.84	25.59	528.7809
17	A0A0C2IY11	Subunidade alfa da ATP sintase	19.31	708.3693	22.95	1664.999
18	C3RYJ3	Beta tubulina (Fragmento)	30.34	5853.772	30.34	6957.935
19	A0A0C2IR07	Beta-glicosidase	23.2	7653.734	26.58	2341.273
20	U3PRP6	Carboxi-cis,cis-muconato ciclase	87.38	20692.91	88.11	27736.66
21	A0A0A7M635	Catalase-peroxidase (Fragmento)	52.37	30779.93	52.37	19207.12
22	A0A0C2EZJ2	Catalase-peroxidase	65.72	31922.32	62.35	20930.19
23	A0A0C2F7K1	Chaperonina GroEL	14.77	424.9418	20.2	569.6321
24	A0A167TU33	Metionina sintase d cobalamina-	17.08	456.1696	15.25	1011.152

		independente				
25	A0A0C2IQ07	Cis-Gli metalodipeptidase DUG1	59.87	4636.569	48.95	1947.611
26	A0A0C2IQC6	Dihidrolipoil desidrogenase	21.33	825.8157	35.03	1225.735
27	U7PYQ7	Proteína ligadora de DNA de 42 kDa	22.41	509.2023	27.36	511.4831
28	A0A0A0RPZ9	Fator de alongamento 1a (Fragmento)	56.9	4406.858	13.79	1649.089
29	U7PTA4	Fator de alongamento-alfa	31.09	9480.878	17.39	2396.572
30	U7PSS1	Enolase	73.06	36689.96	62.56	5901.337
31	A0A0F2MD27	Glicosidase da família 31	4.81	102.6964	4.81	184.0166
32	U7PM62	Desidrogenase formato	16.91	267.6915	22.92	430.4417
33	A0A0C2IMF4	Glicanase b	41.3	10429.09	57.79	10626.65
34	A0A162KC37	Glutamato carboxipeptidase	25.63	1628.05	9.45	367.6915
35	A0A0C2IVC4	Glutationa redutase (NADPH)	32.06	362.7298	25.48	544.1406
36	U7PH76	Glutationa-dissulfeto redutase	29.05	363.9091	12.5	200.1112
37	F2YQ15	Proteína de choque térmico 90	40.17	8695.338	26.45	2281.755
38	U7PHP5	Proteína semelhante à Hsp60	14.77	424.9418	20.2	569.6321
39	U7Q4G4	Proteína semelhante à Hsp90	40.17	8695.338	26.45	2287.449
40	U7Q745	Isocitrata desidrogenase [NADP]	47.17	3891.554	16.98	317.1733
41	A0A0F2LYD3	Isopenicilina N epimerase	14.16	478.4891	10.15	316.4585
42	A0A0C2IAS4	Metalopeptidase MepB	9.44	241.5627	10.83	296.5713
43	A0A0C2J557	Metionil aminopeptidase	22.25	509.2023	27.17	509.7395
44	A0A0C2IPL7	Chaperona molecular HtpG	40.17	8695.338	26.45	2281.755
45	U7Q011	O-acetilhomoserina (Tiol)-liase	43.18	2293.294	26.36	347.38
46	A0A0C2IPV7	Fosfoglicerato quinase	55.37	12717.68	52.74	10891.66
47	A0A0C2IIN3	Fosfoglicerato mutase	30.27	1046.835	8.24	309.9139
48	A0A0C2F6S7	Proteína ativadora de Ran GTPase 1	28.94	2479.464	30.35	483.3116
49	U7PYG1	Sacaropina desidrogenase (formadora de L-glutamato NADP+)	29.24	1306.642	27.23	1147.943
50	U7Q4C1	Serina hidroximetiltransferase	4.38	263.864	23.17	399.314
51	U7Q3J0	Transcetolase	36.35	706.507	36.35	436.2386

52	A0A1L1WGH2	Fator de alongamento da tradução 1 alfa (Fragmento)	38.63	6155.413	20.6	1854.874
53	A0A162MQJ0	Trealose-6-fosfato sintase	29.94	1746.536	16.7	733.4283
54	U7Q8V0	Cadeia alfa da tubulina	31.21	1329.323	27.03	724.2827
55	C6ZPH5	Cadeia beta da tubulina (Fragmento)	42.26	21459.82	42.26	8259.769
56	A0A0F2MCW0	Cadeia beta da tubulina	41.67	25733.79	37.3	9597.15
57	A0A0F2LQK8	UDP-N-acetilglicosamina pirofosforilase	21.6	341.6003	31.48	724.8229

^aCobertura da sequência com base no número total de aminoácidos

^b Probabilidade de identificação da correspondência de fragmentos

5.8. Eletroforese bidimensional da enolase da cepa *S. schenckii* ATCC 16345 e dos isolados Ss250 e Ss256

A análise da eletroforese bidimensional mostrou que a proteína enolase extraída do SDS-PAGE das PSC e purificada por eletroeluição da cepa Ss16345 (A), apareceu como três spots de pesos moleculares de 48.6 kDa, 48.6 kDa, 48.1 kDa e pontos isoelétricos (pI) respectivamente de 5.06, 5.66 e 6.72; do isolado de *S. brasiliensis* Ss250 (B) apresentou 5 spots de pesos moleculares de 57.9 kDa, 55.9 kDa, 55.2 kDa, 52.6 kDa, 52.6 kDa e pI 4.24, 4.40, 4.55, 4.68 e 4.86, respectivamente; e o do isolado de Ss256 (C) também apresentou 5 spots com pesos moleculares de 63.0 kDa, 59.2 kDa, 57.4 kDa, 54 kDa, 54 kDa e pI 4.34, 4.46, 4.59, 4.68, 4.81 respectivamente (Figura 8). É provável que esses spots sejam isoformas da mesma proteína, onde as diferenças de peso molecular e ponto isoelétrico podem ser os resultados de modificações pós-traducionais envolvendo processos de glicosilação ou substituição de aminoácidos hipótese ainda precisa ser confirmada através da imunorreatividade do sAnti-rEno entre os diferentes spots.

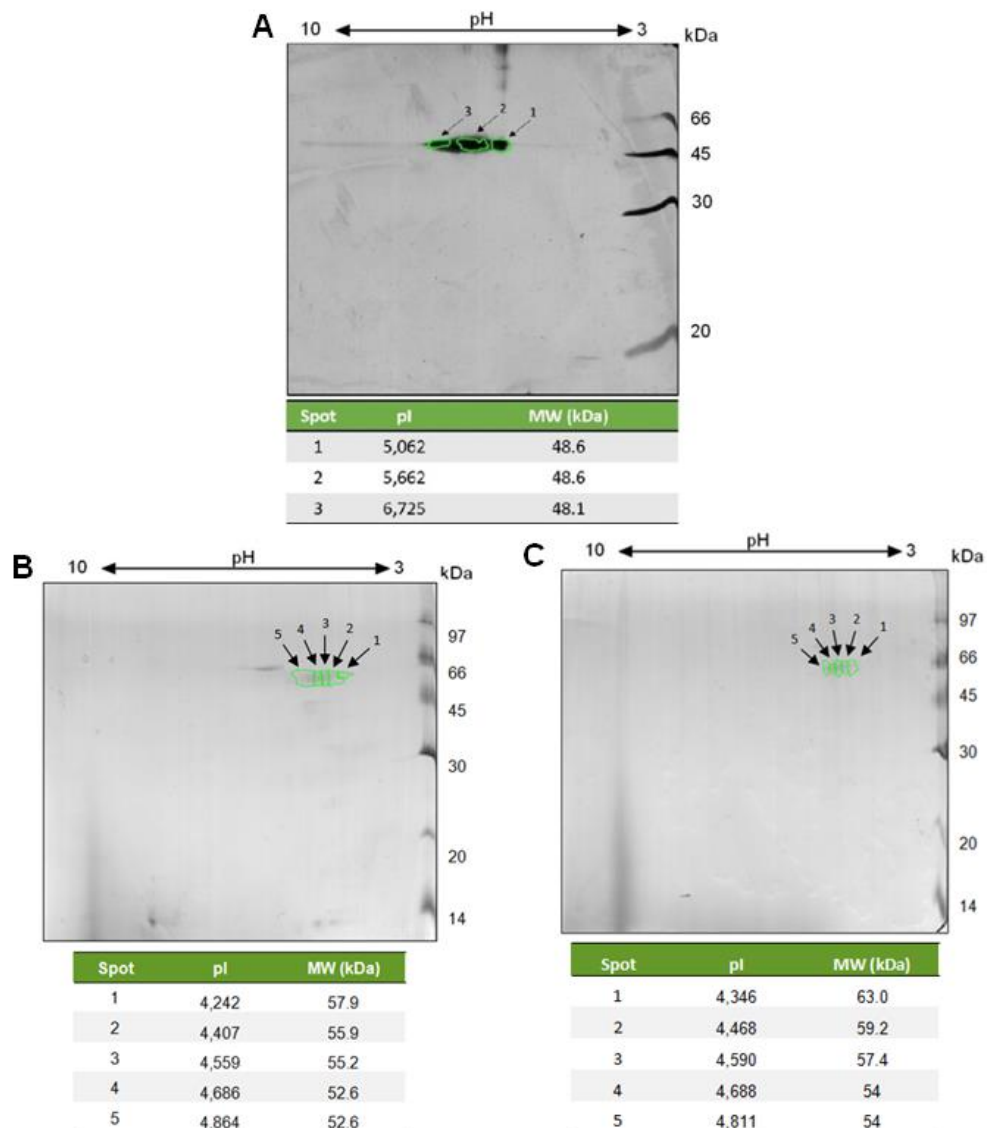


Figura 8. Eletroforese bidimensional da proteína enolase de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* na fase leveduriforme. A proteína enolase eletroeluída foi submetida a focalização isoeletrica com gradiente de pH de 3-10. (A) Enolase extraída das PSC de Ss16345; (B) Enolase extraída das PSC de Ss250; (C) Enolase extraída das PSC de Ss256. As colunas a direita das figuras corresponde ao padrão de peso molecular e os spots (1, 2, 3, 4 e 5) geis às isoformas da enolase. pI: ponto isoeletrico. MW: Peso molecular.

5.9. Titulação do sAnti-rEno por diluição seriada

A imunogenicidade da enolase foi determinada pelo título de anticorpos do sAnti-rEno através de *immunoblotting*. Como pode ser observado na Figura 10A o soro obtido em camundongos imunizados com apenas a rEno reconheceu esta proteína até a diluição 1:800 demonstrando as propriedades imunogênicas da enolase. Como esperado, os anticorpos contra esta proteína induzidos em camundongos imunizados com a enolase formulada com o ACF

mostraram um título maior de anticorpos sendo que a rEno foi reconhecida até a diluição 1:51200 (Figura 10B).

