

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

Jennifer Lacerda da Silva

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Profa. Dra. Karen Spadari Ferreira

Estudo da ativação e modulação da resposta imune contra a esporotricose experimental, a partir de vesículas extracelulares purificadas de células dendríticas

São Paulo  
2024

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

Estudo da ativação e modulação da resposta imune contra a esporotricose experimental, a partir de vesículas extracelulares purificadas de células dendríticas

Jennifer Lacerda da Silva

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do título de Mestre apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Área de Concentração: Fisiopatologia.

Orientadora: Profa. Dra. Karen Spadari Ferreira.

SÃO PAULO

2024

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

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

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

D586e Da Silva, Jenniffer  
Estudo da ativação e modulação da resposta imune contra a esporotricose experimental, a partir de vesículas extracelulares purificadas de células dendríticas. / Jenniffer Da Silva. - São Paulo, 2024.  
87 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.  
Orientador: Ferreira, Karen

1. esporotricose. 2. células dendríticas. 3. vesículas extracelulares. 4. resposta imune. 5. Sporothrix brasiliensis. I. T. II. Ferreira, Karen, orientador.

Jennifer Lacerda da Silva

Estudo da ativação e modulação da resposta imune contra a esporotricose experimental, a partir de vesículas extracelulares purificadas de células dendríticas.