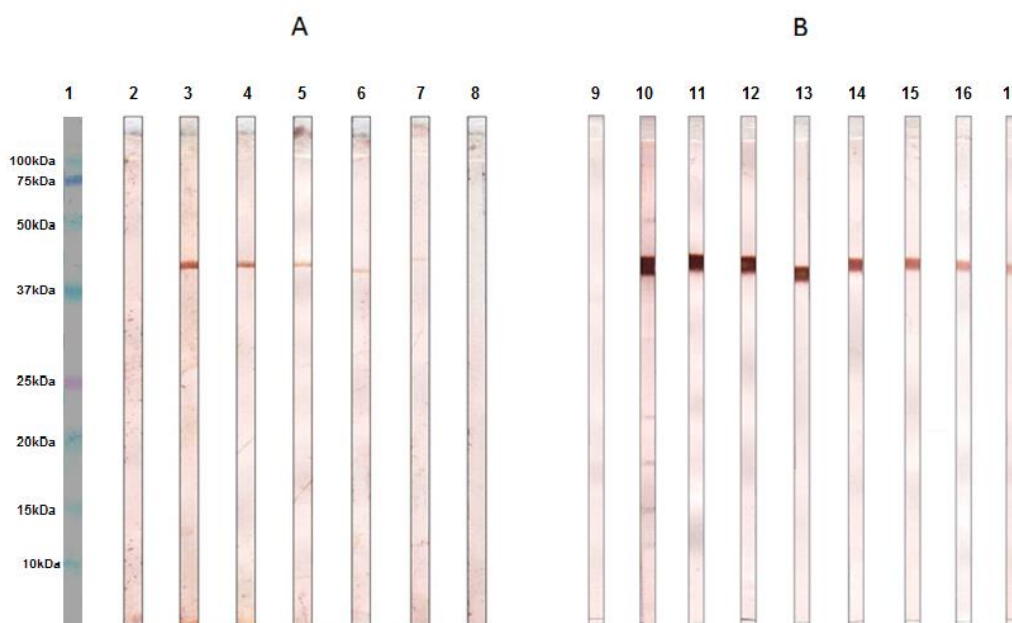


Figura 10. Titulação do soro sAnti-rEno por immunoblotting. A rEno foi submetida à eletroforese vertical em SDS-PAGE 10% e após transferida para membrana de nitrocelulose. A membrana foi cortada em tiras, bloqueadas com BSA 5% em TBS-T e em seguida incubada com diluições seriadas do sAnti-rEno obtido de camundongos imunizados com apenas a rEno (A) ou em formulação com o adjuvante de Freund (B). Foi adicionado o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase e a formação dos complexos antígenos-anticorpos foi revelada com o cromógeno diaminobenzidina. Linha 1: Marcador de peso molecular; Linha 2 e 9: Membrana com rEno incubada com sCNI como controle de inespecificidade; Linhas 3-8: Diluição seriada do sAnti-rEno de 1:50 até 1:1600. Linhas 10-17: Diluição seriada do sAnti-rEno de 1:400 até 1:51200.

5.10. Ensaio de inibição da adesão

Como mostra a Figura 11, o sAnti-rEno inibiu adesão de Ss16345, Ss250 e Ss256 aos fibroblastos e essa inibição não foi estatisticamente diferente à gerada pelo sCI e sAnti-PSC com os respectivos fungos. Nossos resultados sugerem que a enolase de *S. schenckii* pode ter um papel relevante no processo de adesão e colonização deste fungo no hospedeiro.

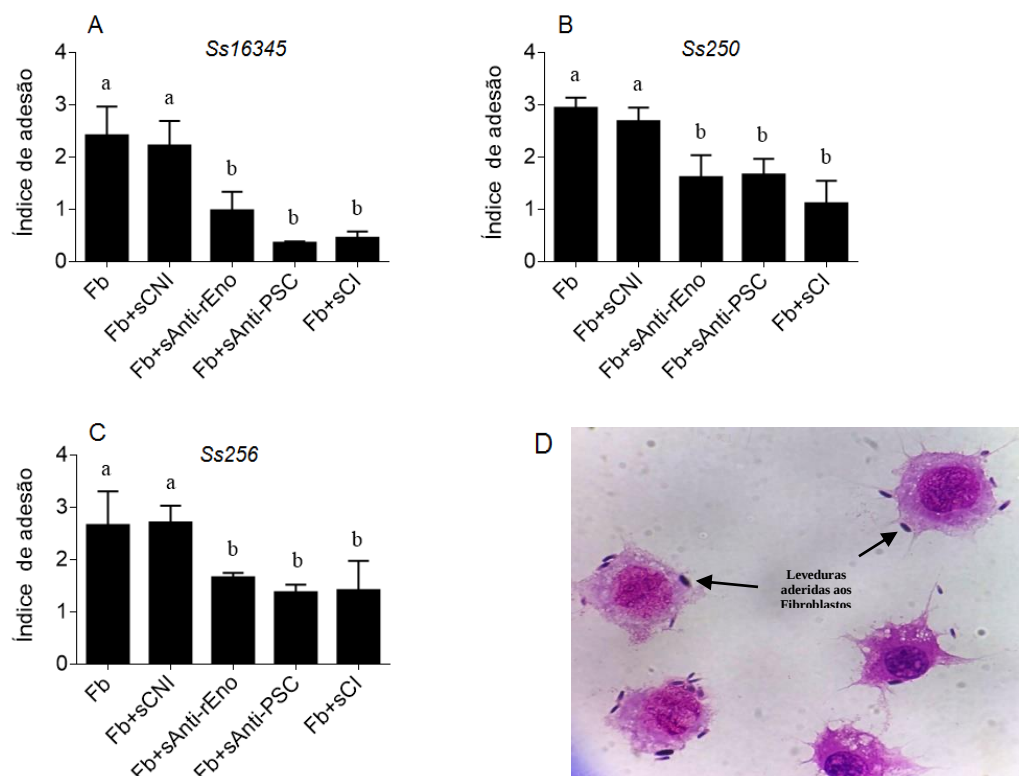


Figura 11. sAnti-rEno inibe a adesão de Ss16345, Ss250 e Ss256 aos fibroblastos (Fb). As leveduras de Ss16345, Ss250 e Ss256 foram opsonizadas com sAnti-rEno, sAnti-PSC, sCI ou sCNI ou não como controles. Em placas de cultura contendo fibroblastos foram adicionadas as leveduras, após lavagens adesão do fungo aos fibroblastos foi visualizada por coloração de Gram. A significância estatística foi determinada por ANOVA com teste de comparações múltiplas de Tukey e intervalo de confiança de 95%. Letras distintas representam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos ($p < 0,05$). (A-C) Índice de inibição da adesão em leveduras de Ss16345, Ss250 e Ss256, respectivamente; (D) Foto representativa de fibroblastos com leveduras de Ss250 não-opsonizadas aderidas.

5.11. Ensaio de fagocitose

A Figura 12 mostra que anticorpos contra a enolase favoreceram a fagocitose de leveduras de *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, o que poderia ser útil no controle da infecção *in vivo*. A diferença estatística entre o índice fagocítico gerado pelo sAnti-rEno e os sAnti-PSC e sCI pode ser devido à presença de anticorpos específicos contra outros antígenos imunogênicos além da enolase nestes soros.

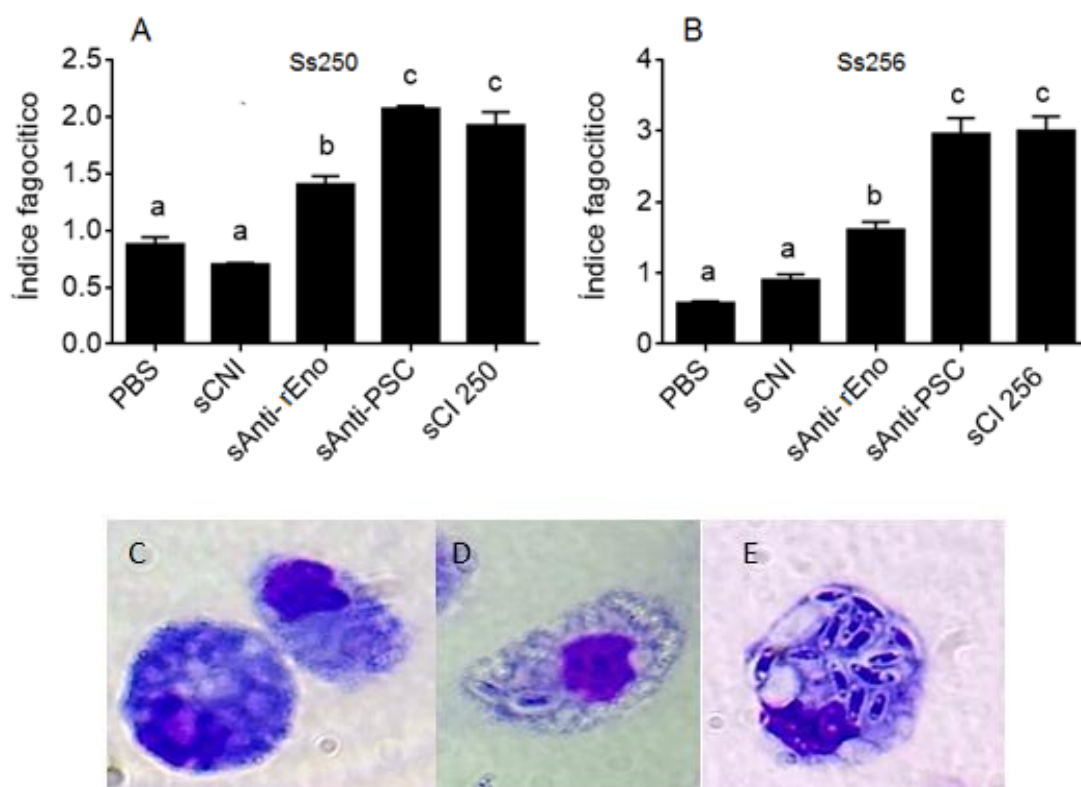


Figura 12. sAnti-rEno e sAnti-PSC favorecem a fagocitose dos dois isolados de *S. brasiliensis* por macrófagos peritoneais. As leveduras de Ss250 e Ss256 foram opsonizadas com o sAnti-rEno, sAnti-PSC e/ou sCI ou sCNI como controles. Em placa de cultura as leveduras foram incubadas com macrófagos na proporção de 1:10. As células foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa. A significância estatística foi determinada por ANOVA usando o teste de comparações múltiplas de Tukey com intervalo de confiança de 95%. Letras distintas representam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos ($p < 0,05$). (A e B) Índice fagocítico em leveduras de Ss250 e Ss256, respectivamente; (C) Foto representativa de macrófagos sem leveduras fagocitadas; (D) Foto representativa de leveduras não opsonizadas fagocitadas por macrófago; (E) Foto representativa de leveduras opsonizadas com sAnti-rEno fagocitadas por macrófago.

5.12. Determinação da capacidade de adesão da enolase a componentes da matriz extracelular

A triagem dos ligantes da matriz extracelular à enolase por ELISA foi realizada com os constituintes da matriz extracelular, fibronectina e plasminogênio, e mostraram que esta proteína é capaz de se ligar a eles. Como mostra a Figura 9, a ligação da rEno a matriz extracelular aumenta conforme aumenta a sua concentração, porém quando analisadas as concentrações para a fibronectina, pode se observar que entre as concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ não há diferença estatística significativa.

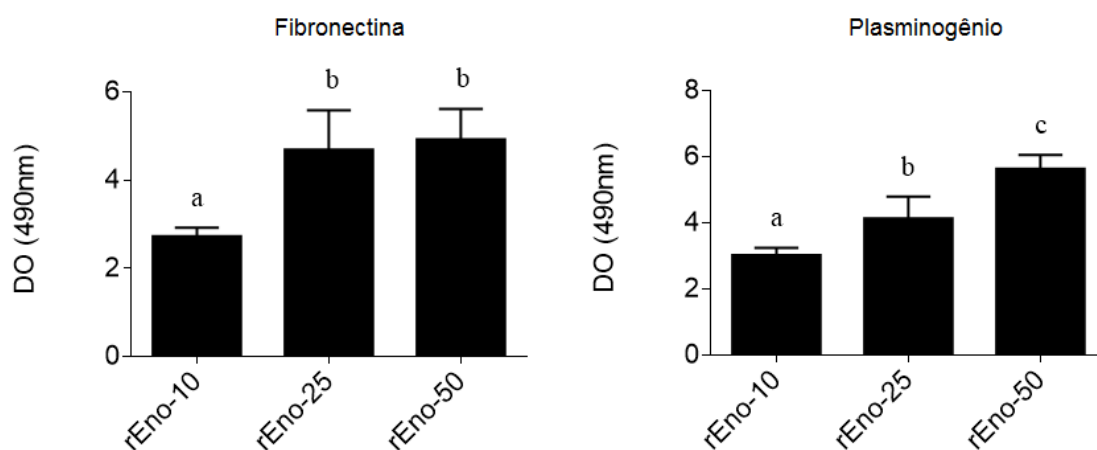


Figura 9. Ligação da enolase aos componentes da MEC: fibronectina e plasminogênio. Placas de microtitulação foram sensibilizadas com 10 µg/ml dos componentes da matriz extracelular e a proteína rEno em diferentes concentrações (10, 25, 50 µg/mL). A interação foi revelada por ELISA, com a leitura da absorbância em 490nm. O controle negativo foi feito com anticorpos primários, secundários, BSA 0,5% matriz extracelular. A significância estatística foi determinada por ANOVA usando o teste de comparações múltiplas de Tukey com intervalo de confiança de 95%. Letras distintas representam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos e os valores do controle já estão plotados nos resultados ($p < 0,05$).

6. Discussão

A esporotricose representa um importante problema de saúde Pública no Brasil (MARTIN *et al.*, 2014; GREMIÃO *et al.*, 2017) e os tratamentos existentes contra esta doença são demorados e causam muitos efeitos colaterais (PAIXÃO *et al.*, 2015; MOREIRA *et al.*, 2015). Soma-se a essa realidade, a falta de uma vacina veterinária e/ou humana contra esta doença (de SOUZA LACERDA *et al.*, 2011; PORTUONDO *et al.*, 2015) que possa auxiliar na medicina preventiva ou como terapia associada ao tratamento convencional com antifúngicos.

Um dos caminhos a serem seguidos na descoberta de tratamentos eficientes para as micoses sistêmicas é a identificação de moléculas de superfície conhecida como adesinas que medeiam à invasão e colonização do fungo no tecido do hospedeiro (WIZEMANN *et al.*, 1999). Sendo assim a geração de uma reposta imune efetiva, que bloqueie esse primeiro estágio de infecção pode, em princípio, ser uma estratégia e/ou ferramenta eficaz para evitar a disseminação do patógeno no hospedeiro.

Um estudo recente do nosso grupo demonstrou que o soro obtido de camundongos imunizados com um extrato de nove proteínas da parede celular de Ss16345 formulado com o adjuvante hidróxido de alumínio HA apresentou reatividade contra duas proteínas, uma de 71 kDa de função desconhecida e outra de 47 kDa identificada como enolase (PORTUONDO *et al.*, 2016). A transferência passiva desse soro em camundongos induziu a proteção contra a infecção por esse fungo, evidenciando a eficácia da formulação e a possível contribuição da enolase como alvo antigênico para fins vacinais contra a esporotricose.

Já foi relatado que a enolase além de participar na via glicolítica de muitos organismos também age como uma adesina na superfície celular dos patógenos mediando a invasão no hospedeiro (JI *et al.*, 2016). A imunogenicidade desta proteína também tem sido relatada em modelo de infecção de *C. albicans* (LI *et al.*, 2011), *Plasmodium falciparum* (PAL-BHOWMICK *et al.*, 2007) e outras espécies, porém as propriedades da enolase não foram ainda estudadas em *S. schenckii*.

Com base nestes antecedentes, nós decidimos avaliar as propriedades adesivas e imunogênicas da enolase de *Sporothrix spp.* para fins vacinais contra a esporotricose.

Vários estudos têm demonstrado que o perfil de proteínas, carboidratos, lipídeos e outros componentes da parede celular do fungo mudam conforme as condições e composição do meio de cultura (SCOTT *et al.*, 1989; MENDOZA *et al.*, 2012), a fase dimórfica do fungo (leveduras ou micélio) e a fase em que encontra-se na curva de crescimento (ALMEIDA *et*

al., 2015; RUIZ-BACA *et al.*, 2009). Logo, neste trabalho foram primeiramente padronizadas as curvas de crescimento de leveduras dos dois isolados de gatos, Ss250 e Ss256, por representar a forma do fungo em que se encontra no hospedeiro.

É provável que a alta taxa de crescimento do isolado Ss256 na fase logarítmica de crescimento em comparação ao Ss250 deva-se a sua maior virulência no hospedeiro, sendo que estudos prévios realizados em camundongos Balb/c (resultados não mostrados) com esses dois isolados e com a cepa Ss16345 mostraram manifestações patológicas mais rápidas nos animais sob a infecção de Ss256 em relação aos outros fungos. Estudos realizados com *Aspergillus fumigatus* em modelos experimentais demonstraram que isolados clínicos com maiores taxas de crescimento *in vitro* apresentaram maior virulência em camundongos quando comparados com isolados de crescimento lento (PAISLEY *et al.*, 2005) ou isolados ambientais (MONDON *et al.*, 1996; AUFAUVRE-BROWN *et al.*, 1998), sugerindo uma correlação entre a virulência e o acelerado crescimento desta espécie no hospedeiro, embora que diferenças fenotípicas específicas possam desempenhar um papel nessa associação que ainda precisam ser estudadas (AMARSAIKHAN *et al.*, 2014).

O próximo passo foi então caracterizar o perfil protéico das PSC dos dois isolados *S. brasiliensis* com a finalidade de verificar a presença da enolase em ambos os fungos.

A extração realizada ao término das duas horas de tratamento das leveduras como o tampão de extração de proteínas contendo o reagente DTT evidenciou um baixo rendimento protéico, em média 1mg por 16,2g de massa fúngica, aproximadamente. Neste sentido com o intuito de aumentarmos esse rendimento para os ensaios propostos, o procedimento de extração foi estendido para 3 horas, conseguindo assim um rendimento protéico três vezes maior ao anterior. Devemos ressaltar que esta modificação do protocolo descrito por outros autores (KUBITSCHK- BARREIRA *et al.*, 2013, CASTRO *et al.*, 2013, PORTUONDO *et al.*, 2016), não afetou a viabilidade celular de Ss16345, Ss250 e Ss256 e por consequência a integridade da membrana celular antes e após o tratamento com DTT, sugerindo que nosso isolado protéico poderia estar constituído apenas por proteínas da superfície celular e não proveniente do citoplasma por conta da lise celular. No entanto houve a presença de proteínas provenientes do meio intracelular, possivelmente explicada pela existência de uma via de secreção não-canônica que justifica a presença de proteínas atípicas localizadas na superfície celular do fungo no extrato. Por exemplo, Kubitschek-Barreira e colaboradores (2013) mostraram que em um isolado protéico derivado da superfície de *Aspergillus fumigatus* utilizando o mesmo tampão de extração de proteínas com DTT, sem dano ou rompimento de

membrana, foram identificadas uma proteína com o sinal de secreção típico de parede celular e duas proteínas preditas como adesinas putativas, enolase e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Além disso, neste estudo foram identificadas outras proteínas, como as que estão ligadas covalentemente a estrutura de polissacarídeos e são atípicas em extrato de proteínas da parede celular, o que demonstra que um sinal canônico para secreção pode não ser sempre necessário para a localização das proteínas na superfície celular do fungo.

A pouca diferença no número de bandas contidas nas PSC entre os fungos utilizados e especialmente a presença de muitas proteínas compartilhadas entre os dois isolados de gatos, Ss250 e Ss256, evidencia o alto grau de parentesco fenotípico entre as espécies do gênero *Sporothrix* como já foi descrito por Rodrigues e colaboradores (2013). Esta informação é importante na identificação de potenciais alvos antigênicos para a imunoprofilaxia multi-espécie contra a esporotricose ou inclusive como marcadores moleculares para o diagnóstico desta doença. Alinhado com isto, nosso grupo de trabalho previamente demonstrou que um soro obtido em camundongos imunizados com uma formulação vacinal à base de PSC de Ss16345 reagiu com a superfície celular das leveduras de Ss250 e ainda essa formulação induziu proteção em camundongos desafiados com ambas as cepas (PORTUONDO *et al.*, 2017), evidenciando a presença de antígenos imunodominantes e compartilhados entre ambas as espécies, provavelmente associados à proteção conferida.

A espectrometria de massas revelou que dentro da banda de proteínas próxima a 50 kDa no gel de eletroforese das PSC de Ss250 e Ss256 encontrava-se a enolase de 47 kDa previamente descrita por Portuondo e colaboradores (2016) na cepa Ss16345. Este resultado além de explicar a reatividade do sAnti-rEno com essa banda, também sugere que a enolase provavelmente está altamente conservada no gênero *Sporothrix*. Um estudo recente realizado por nosso grupo de trabalho mostrou por citometria de fluxo que o sAnti-rEno reagiu com a superfície das leveduras de Ss16345, Ss250, Ss256 e Ss1099-18 evidenciando a presença da enolase na parede celular desses fungos e também sugerindo que a mesma nessa localidade pode agir como uma adesina, favorecendo a invasão e colonização dessas espécies no hospedeiro, como já foi demonstrado em modelos de infecção de *C. albicans* (SILVA *et al.*, 2014), *P. brasiliensis* (DONOFRIO *et al.*, 2009, NOGUEIRA *et al.*, 2010) e outras espécies fúngicas.

Esperávamos encontrar nos géis de eletroforese bidimensional realizado da banda próximas a 50 kDa a presença de vários spots com uma distribuição não tão homogênea e

visualmente definida à obtida. É conhecido que o nível de expressão das enzimas glicolíticas são altamente elevadas nas células e ainda essa expressão é superior na enolase, aproximadamente 15-20 vezes (ROTH *et al.*, 1988).

Neste sentido é provável que à baixa concentração por unidade de proteínas nessa banda de aproximadamente 50 kDa em relação à enolase impediram a sua detecção pelo corante Coomassie, limitando assim a sua visualização nos géis. Assumindo esta hipótese e observando o alto grau de definição dos spots nos géis da eletroforese de 2D com pesos moleculares e pontos isoelétricos muito próximo a enolase de 47 kDa da cepa Ss16345 descrita por Portuondo e colaboradores (2016), acreditamos que os mesmos sejam isoformas desta proteína, onde as diferenças de pesos moleculares e pontos isoelétricos podem ser resultados de modificações pós-traducionais envolvendo processos de glicosilação, fosforilação ou substituição de aminoácidos (PAL-BHOWMICK *et al.*, 2007b, RODRIGUES *et al.*, 2015). Esta hipótese precisa ser confirmada por meio da especificidade do sAnti-rEno com os diferentes spots encontrados na banda de 50 kDa. Vários trabalhos têm demonstrado que a enolase em muitos organismos se apresenta com múltiplas isoformas em dependência do compartimento celular (JI *et al.*, 2016), por exemplo, Pal-Bhowmick e colaboradores (2007) demonstraram que a enolase de *Plasmodium yoelii*, um dos agentes causadores das diferentes formas da malária, aparece distribuída nesse patógeno com um número de 4 isoformas no citoplasma, duas isoformas na membrana celular, uma isoforma no núcleo e maisduas no citoesqueleto. Esta diversidade de isoformas da enolase poderia explicar suas diferentes funções não glicolíticas nas células, ditas *moonlightings*, como por exemplo a de ligação ao plasminogênio (PANCHOLI & FISCHETTI, 1998) ou a fibronectina (CASTALDO *et al.*, 2009), de proteína de estresse oxidativo em células endoteliais ou proteína de choque térmico; de ligação ao citoesqueleto e cromatina para auxiliar na transcrição (SONG *et al.*, 2014; SUBRAMANIAN *et al.*, 2000; GAO *et al.*, 2013; PANCHOLI *et al.*, 2001; HSIAO *et al.*, 2013) além de desempenhar um papel importante nos processos de imunomodulação em modelos sistêmicos de candidíase ou pacientes com malária (Pitarch *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2012; PAL-BHOWMICK *et al.*, 2007) entre outras.

A capacidade de alguns fungos de se aderirem a componentes da matriz extracelular do hospedeiro constitui um fator importante na patogênese (DONOFRIO *et al.*, 2009) uma vez que medeiam a colonização, estabelecimento e disseminação do patógeno no hospedeiro (SCHWARZ-LINEK *et al.*, 2006). Em relação a isto nós avaliamos se rEno poderia se ligar *in vitro* a fibronectina e ao plasminogênio. E o resultado mostrou que a rEno é capaz de se ligar

a ambos os constituintes da matriz celular, porém essa ligação foi saturada no caso da fibronectina à concentração de 25 µg/mL da rEno em comparação ao plasminogênio, evidenciando uma maior afinidade desta proteína pela fibronectina. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores (MARCOS *et al.*, 2016, DONOFRIO *et al.*, 2009) em estudos com enolase de *P. brasiliensis*, que foi caracterizada por Donofrio e colaboradores (2009) como uma adesina ligante de fibronectina. As proteínas ligantes de fibronectina contribuem para a patogênese da infecção e manutenção do fungo em tecidos mediando a adesão aos hospedeiros. Dado que as adesinas dos fungos podem conter diferentes sequências capazes de serem reconhecidas por componentes da matriz extracelular (YAMADA, 1991; 2003), supõe-se que uma das possíveis combinações de ligação entre essas sequências da enolase e da fibronectina fornece uma forte interação entre elas. A partir desses resultados, sugerimos que *Sporothrix* possa usar a enolase para aderir e talvez invadir células hospedeiras, como já descrito para outros agentes patogênicos (PANCHOLI, 2001), e possivelmente age como um fator de virulência com função adesiva envolvendo também a ligação ao plasminogênio (BERGMANN *et al.*, 2001; BERNAL *et al.*, 2004; PANCHOLI, 2001).

Visando a imunogenicidade e o efeito protetor dos anticorpos específicos contra a enolase em outros fungos patogênicos (LI *et al.*, 2011; FENG *et al.*, 2009; PAL-BHOWMICK *et al.*, 2007a) também foi avaliado se esta proteína no caso de *S. schenckii* poderia ser imunogênica. A reatividade do sAnti-rEno na diluição 1:800 com a rEno, evidenciou a imunogenicidade da enolase, sendo que a mesma na presença do adjuvante de Freund foi capaz de induzir altos títulos de anticorpos antígenos específicos. Cabe ressaltar que esse título de anticorpos foi superior aos relatados por Li e colaboradores (2011) com a enolase recombinante de *C. albicans*. Esses autores utilizaram o mesmo esquema de imunização e a mesma dose antigênica de 100 µg/mL da enolase dentro de cada formulação que utilizamos neste estudo, o que indica provavelmente que a enolase de *S. schenckii* possa ser mais imunogênica que a enolase de *Candida*. Outro resultado interessante de Li e colaboradores (2011) também demonstrado nesse estudo foi que a transferência passiva desse soro específico contra a enolase de *Candida* em camundongos C57BL-6 conferiu uma proteção efetiva nesses animais após serem desafiados com uma dose letal das leveduras de *C. albicans* 3630 ou *C. albicans* SC5314, evidenciando a potencialidade da enolase como um alvo antigênico para fins vacinais na candidíase (LI *et al.*, 2011).

A inibição *in vitro* gerada pelo sAnti-rEno às leveduras de Ss16345, Ss250 e Ss256 a fibroblastos sugere que a enolase de *S. schenckii* possater um papel relevante na virulência deste fungo no hospedeiro, o que a tornaria um alvo antigênico potencial para fins vacinais na esporotricose. Como já demonstrado por outros autores, anticorpos específicos contra a enolase são capazes de inibir a adesão do microrganismo ao hospedeiro, por exemplo, Silva e colaboradores (2014) demonstraram que um anticorpo específico contra a enolase de *C. albicans* inibiu a adesão deste fungo ao tecido gastrointestinal de camundongos. Donofrio e colaboradores (2009) também mostraram que um anticorpo policlonal obtido em coelhos contra a enolase de 54 kDa presente na superfície celular de *P. brasiliensis* inibiu 82% a adesão deste fungo a células epiteliais A549. E em outro estudo, Esgleas e colaboradores (2008) também demonstraram que o tratamento de *Streptococcus suis* com um soro específico contra a enolase desta espécie inibiu sua adesão acélulas do endotélio microvascular cerebral. Com base nos nossos resultados, acreditamos que a enolase de *S. schenckii* possa ter um papel relevante no processo de adesão e colonização deste fungo no hospedeiro.

Nas últimas duas décadas o papel de anticorpos na defesa do hospedeiro contra diferentes fungos patogênicos (CASADEVALL & PIROFSKI, 2012b), incluindo *S. schenckii* (NASCIMENTO *et al.*, 2008, ALMEIDA, 2012), tem sido mostrado de várias formas, envolvendo a opsonização e inibição da adesão do fungo em células hospedeiras, assim como a ativação do complemento e da citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) (CASADEVALL & PIROFSKI, 2012a). Segundo Portuondo e colaboradores (2016a), macrófagos foram capazes de fagocitar leveduras de *S. schenckii* quando opsonizadas com soro de animais previamente imunizados com um extrato de nove proteínas isolado da superfície celular de Ss16345, contendo a enolase, enquanto que leveduras não-opsonizadas foram raramente fagocitadas. Nesse estudo o soro desses animais mostrou reatividade para apenas a enolase e outra proteína de 71 kDa mas de função desconhecida, então os autores sugeriram que provavelmente ambas as proteínas favoreceram a opsonofagocitose das leveduras de *S. schenckii*.

Um importante mecanismo de proteção mediado por anticorpos é a opsonização do microrganismo pelo receptor Fc (FcγR) (ALVAREZ *et al.*, 2008) que medeia várias funções de macrófagos, como estimulação da liberação de citocinas, ativação da *burst* respiratório, fagocitose e citotoxicidade celular dependente de anticorpos (RICHARDS *et al.*, 2008; CLAVEL *et al.*, 2008). Esse papel protetor de anticorpos contra alguns fungos já foram descritos, por exemplo *Cryptococcus neoformans* (CASADEVALL & PIROFSKI, 2005). No

presente estudo, os resultados mostraram que a opsonização das leveduras dos dois isolados de gatos (Ss250 e Ss256) favoreceu a fagocitose desses fungos por macrófagos peritoneais isolados de camundongos Balb/c. Este resultado corrobora com de Lima Franco e colaboradores (2012) que demonstraram que a fagocitose de *S. schenckii* por macrófagos na presença de soro de camundongos infectados previamente com leveduras é superior a do soro de camundongos não infectados e também com Glowalla e colaboradores (2009) que purificaram anticorpos contra a enolase e outras duas proteínas isoladas da superfície celular de *Staphylococcus aureus* os quais foram capazes de opsonizar as bactérias, levando a uma potente opsonofagocitose e efeito bactericida *in vitro*. Além disso, confirma hipótese anterior de que a capacidade do soro de potencializar a fagocitose pode estar atribuída à atividade ligante da enolase.

Neste estudo foi demonstrado que a enolase está presente nos isolados *S. brasiliensis*, considerada essa a espécie mais virulenta dentro do complexo *Sporothrix* (RODRIGUES *et al.*, 2013) e que há uma reatividade do sAnti-rEno contra essa espécie. Anticorpos específicos contra a enolase foram responsáveis, ao menos em parte, pela inibição de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* aos fibroblastos e aumento da fagocitose *in vitro*. Portanto esses resultados, somados à capacidade de ligação da enolase a fibronectina e ao plasminogênio sugerem que a essa proteína além de ser imunogênica possa estar envolvida na virulência do fungo, contribuindo na patogênese da infecção. Diante do exposto, acreditamos que a enolase de *S. schenckii* possa ser um potencial alvo antigênico gerando novas ferramentas para estratégias vacinais e/ou terapêuticas na proteção contra a esporotricose.

7. Conclusões

- As curvas de crescimento dos isolados de *S. brasiliensis* Ss250 e Ss256 foram padronizadas. Sendo que o Ss256 mostrou uma fase logarítmica menor do que Ss250, podendo significar maior virulência desse isolado.
- Ambos os isolados mostraram semelhança no perfil de proteínas na parede celular das leveduras durante a fase logarítmica de crescimento, destacando a presença da enolase de 47 kDa.
- O sAnti-rEno reagiu com a enolase contida nas PSC obtidas dos fungos.
- O sAnti-rEno reduziu a adesão dos fungos em estudo aos fibroblastos.
- O sAnti-rEno favoreceu a fagocitose dos mesmos por macrófagos peritoneais.
- Os constituintes da MEC: fibronectina e o plasminogênio foram reconhecidos pela enolase.

Referências

- ABI-CHACRA, E. A.; SOUZA, L. O.; CRUZ, L. P., BRAGA-SILVA, L. A.; GONÇALVES, D. S.; SODRÉ, C. L.; ... & ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. Phenotypical properties associated with virulence from clinical isolates belonging to the *Candida parapsilosis* complex. **FEMS yeast research**, v.13,n.8, p. 831-848, 2013.
- ALBA-FIERRO, C. A.; PÉREZ-TORRES, A.; LÓPEZ-ROMERO, E.; CUÉLLAR-CRUZ, M.; & RUIZ-BACA, E. Cell wall proteins of *Sporothrix schenckii* as immunoprotective agents. **Rev.Iberoam. Micol.**, v.31, n.1, p. 86-89, 2014.
- ALMEIDA, S.R. Therapeutic monoclonal antibody for sporotrichosis. **Front Microbiol**, v.3, Article 409, nov. 2012. DOI:http://10.3389 / fmicb.2012.00409.
- ALMEIDA-PAES, R.; BAILÃO, A.M.; PIZZINI, C.V.; REIS, R.S.; SOARES, C.M.; PERALTA, J.M.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M. Cell-free antigens of *Sporothrix brasiliensis*: antigenic diversity and application in an immunoblot assay. **Mycoses**. v.55, n.6, p.467-75, 2012.
- ALMEIDA-PAES, R.; DE OLIVEIRA, M.M.; FREITAS, D.F.; DO VALLE, A.C.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* is associated with atypical clinical presentations. **PLoS Negl Trop Dis**. v.8, n.9, p. 3094, 2014.
- ALMEIDA-PAES, R.; FRASES, S.; FIALHO MONTEIRO, P.C.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M.; NOSANCHUK, J.D. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. **Microbes Infect**. v.11, p.554–562, 2009.
- ALVAREZ, Y.; TANG, X.; COLIGAN, J. E.; BORREGO, F. The CD300a (IRp60) inhibitory receptor is rapidly up-regulated on human neutrophils in response to inflammatory stimuli and modulates CD32a (FcγRIIa) mediated signaling. **Mol. Immunol**. v. 45, p. 253–258, 2008.
- AMARSAIKHAN, N.; O'DEA, E. M.; TSOGEREL, A.; OWEGI, H.; GILLENWATER, J.; TEMPLETON, S. P. Isolate-dependent growth, virulence, and cell wall composition in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. **PLoS One**, v.9, n.6, e100430, 2014.
- ARANGO, M.; RESTREPO A. Determination of the growth curves of the mycelial and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia** v.59, p.163–169, 1976.
- ARENAS, R. Sporotrichosis. In: MERZ, W.G.; HAY, R. editors. **Topley & Wilson's microbiology and microbial infections**. 10th ed. London: Hodder-Arnold, 2005. p.367-384.
- ARRILLAGA-MONCRIEFF, I.; CAPILLA, J.; MAYAYO, E.; MARIMON, R.; MARINÉ, M.; GENÉ, J. et al. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. **Clin.Microbiol.Infect**, v.15, n.7, p.651-655, 2009.
- AUFAUVRE-BROWN, A.; BROWN, J. S.; HOLDEN, D. W. Comparison of virulence between clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. **European J. Clin.Microbiol. Infect. Dis.**, v.17, n.11, p.778-780, 1998.
- AUNG A.K.; TEH B.M.; MCGRATH C.; THOMPSON P.J. Pulmonary sporotrichosis: case series and systematic analysis of literature on clinico-radiological patterns and management outcomes. **Med Mycol**. v.51, p. 534–544, 2013.

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

BARROS, M.B.; SCHUBACH, T.M.P.; COLL, J.O.; GREMIÃO, I.D.; WANKE, B.; SCHUBACH, A.O. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. **Rev. Panam Salud Publica**. v.27, p.455-460, 2010.

BECK, K., HUNTER, I.; ENGEL, J. Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. **The FASEB J**, v.4, n.2, p.148-160, 1990.

Belkacemi L.; Barton R.C.; Hopwood V.; Evans E.G.V. Determination of optimum growth conditions for gliotoxin production by *Aspergillus fumigatus* and development of a novel method for gliotoxin detection. **Med Mycol**. v.37, p.227– 233, 1999.

BERGMANN, S., ROHDE, M., CHHATWAL, G. S.; HAMMERSCHMIDT, S. a-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)- binding protein displayed on the bacterial cell surface. **Mol Microbiol**.v.40, p. 1273–1287, 2001.

BERNAL, D.; DE LA RUBIA, J. E.; CARRASCO-ABAD, A. M.; TOLEDO, R.; MASCOMA, S.; MARCILLA, A. Identification of enolase as a plasminogen-binding protein in excretory-secretory products of *Fasciola hepatica*. **FEBS Lett** 563, 203–206, 2004.

BERNARDES-ENGEMANN, A. R.; LOUREIRO Y PENHA, C. V.; BENVENUTO, F.; BRAGA, J. U.; BARROS, M. L.; OROFINO-COSTA, R.; LOPES-BEZERRA, L. M. A comparative serological study of the Ss CBF antigenic fraction isolated from three *Sporothrix schenckii* strains. **Med. Mycol.**, v.47, n.8, p. 874-878, 2009.

BHUTIA, P.Y.; GURUNG, S.; YEGNESWARAN, P.P.; PRADHAN, J. *et al.* A case series and review of sporotrichosis in Sikkim. **J Infect Dev Ctries** v.5, n.8, p.603–608, 2011.

BORGES T.S.; ROSSI C.N.; FEDULLO J.D. *et al.* Isolation of *Sporothrix schenckii* from the claws of domestic cats (indoor and outdoor) and in captivity in São Paulo (Brazil). **Mycopathologia**.v.176, p. 129–137, 2013.

BUISSA-FILHO R.; PUCCIA R.; MARQUES A.F. *et al.* The monoclonal antibody against the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* mediates immuneprotection in infected BALB/c mice challenged intratracheally with the fungus. **Infect Immun** v.76, p.3321–3328, 2008.

CARABARÍN-LIMA, A.; RODRÍGUEZ-MORALES, O.; GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, M.C.; BAYLÓN-PACHECO, L.; REYES, P.A.; ARCE-FONSECA, M.; ROSALES-ENCINA, J.L. In silico approach for the identification of immunological properties of enolase from *Trypanosoma cruzi* and its possible usefulness as vaccine in Chagas disease. **Parasitol.Res.**, v.113, n.3, p.1029-1039, 2014.

CARLOS, I.Z.; BATISTA-DUHARTE, A. **Sporotrichosis: New Developments and Future Prospects**. Switzerland: Springer International Pub., 2015. p. 25-35.

CARLOS, I. Z.; SGARBI, D. B.; SANTOS, G. C.; PLACERES, M. C. *Sporothrix schenckii* lipid inhibits macrophage phagocytosis: involvement of nitric oxide and tumour necrosis factor- α . **Scand. J. Immunol**.v.57, p.214–220, 2003.

CARLOS, I.Z.; SASSA, M.F.; SGARBI, D.B.; PLACERES, M.C.; MAIA, D.C. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. **Mycopathologia**.v.168, p.1–10, 2009.

CARLOS, I.Z.; SGARBI, D.B.G.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C.S.; SILVA, C.L. Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the sistemic form of the disease. **Mycopathologia**.v.117, p. 139-144, 1992.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L.A. A new synthesis for antibody-mediatedimmunity. **Nat. Immunol.**13, 21–28, 2012a.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L.A. Immunoglobulins in defense, pathogenesis, andtherapy of fungal diseases. *Cell. Host. Microbe*.v.11, p. 447–456, 2012b.

CASADEVALL, A. Cards of virulence and the global virulome for humans.**Microbev.**1, p.359–364, 2006.

CASTALDO C.; VASTANO V.; SICILIANO R.A.; CANDELA M.; VICI M.; MUSCARIELLO L.; MARASCO R.; SACCO M.Surface displaced alfa-enolase of *Lactobacillus plantarum* is a fibronectin binding protein.**Microb. Cell Fact.**,v.8, p.14, 2009.

CASTILLO, M.C.; TAPIA, F.J.; ARCINIEGAS, E.Ultrastructural localization of specific surface antigens in the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*.**J. Med. Vet. Mycol.**v.28, n.1, p.91-94, 1990.

CASTRO, R.A.; KUBITSCHKE-BARREIRA, P.H.; TEIXEIRA, P.A.; SANCHES, G.F.; TEIXEIRA, M.M.; QUINTELLA, L P.; ALMEIDA, S R.; COSTA, R.O.; CAMARGO, Z.P.; FELIPE, M.S.; DE SOUZA, W.; LOPES BEZERRA, L.M.Differences in cell morphometry, cell wall topography and gp70 expression correlate with the virulence of *Sporothrix brasiliensis* clinical isolates. **PLoS ONE**. v.8, n.10, e75656, 2013.

CHAKRABARTI, A.; BONIFAZ, A.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; MOCHIZUKI, T.; LI S.Global epidemiology of sporotrichosis. **Med. Mycol.**v.53, n.1, p.3-14, 2015.

CHANG, S.; HERSH, A.M.; NAUGHTON, G.; MULLINS, K.; FUNG, M.A.; SHARON, V.R. 2013. Disseminated cutaneous sporotrichosis. **Dermatol.Online J.**v.19, 11, doj_20401. Disponível em:<http://escholarship.org/uc/item/62j0t5r9>.

CHATTERJEE, S.S.; HOSSAIN, H. *et al.* Intracellular gene expression profile of *Listeria monocytogenes*.**Infect Immun**v.74, n.2, p. 1323-1338, 2006.

CHEN, N.; YUAN, Z. G.; XU, M.J.; ZHOU, D.H.; ZHANG, X. X.; ZHANG, Y.Z.; ZHU, X.Q.*Ascaris suum* enolase is a potential vaccine candidate against ascariasis. **Vaccine**, v.30, n.23, p. 3478-3482, 2012.

CLAVEL, C.; NOGUEIRA, L.; LAURENT, L.; IOBAGIU, C.; VINCENT, C.; SEBBAG, M.*et al.* Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor alpha through Fcgamma receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen. **Arthritis Rheum.**v.58, p.678–688, 2008.

CORK, A.J.; JERGIC, S.; HAMMERSCHMIDT, S.; KOBE, B.; PANCHOLI, V.; BENESCH, J.L.; WALKER, M.J. Defining the structural basis of human plasminogen binding by streptococcal surface enolase.**J. Biol. Chem.**,v.284, n.25, p. 17129-17137, 2009.

CRUZ L.C.H. Complexo *Sporothrix schenckii*.Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. **Vet. e Zootec**, 20, 2013. (Edição Comemorativa): 08-28.

CUNNINGHAM, K.M.; BULMER, G. S.; RHOADES, E.R. Phagocytosis and intracellular fate of *Sporothrix schenckii*.**J Infect Dis** v.140, p.815–817, 1979.

DA ROSA, A.C.; SCROFERNEKER, M.L.; VETTORATO, R. *et al.* Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 52, n. 3, p. 451-459, 2005.

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

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

DE ARAUJO, T.; MARQUES.A.C.; KERDEL, F. Sporotrichosis. **Int J Dermatol**. v. 40, p. 737-42, 2001.

DE LIMA BARROS, M.B.; DE OLIVEIRA SCHUBACH, A.; DO VALLE, A.C.F.; GALHARDO, M.C.G.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, T.M.P.; CONCEIÇÃO, M.J. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 4, p. 529-535, 2004.

DE LIMA BARROS, M.B.; DE ALMEIDA PAES, R.; SCHUBACH, A.O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Clin.Microbiol Rev.** v. 24, n. 4, p. 633–654, 2011.

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

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

DE SOUZA BARROS, M.; FERRARI, H.J.; DE REZENDE, R.S.; FARIA, J.L.M. Esporotricose felina: primeiro relato de caso diagnosticado em Uberaba–Minais Gerais. **Veterinária Notícias**, v. 18, n. 2, 2013.

DE SOUZA LACERDA, C.M.; DO NASCIMENTO MARTINS, E.M.; DE RESENDE, M.A.; DE ANDRADE, A.S.R. Gamma radiation effects on *Sporothrix schenckii* yeast cells. **Mycopathologia** v. 171, n. 6, p. 395-401, 2011.

DENIKUS, N.; ORFANIOTOU, F.; WULF, G.; LEHMANN, P.F.; MONOD, M.; REICHARD, U. Fungal antigens expressed during invasive aspergillosis. **Infect Immun.** Aug; v. 73, n. 8, p. 4704-13, 2005.

DIAS, N.; OLIVEIRA, M.M.E.; PORTELA, M.; SANTOS, C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; LIMA, N. Sporotrichosis caused by *Sporothrix mexicana*, Portugal. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 10, p. 1975-1976, 2011.

DIXON D.M.; SALKIN I.F.; DUNCAN R.A. *et al.* Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. **J Clin Microbiol**, v. 29, n. 6, p. 1106–1113, 1991.

DONOFRIO, F.C.; CALIL, A.C.A.; MIRANDA, E.T.; ALMEIDA, A.M.F.; BENARD, G.; SOARES, C.P.; GIANNINI, M.J.S.M. Enolase from *Paracoccidioides brasiliensis*: isolation and identification as a fibronectin-binding protein. **Journal of medical microbiology**, v. 58, n. 6, p. 706-713, 2009.

- DOOLITTLE, R.F. Fibrinogen and fibrin. **Annual review of biochemistry**, v. 53, n. 1, p. 195-229, 1984.
- DREISBACH A.; HEMPEL K.; BUIST G.; HECKER M.; BECHER D.; VAN DIJL J.M. Profiling the surfacome of *Staphylococcus aureus*. **Proteomics**, v. 10, n. 17, p. 3082-3096, 2010.
- DUTTA, S.; DASSARMA, P.; DASSARMA, S.; & JARORI, G.K. Immunogenicity and protective potential of a *Plasmodium spp.* enolase peptide displayed on archaeal gas vesicle nanoparticles. **Malaria journal**, v. 14, n. 1, p. 406, 2015.
- E SILVA, A.D.P.; OLIVEIRA, H.C.; SILVA, J.F.; SANGALLI-LEITE, F.; SCORZONI, L.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Microplate alamarblue assay for paracoccidioides susceptibility testing. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1250-1252, 2013.
- ENGLE, J.; DESIR, J.; BERNSTEIN, J.M. A rose by any other name. **Skinmed** v. 6, n. 3, p. 139–141, 2007.
- EROLE, P.; M. SENTANDREU, M. V. ELORZA, AND R. SENTANDREU. The highly immunogenic enolase and Hsp70p are adventitious *Candida albicans* cell wall proteins. **Microbiology**, v. 143, n. 2, p. 313-20, 1997.
- ESGLEAS, M.; LI, Y.; HANCOCK, M.A.; HAREL, J.; DUBREUIL, J.D.; & GOTTSCHALK, M. Isolation and characterization of α -enolase, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus suis*. **Microbiology**, v. 154, n. 9, p. 2668-2679, 2008.
- FENG, Y.; PAN, X.; SUN, W.; WANG, C.; ZHANG, H.; LI, X.; GAO, G.F. *Streptococcus suis* enolase functions as a protective antigen displayed on the bacterial cell surface. **Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 10, p. 1583-1592, 2009.
- FERNANDES, G.F.; DOS SANTOS, P.O.; RODRIGUES, A.M.; SASAKI, A.A.; BURGER, E.; DE CAMARGO, Z.P. Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 241-9, 2013.
- FERREIRA, L.S.; GONÇALVES, A.C.; PORTUONDO, D.L.; MAIA, D.C.; PLACERES, M.C.; BATISTA-DUHARTE, A.; CARLOS, I.Z. Optimal clearance of *Sporothrix schenckii* requires an intact Th17 response in a mouse model of systemic infection. **Immunobiology**, v. 220, n. 8, p. 985-992, 2015.
- FREITAS, D.F.; DE SIQUEIRA HOAGLAND, B.; DO VALLE, A.C.; FRAGA, B.B.; DE BARROS, M.B.; DE OLIVEIRA SCHUBACH, A.; DE ALMEIDA-PAES, R.; CUZZI, T.; ROSALINO, C.M.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C. Sporotrichosis in HIV-infected patients: report of 21 cases of endemic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Med. Mycol**, v. 50, n. 2, p. 170–178, 2012.
- FREITAS, D.F.; DO VALLE, A.C.; DE ALMEIDA PAES, R.; BASTOS, F.I.; GALHARDO, M.C. Zoonotic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: a protracted epidemic yet to be curbed. **Clin Infect Dis**, v. 50, p. 453, 2010.
- FREITAS, D.F.S.; VALLE, A.C.F.; DA SILVA, M.B.T.; CAMPOS, D.P.; LYRA, M.R. *et al.* Sporotrichosis: An Emerging Neglected Opportunistic Infection in HIV-Infected Patients in Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 8, p. e3110, 2014.

FURTADO, G.D.C.; CAO, Y.A.N.G.; JOINER, K.A. Laminin on *Toxoplasma gondii* mediates parasite binding to the beta 1 integrin receptor alpha 6 beta 1 on human foreskin fibroblasts and Chinese hamster ovary cells. **Infection and immunity**, v. 60, n. 11, p. 4925-4931, 1992.

GANCEDO, C.; AND FLORES, C.L. Moonlighting proteins in yeasts. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 72, n. 1, p. 197–210, 2008.

GESSLER, N.N.; EGOROVA, A.S.; BELOZERSKAYA, T.A. Melanin pigments of fungi under extreme environmental conditions. **Appl.Biochem.Microbiol.** v. 50, n. 2, p. 105–113, 2014.

GHOSH, A.; MAITY, P.K.; HEMASHETTAR, B.M.; SHARMA, V.K.; CHAKRABARTI, A. Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. **Mycoses**, v. 45, n. 11-12, p. 449–454, 2002.

GLOWALLA, E.; TOSETTI, B.; KRÖNKE, M.; & KRUT, O. Proteomics-based identification of anchorless cell wall proteins as vaccine candidates against *Staphylococcus aureus*. **Infection and immunity**, v. 77, n. 7, p. 2719-2729, 2009.

GONÇALVES A.C.; MAIA D.C.; FERREIRA L.S.; MONNAZZI L.G.; ALEGRANCI P.; PLACERES M.C.; BATISTA-DUHARTE A.; CARLOS I.Z. 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, n. 1- 2, p. 21-30, 2014.

GOZALBO, D.; ROIG, P.; VILLAMÓN, E.; GIL, M.L. Candida and candidiasis: the cell wall as a potential molecular target for antifungal therapy. **Curr Drug Targets Infect Disord**, v. 4, n. 2, p. 117-35. Review, 2004.

GREMIÃO, I.D.; MENEZES, R.C.; SCHUBACH, T.M.; FIGUEIREDO, A.B.; CAVALCANTI, M.C.; PEREIRA, S.A. Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. **Medical mycology**, v. 53, n. 1, p. 15-21, 2015.

GREMIÃO, I.D.F.; MIRANDA, L.H.M.; REIS, E.G.; RODRIGUES, A.M.; PEREIRA, S.A. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 1, p. e1006077, 2017.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A.M. Developments in Fungal Taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 3, p. 454-500, 1999.

GUO, M.; AND SCHIMMEL, P. Essential nontranslational functions of tRNA synthetases. **Nat. Chem. Biol**, v. 9, n. 3, p. 145–153, 2013.

GUTERRES K.A.; DE MATOS C.B.; OSORIO LDA G. *et al.* The use of (1-3) β -glucan along with itraconazole against canine refractory sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 177, n. 3–4, p. 217–221, 2014.

HEKTOEN L.; PERKINS C.F. Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. **J Exp Med**, v. 5, n. 1, p. 77–89, 1900.

HENDERSON, B.; MARTIN, A. Bacterial virulence in the moonlight: multitasking bacterial moonlighting proteins are virulence determinants in infectious disease. **Infect. Immun**, v. 79, n. 9, p.3476–3491, 2011.

HENDERSON, B.; MARTIN, A. Bacterial moonlighting proteins and bacterial virulence. **Curr.Top.Microbiol.Immunol**, v. 358, p. 155–213, 2013.

- HOGAN L.H.; BRUCE S.K.; LEVITZ S.M. Virulence factors of medically important fungi. **Clin Microbiol Rev**, v. 9, n. 4, p. 469–488, 1996.
- HOYER L.L.; FUNDYGA R. *et al.* Characterization of agglutinin-like sequence genes from non-*albicans* *Candida* and phylogenetic analysis of the ALS family. **Genetics**, v. 157, n. 4, p. 1555-1567, 2001.
- HUBERTS, D.H.; VAN DER KLEI, I.J. Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking. **Biochim. Biophys**, v. 1803, n. 4, p. 520–525, 2010.
- HUNG C.Y.; YU J.J. *et al.* A parasitic phase-specific adhesin of *Coccidioides immitis* contributes to the virulence of this respiratory fungal pathogen. **Infect Immun**, v. 70, n. 7, p. 3443-3456, 2002.
- JEFFERY, C. J. 1999. Moonlighting proteins. **Trends Biochem**, v. 24, n. 1, p. 8–11.
- JEFFERY, C.J. Moonlighting proteins: old proteins learning new tricks. **Trends. Genet**, v. 19, p. 415–417, 2003a.
- JEFFERY, C.J. Multifunctional proteins: examples of gene sharing. **Ann. Med**, v. 35, n. 1, p. 28–35, 2003b.
- JEFFERY C.J. Moonlighting proteins—an update. **Mol. Biosyst**, v. 5, n. 4, p. 345–350, 2009.
- JEFFERY, C.J. Why study moonlighting proteins?. **Frontiers in genetics**, v. 6, 2015.
- JI, H.; WANG, J.; GUO, J.; LI, Y.; LIAN, S.; GUO, W.; LIU, Y. Progress in the biological function of alpha-enolase. **Animal Nutrition**, v. 2, n. 1, p. 12-17, 2016.
- KANETSUNA, F., CARBONELL, L. M.; MORENO, R. E.; RODRIGUEZ, J. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of bacteriology**, v. 97, n. 3, p. 1036-1041, 1969.
- KAUFFMAN, C.A. Sporotrichosis. **Clin Infect Dis**, v. 29, p. 231-7, 1999.
- KELLER, A.; ROUZEAU, J.D.; FARHADIAN, F.; WISNEWSKY, C.; MAROTTE, F.; LAMANDE, N.; SAMUEL, J.L.; SCHWARTZ, K.; LAZAR, M.; LUCAS, M. Differential expression of alpha- and beta-enolase genes during rat heart development and hypertrophy. **Am J Physiol**, v. 269, n. 6, p. 1843–1851, 1995.
- KLIS, F.M.; DE JONG, M.; BRUL, S.; DE GROOT, P.W. Extraction of cell surface-associated proteins from living yeast cells. **Yeast**, v. 24, n. 4, p. 253-8, 2007.
- KONG, X.; XIAO, T.; LIN, J.; WANG, Y. & CHEN, H.D. Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection. **Clinical microbiology and infection**, v. 12, n. 11, p. 1077-1081, 2006.
- KREIS T.; VALE R. Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins. **Oxford**: Oxford University Press, 1993.
- KUBITSCHKE-BARREIRA, P.H.; CURTY, N.; NEVES, G.W.; GIL, C.; LOPES-BEZERRA, L.M. Differential proteomic analysis of *Aspergillus fumigatus* morphotypes reveals putative drug targets. **Journal of proteomics**, v. 78, p. 522-534, 2013.
- LA HOZ R.M.; BADDLEY J.W. Subcutaneous fungal infections. **Curr Infect Dis Rep**, v. 14, p. 530–9, 2012.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LATGÉ, J. P. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. **Molecular microbiology**, v. 66, n. 2, p. 279-290, 2007.

LI, WQ.; HU, XC.; ZHANG, X.; GE, Y.; ZHAO, S.; HU, Y.; ASHMAN, R.B. Immunisation with the glycolytic enzyme enolase confers effective protection against *Candida albicans* infection in mice. **Vaccine**, v. 29, n. 33, p. 5526-33, 2011.

LIMA O.C.; FIGUEIREDO C.C.; PEREIRA B.A.; COELHO M.G.; MORANDI V.; LOPES-BEZERRA L.M. Adhesion of the human pathogen *Sporothrix schenckii* to several extracellular matrix proteins. **Braz J Med Biol Res**, v. 32, n. 5, p. 651-7, 1999.

LIMA O.C.; FIGUEIREDO C.C.; PREVIATO J.O.; MENDONÇA-PREVIATO L.; MORANDI V.; LOPES BEZERRA L.M. Involvement of fungal cell wall components in adhesion of *Sporothrix schenckii* to human fibronectin. **Infect Immun**. v. 69, n. 11, p. 6874-80, 2001.

LLORET, A.; HARTMANN, K.; PENNISI, M.G.; FERRER, L.; ADDIE, D.; BELÁK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; HOSIE, M.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; MÖSTL, K.; RADFORD, A.D.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M.C. Sporotrichosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. **J. Feline Med.Surg**, v. 15, n. 7, p. 619–623, 2013.

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

LÓPEZ-ROMERO, E.; DEL ROCÍO REYES-MONTES, M.; PÉREZ-TORRES, A.; RUIZ-BACA, E.; VILLAGÓMEZ-CASTRO, J.C.; MORA-MONTES, H.M.; FLORES-CARREÓN, A.; TORIELLO, C. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. **Future Microbiol**, v. 6, n. 1, p. 85–102, 2011.

LUTZ A.; SPLENDORE A . On a mycosis observed in men and mice: Contribution to the knowledge of the so-called sporotrichosis. **Revista Médica de São Paulo**, v. 21, p. 443–450, 1907.

LYON, G.M.; ZURITA, S.; CASQUERO, J. *et al.* Population-based surveillance and a case-control study of risk factors for endemic lymphocutaneous sporotrichosis in Peru. **Clin Infect Dis**, v. 36, n. 1, p. 34–39, 2003.

MADRID, I.M.; XAVIER, M.O.; MATTEI, A.S.; CARAPETO, L.P.; ANTUNES, T.D.Á.; SANTOS JÚNIOR, R.; MEIRELES, M.C.A. Esporotricose óssea e cutânea em canino, 2007.

MAHAJAN V.K.; MEHTA K.S.; CHAUHAN P.S.; GUPTA M.; SHARMA R.; RAWAT R. Fixed cutaneous sporotrichosis treated with topical amphotericin B in a nimmune suppressed patient. **Med Mycol CaseRep**, v. 7, p. 23-5, 2015.

MAIA D.C.G.; SASSÁ M.F.; PLACERES M.C.P. of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia** v. 161, p. 11–19, 2006.

MARCOS, C.M.; DA SILVA, J.D.F.; DE OLIVEIRA, H.C.; ASSATO, P.A.; SINGULANI, J.D.L.; LOPEZ, A.M.; FUSCO-ALMEIDA, A.M. Decreased expression of 14-3-3 in *Paracoccidioides brasiliensis* confirms its involvement in fungal pathogenesis. **Virulence**, v. 7, n. 2, p. 72-84, 2016.

MARCOS, C.M.; OLIVEIRA, H.C.D.; DA SILVA, J.D.F.; ASSATO, P.A.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; MENDES-GIANNINI, M.J. The multifaceted roles of metabolic enzymes in the *Paracoccidioides* species complex. **Frontiers in microbiology**, v. 5, 719, 2014.

MARIMON R.; GENÉ J.; CANO J. *et al.* Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 9, p. 3251–3256, 2006.

MARIMON R.; GENÉ J.; CANO J. *et al.* *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. **Med Mycol**, v. 46, n. 6, p. 621–625, 2008.

MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; SUTTON, D.A.; KAWASAKI, M.; GUARRO, J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 10, p. 3198-206, 2007.

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.

MCGWIRE B.S.; O'CONNELL W.A. *et al.* Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis: implications for parasite virulence. **J Biol Chem**, v. 277, n. 11, p. 8802-8809, 2002.

MCCMAHON, J. P.; WHEAT, J.; SOBEL, M. E.; PASULA, R.I.; DOWNING, J. F.; MARTIN 2ND, W. J. Murine laminin binds to *Histoplasma capsulatum*. A possible mechanism of dissemination. **Journal of Clinical Investigation**, v. 96, n. 2, p. 1010, 1995.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; ANDREOTTI, P. F.; VINCENZI, L. R.; DA SILVA, J. L. M.; LENZI, H. L.; BENARD, G.; SOARES, C. P. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes and infection**, v. 8, n. 6, p. 1550-1559, 2006.

MENDES-GIANNINI, M.J.S.; TAYLOR, M.L.; BOUCHARA, J.B.; BURGER, E.; CALICH, V.L.G.; ESCALANTE, E.D.; DA SILVA, J.M. Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. **Medical Mycology**, v. 38, n. Supplement 1, p. 113-123, 2000.

MENDES-GIANNINI, M.J.; HANNA, S.A.; DA SILVA, J.L.; ANDREOTTI, P.F.; VINCENZI, L.R.; BENARD, G. *et al.* Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. **Microbes. Infect**, v. 6, p. 882–891, 2004.

MENDOZA, M.; BRITO, A.; SCHAPER, D.A.; SPOONER, V.A.; ALVARADO, P.; CASTRO, A.; & FERNÁNDEZ, A. Evaluación de la técnica PCR anidada para el diagnóstico de la esporotricosis experimental. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 29, n. 3, p. 120-125, 2012.

MESSIAS A.R.; DE HOOG S.; CAMARGO Z.P. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Med Mycol**, v. 51, n. 4, p. 405–12, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO. Gerência de Doenças Transmitidas por Vetores e Zoonoses. **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. Gerência de Doenças Transmitidas por Vetores e Zoonoses. **Boletim Epidemiológico 007/2016**. Situação Epidemiológica da Esporotricose 2015/2016. Rio de Janeiro, 11 de outubro de 2016.

MOHRI, H. Fibronectin-binding proteins of gram-positive cocci. **J Investig Med.**, v. 44, n. 8, p. 429-441, 1996.

MONDON, P.; DE CHAMPS, C.; DONADILLE, A.; AMBROISE-THOMAS, P.; GRILLOT, R. Variation in virulence of *Aspergillus fumigatus* strains in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. **Journal of medical microbiology**, v. 45, n. 3, p. 186-191, 1996.

MORAGUES, M.D.; OMAETXEBARRIA, M.J.; ELGUEZABAL, N.; SEVILLA, M.J.; CONTI, S.; POLONELLI, L. *et al.* A monoclonal antibody directed against a *Candida albicans* cell wall mannoprotein exerts three anti-*C. albicans* activities. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 5273–5279, 2003.

MOREIRA, J.A.; FREITAS, D.F.; LAMAS, C.C. The impact of sporotrichosis in HIV-infected patients: a systematic review. **Infection**, v. 43, n. 3, p. 267-276, 2015.

NASCIMENTO, R.C.; ALMEIDA, S.R. Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis. **FEMS Immunol. and Med. Microbiol.**, v. 43, p. 241-247, 2005.

NASCIMENTO, R.C.; ESPINDOLA, N.M.; CASTRO, R.A.; TEIXEIRA, P.A.; LOUREIRO Y PENHA, C.V.; LOPES-BEZERRA, L.M.; ALMEIDA, S.R. Passive immunization with monoclonal antibody against a 70-kDa putative adhesin of *Sporothrix schenckii* induces protection in murine sporotrichosis. **European journal of immunology**, v. 38, n. 11, p. 3080-3089, 2008.

NEGRINI T.C.; FERREIRA L.S.; ALEGRANCI P.; ARTHUR R.A.; SUNDFELD P.P.; MAIA D.C.; SPOLIDORIO L.C.; CARLOS I.Z. Role of TLR-2 and fungal surface antigens on innate immune response against *Sporothrix schenckii*. **Immunol Invest**, v. 42, p. 36-48, 2013.

NEGRINI T.C.; FERREIRA L.S.; ALEGRANCI P.; PLACERES, M.C.P.; SPOLIDORIO L.C.; CARLOS I.Z. Influence of TLR-2 in the immune response in the infection induced by fungus *Sporothrix schenckii*. **Immunol Invest**, v. 43, n. 4, p. 370-390, 2014.

NEOPHYTOU, P.I.; OZEGBE, P.; HEALEY, D.; QUARTEY-PAPAFIO, R.; COOKE, A.; HUTTON J.C. Development of a procedure for the direct cloning of T-cell epitopes using bacterial expression systems. **J Immunol Methods**, v. 196, n. 1, p. 63–72, 1996.

NICOLA, A.M.; CASADEVALL, A.; GOLDMAN, D.L. Fungal killing by mammalian phagocytic cells. **Current opinion in microbiology**, v. 11, n. 4, p. 313-317, 2008.

NICOT, J.; MARIAT, F. Morphological characteristics and systematic position of *Sporothrix schenckii*, the causative agent of human sporotrichosis. **Mycopathol Mycol**, v. 49, n. 1, p. 53-65, 1973.

NOBELI, I.; FAVIA, A.D.; WOOL, I.G. Extraribosomal functions of ribosomal proteins. **Trends Biochem**, v. 21, p. 164–165, 1996.

NOBRE, M.O.; CASTRO, A.P.; CAETANO, D.; SOUZA, L.L.; MEIRELES, M.C.A.; FERREIRO, L. Recurrence of sporotrichosis in cats with zoonotic involvement. **Rev Iberoam Micol**, v. 18, p. 137-40, 2001.

NOGUEIRA, S.V.; FONSECA, F.L.; RODRIGUES, M.L.; MUNDODI, V.; ABI-CHACRA, E.A.; WINTERS, M.S.; DE ALMEIDA SOARES, C.M. *Paracoccidioides brasiliensis* enolase is a surface protein that binds plasminogen and mediates interaction of yeast forms with host cells. **Infection and immunity**, v. 78, n. 9, p. 4040-4050, 2010.

NORIEGA, C.T.; GARAY, R.R.; SABANERO, G.; BASURTO, R.T.; SABANERO-LOPEZ, M. *Sporothrix schenckii*: cultures in different soils. **Rev Latinoam Micol**, v. 35, p. 191–194, 1993.

- NOSANCHUK, J.D.; CASADEVALL, A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. **Antimicrob. Agents Chemother.** 50:3519–3528, 2006.
- NUSBAUM, B.P.; NITA GULBAS, N.; HORWITZ, N. Sporotrichosis acquired from a cat. **J Am Acad Dermatol**, v. 8, n. 3, p. 386–391, 1983.
- ODA, L.M.; KUBELKA, C.F.; ALVIANO, C.S.; & TRAVASSOS, L.R. Ingestion of yeast forms of *Sporothrix schenckii* by mouse peritoneal macrophages. **Infection and immunity**, v. 39, n. 2, p. 497-504, 1983.
- OEHMCKE, S.; PODBIELSKI, A.; KREIKEMEYER, B. Function of the fibronectin-binding serum opacity factor of *Streptococcus pyogenes* in adherence to epithelial cells. **Infect Immun.** v. 72, p. 4302–4308, 2004.
- OLIVEIRA, M.M.; ALMEIDA-PAES, R.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. Molecular identification of the *Sporothrix schenckii* complex. **Rev Iberoam Micol**, v. 31, n. 1, p. 2-6, 2014.
- PAISLEY D.; ROBSON G.D.; DENNING D.W. Correlation between in vitro growth rate and in vivo virulence in *Aspergillus fumigatus*. **Med. Mycol**, v. 43, p. 397–401, 2005.
- PAIXÃO, A.G.; GALHARDO, M.C.G.; ALMEIDA-PAES, R.; NUNES, E.P.; GONÇALVES, M.L.C.; CHEQUER, G.L.; DA CRUZ LAMAS, C. The difficult management of disseminated *Sporothrix brasiliensis* in a patient with advanced AIDS. **AIDS research and therapy**, v. 12, n. 1, p. 16, 2015.
- PAL-BHOWMICK, I.; MEHTA, M.; COPPENS, I.; SHARMA, S.; JARORI, G. K. Protective properties and surface localization of *Plasmodium falciparum* enolase. **Infection and immunity**, v. 75, n. 11, p. 5500-5508, 2007a.
- PAL-BHOWMICK, I.; VORA, H.K.; JARORI, G.K. Sub-cellular localization and post-translational modifications of the *Plasmodium yoelii* enolase suggest moonlighting functions. **Malaria journal**, v. 6, n. 1, p. 1, 2007b.
- PANCHOLI, V.; FISCHETTI, V.A. Identification of an endogenous membrane anchor-cleaving enzyme for group A streptococcal M protein. Its implication for the attachment of surface proteins in gram-positive bacteria. **Journal of Experimental Medicine**, v. 170, n. 6, p. 2119-2133, 1989.
- PANCHOLI, V. Multifunctional α -enolase: Its role in diseases. **Cell. Mol. Life Sci**, v. 58, p. 902–920, 2001.
- PEREIRA L.A.; BAO S.N. et al. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. **FEMS Yeast Res**, v. 7, n. 8, p. 1381-1388, 2007.
- PEREIRA, S.A.; GREMIÃO, I.D.; KITADA, A.A.; BOECHAT, J.S.; VIANA, P.G.; SCHUBACH, T.M. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 47, n. 3, p. 392-3, 2014.
- PIATIGORSKY, J. Gene Sharing and Evolution. Cambridge, MA: **Harvard University Press**, 2007.
- PITARCH, A.; ABIAN, J.; CARRASCAL, M.; SANCHEZ, M.; NOMBELA, C.; GIL, C. Proteomics-based identification of novel *Candida albicans* antigens for diagnosis of systemic candidiasis in patients with underlying hematological malignancies. **Proteomics**, v. 4, n. 10, p. 3084–106, 2004.

PILLAI, S.; ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. Imunologia celular e molecular. **Elsevier Brasil**, 2015.

PLOW, E. F.; HERREN, T.; REDLITZ, A.; MILES, L.A.; HOOVER-PLOW, J. L. The cell biology of the plasminogen system. **The FASEB Journal**, v. 9, n. 10, p. 939-945, 1995.

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

PORTUONDO D.L.; SOUZA F.L.; URBACZEK A.C.; BATISTA-DUHARTE A.; CARLOS I.Z. Adjuvants and delivery systems for antifungal vaccines: current state and future developments. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 69-89, 2015.

PORTUONDO, D.L.; BATISTA-DUHARTE, A.; CARLOS, I.Z. Identificação e síntese de peptídeos imunogênicos da enolase de *Sporothrix schenckii* como candidatos vacinais na esporotricose. Projeto de pesquisa de Pós-Doutorado no Brasil apoiado pela FAPESP, processo 15/09340-4, em andamento, 2016b.

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

RAMIAH, K.; VAN REENEN, C.A.; DICKS, L.M.T. Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*. **Research in microbiology**, v. 159, n. 6, p. 470-475, 2008.

RAMOS-E-SILVA, M.; LIMA, C.M.; SCHECHTMAN, R.C.; TROPE, B.M., CARNEIRO, S. Systemic mycoses in immunodepressed patients (AIDS). **Clin. Dermatol**, v. 30, p. 616–627, 2012.

RAMOS-E-SILVA, M.; VASCONCELOS, C.; CARNEIRO, S.; CESTARI, T. Sporotrichosis. **Clin. Dermatol**, v. 25, p. 181-187, 2007.

RESTREPO A.; JIMÉNEZ B. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. **J Clin Microbiol**, v. 12, n. 2, p. 279–82, 1980.

RICHARDS, J.O.; KARKI, S.; LAZAR, G.A.; CHEN, H.; DANG, W.; DESJARLAIS, J.R. Optimization of antibody binding to FcγRIIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. **Mol. Cancer Ther**, v. 7, n. 8, p. 2517–2527, 2008.

RIVERA, J.; ZARAGOZA, O.; AND CASADEVALL, A. Antibody-mediated protection against *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection is dependent on B cells. **Infect. Immun.** v. 73, n. 2, p. 1141–1150, 2005.

ROCHA, M.M.; DASSIN, T.; LIRA, R.; LIMA, E L.; SEVERO, L.C.; LONDERO, A.T. Sporotrichosis in patient with AIDS: report of a case and review. **Ver. Iberoam.Micol**, v. 18, n. 3, p. 133–136, 2001.

RODRIGUES A.M.; DE HOOG G.S.; CAMARGO Z.P. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. **Emerg Microbes Infect** v. 3, n. 5, p. e32, 2014.

RODRIGUES, A.M.; DE HOOG, S.; DE CAMARGO, Z.P. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Med Mycol**, v. 51, n. 4, p. 405-12, 2013a.

RODRIGUES, A.M.; KUBITSCHKE-BARREIRA, P.H.; FERNANDES, G.F.; DE ALMEIDA, S.R.; LOPES-BEZERRA, L.M.; DE CAMARGO, Z.P. Immunoproteomic analysis reveals a convergent humoral response signature in the *Sporothrix schenckii* complex. **Journal of proteomics**, v. 115, p. 8-22, 2015.

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

ROMEO, O. & CRISEO, G. What lies beyond genetic diversity in *Sporothrix schenckii* species complex? New insights into virulence profiles, immunogenicity and protein secretion in *S. schenckii sensu stricto* isolates. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 203-6, 2013.

ROMERO-CABELLO, R. *et al.* Disseminated sporotrichosis. **BMJ case reports**, v. 2011, p. bcr1020103404, 2011.

ROP O.; MLCEK J.; JURIKOVA T. Beta-glucans in higher fungi and their health effects. **Nutr Rev**, v. 67, n. 11, p. 624-31, 2009.

ROSAS A.L.; CASADEVALL A. Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. **FEMS Microbiol Lett**, v. 153, n. 2, p. 265–272, 1997.

ROSAS, A.L.; CASADEVALL, A. Melanization decreases the susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to enzymatic degradation. **Mycopathologia**, v. 151, n. 2, p. 53–56, 2001.

ROSSI, C.N.; ODAGUIRI, J.; LARSSON, C.E. Clinical and epidemiological characterization of sporotrichosis in dogs and cats (São Paulo, Brazil). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, suplemento 2, p. 3889-3896, 2013.

ROTH E.F; CALVIN M.C.; MAX-AUDIT I.; ROSA J.; ROSA R. The enzymes of the glycolytic pathway in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* malaria parasites. **Blood**, v. 72, n. 6, p. 1922-1925, 1998.

RUIZ-BACA, E.; CUÉLLAR-CRUZ, M.; LÓPEZ-ROMERO, E.; REYES-MONTES, M.R.; TORIELLO, C. Fungal cell wall antigens for diagnosis of invasive fungal infections. **In: Fungal cell wall**. New York: Nova Science Publishers Inc.in press, 2013.

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

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

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

SAMPAIO, S.A.P.; LACAZ, C.S.; ALMEIDA, F. Clinical aspects of sporotrichosis in Sao Paulo—analysis of 235 cases. **Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo**, v. 9, p. 391–402, 1954.

SANCHOTENE, K.O.; MADRID, I.M.; KLAFKE, G.B.; BERGAMASHI, M.; TERRA, P.P.D.; RODRIGUES, A.M.; XAVIER, M.O. *Sporothrix brasiliensis* outbreaks and the rapid emergence of feline sporotrichosis. **Mycoses**, v. 58, n. 11, p. 652–658, 2015.

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

SCHAUMBURG J.; DIEKMANN O.; HAGENDORFF P.; BERGMANN S.; ROHDE M.; HAMMERSCHMIDT S.; JAˆNSCH L.; WEHLAND J.; KÄRST U. The cell wall subproteome of *Listeria monocytogenes*. **Proteomics**, v. 4, n. 10, p. 2991–3006, 2004.

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

SCHERAGA, H.A.; LASKOWSKI, M. The fibrinogen-fibrin conversion. **Advances in protein chemistry**, v. 12, p. 1–131, 1957.

SCHUBACH, A.; BARROS, M.B.; WANKE, B. Epidemic sporotrichosis. **Current Opinions in Infectious Diseases**, v. 21, p. 129–133, 2008.

SCHUBACH, T.M.; SCHUBACH, A.; OKAMOTO, T.; BARROS, M.B.; FIGUEIREDO, F.B.; CUZZI, T.; WANKE, B. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998–2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, n. 10, p. 1623–1629, 2004.

SCHUBACH, T.M.P.; SCHUBACH, A.O.; OKAMOTO, T.; BARROS, M.B.L.; FIGUEIREDO, F.B.; CUZZI, T. *et al.* Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998–2003). **Med Mycol**, v. 44, p. 87–92, 2006.

SCHWARTZ, I.S.; KENYON, C.; THOMPSON, G. R. Endemic Mycoses: What’s New About Old Diseases?. **Current Clinical Microbiology Reports**, v. 3, n. 2, p. 71–80, 2016.

SCHWARZ-LINEK, U.; HÖÖK, M.; POTTS, J.R. Fibronectin-binding proteins of gram-positive cocci. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 8, p. 2291–2298, 2006.

SCOTT, E.N.; MUCHMORE, H.G. Immunoblot analysis of antibody responses to *Sporothrix schenckii*. **J ClinMicrobiol**, v. 27, p. 300–304, 1989.

SHIMONAKA, H.; NOGUCHI, T.; KAWAI, K.; KASEGAWA, I.; NOZAWA, Y.; ITO, Y. Immunochemical studies on the human pathogen *Sporothrix schenckii*: effects of chemical and enzymatic modification of the antigenic compounds upon immediate and delayed reactions. **Infect. Immun**, v. 11, n. 6, p. 1187–1194, 1975.

SHIRAISHI A.; NAKAGAKI K.; ARAI T. Role of cell-mediated immunity in the resistance to experimental sporotrichosis in mice. **Mycopathologia**, v. 120, p. 15–21, 1992.

SILVA R.C.; PADOVAN A.C.; PIMENTA D.C.; FERREIRA R.C.; DA SILVA C.V.; BRIONES M.R. Extracellular enolase of *Candida albicans* is involved in colonization of mammalian intestinal epithelium. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 3, p. 4:66, 2014.

SILVA, E.A.; BERNARDI, F.; MENDES, M.C.N.C, PARANHOS, N.T, SCHOENDORFER, L.M.P., GARCIA, N.O., MONTENEGRO, H., DIAS, M.A.G., FANTINI, D.A., CARDOSO, V.A.

Sporotrichosis outbreak in domestic cats – surveillance and control actions, São Paulo City. **BEPA**, v. 12, n. 133, p. 1-16, 2015.

SILVA, M.B.T., COSTA, M.M.M., TORRES, C.C.S., GALHARDO, M.C.G., VALLE, A.C.F., MAGALHÃES, M.A., SABROZA, P.C., OLIVEIRA, R.M. Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 10, p. 1867-1880, 2012.

SILVA-VERGARA, M.L., CAMARGO, Z.P., SILVA, P.F. *et al.* Disseminated *Sporothrix brasiliensis* infection with endocardial and ocular involvement in an HIV-infected patient. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, p. 477–480, 2012.

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

SONG, Y.; ZHONG, S. X.; YAO, L.; CAI, Q.; ZHOU, J. F.; LIU, Y.Y. *et al.* Efficacy and safety of itraconazole pulses vs. continuous regimen in cutaneous sporotrichosis. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol**, v. 25, n. 3, p. 302–305, 2011.

STEENBERGEN, J.N.; NOSANCHUK, J.D.; MALLIARIS, S.D.; CASADEVALL, A. Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. **Infect.Immun.** v. 72, n. 6, p. 3478–3488, 2004.

STIE, J.; BRUNI, G.; FOX, D. Surface-associated plasminogen binding of *Cryptococcus neoformans* promotes extracellular matrix invasion. **PloS one**, v. 4, n. 6, p. e5780, 2009.

SULLIVAN, D.J.; MORAN, G.P.; PINJON, E.; AL-MOSAID, A.; STOKES, C.; VAUGHAN, C.; COLEMAN, D.C. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. **FEMS yeast research**, v. 4, n. 4-5, p. 369-376, 2004.

SUNDSTROM, P. Adhesion in *Candida spp.* **Cell Microbiol**, v. 4, n. 8, p. 461-469, 2002.

TABORDA, C.P.; DA SILVA, M.B.; NOSANCHUK, J.D.; TRAVASSOS, L.R. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4, p. 331–339, 2008.

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

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

TEIXEIRA P.A.C.; DE CASTRO R.A.; FERREIRA F.R.L.; CUNHA M.M.L.; TORRES A.P.; PENHA C.V.L.Y. *et al.* L-DOPA accessibility in culture medium increases melanin expression and virulence of *Sporothrix schenckii* yeast cells. **Med Mycol**, v. 48, n. 5, p. 687–95, 2010.

TEIXEIRA, M.M.; DE ALMEIDA, L.G.; KUBITSCHKE-BARREIRA, P.; ALVES, F.L.; KIOSHIMA, É.S.; ABADIO, A.K.; CUNHA, M.M. Comparative genomics of the major fungal agents of human and animal Sporotrichosis: *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 943, 2014.

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

TÉLLEZ, M.D.; BATISTA-DUHARTE, A.; PORTUONDO, D.; QUINELLO, C.; BONNE-HERNÁNDEZ, R.; CARLOS, I.Z. *Sporothrix schenckii* complex biology: environment and fungal pathogenicity. **Microbiology**, v. 160, n. 11, p. 2352-65, 2014.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. Atheneu, 2014.

TRAVASSOS, L.R.; LLOYD, K.O. *Sporothrix schenckii* and related species of Ceratocystis. **Microbiol Rev.**, v. 44, p. 683–721, 1980.

TRAVASSOS, L.R.; DE SOUSA, W.; MENDONÇA, A-PREVIATO, L. & LLOYD, K.O. Location and biochemical nature of surface components reacting with concanavalin A in different cell types of *Sporothrix schenckii*. **Exp Mycol**, v. 1, n. 4, p. 293–305, 1977.

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J.D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrob. Agents. Chemother**, v. 46, n. 11, p. 3394–3400, 2002.

VANEGAS, G.; QUIÑONES, W.; CARRASCO-LÓPEZ, C.; CONCEPCIÓN, J. L.; ALBERICIO, F.; & AVILÁN, L. Enolase as a plasminogen binding protein in *Leishmania mexicana*. **Parasitology research**, v. 101, n. 6, p. 1511-1516, 2007.

VERSTREPEN, K.J.; KLIS, F.M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. **Mol. Microbiol**, v. 60, n. 1, p. 5–15, 2006.

VICENTINI, A.P.; GESZTESI, J.L.; FRANCO, M.F.; DE SOUZA, W.; DE MORAES, J.Z.; TRAVASSOS, L.R.; LOPES, J.D. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 4, p. 1465-1469, 1994.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 60, n. 10, p. 3864–3866. 32, 1994a.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. **Infect. Immun**, v. 62, n. 7, p. 3004–3007, 1994b.

WELLINGTON M.; DOLAN K.; HAIDARIS C.G. Monocyte responses to *Candida albicans* are enhanced by antibody in cooperation with antibody-independent pathogen recognition. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 51, n. 1, p. 70-83, 2007.

WIZEMANN, T.M.; ADAMOU, J.E.; LANGERMANN, S. Adhesins as targets for vaccine development. **Emerging infectious diseases**, v. 5, n. 3, p. 395, 1999.

YAGNIK, K. J.; SKELTON, W. P.; OLSON, A.; TRILLO, C. A.; LASCANO, J. A rare case of disseminated *Sporothrix schenckii* with bone marrow involvement in a patient with idiopathic CD4 lymphocytopenia. **IDCases**, v. 9, p. 70-72, 2017.

YAMADA, K. Adhesive recognition sequences. **J. Biol. Chem.**; v. 266, p. 12809-12812, 1991.

YAMADA, K.M.; PANKOV, R.; CUKIERMAN, E. Dimensions and dynamics in integrin function. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, p. 959-966, 2003.

YU X.; WAN Z.; ZHANG Z. et al. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates of clinical origin in Northeast China. **Mycopathologia**, v. 176, p. 67–74, 2013.

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

ZHOU, X.; RODRIGUES, A. M.; FENG, P.; DE HOOG, G. S. Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Fungal Diversity**, v. 66, n. 1, p. 153-165, 2014.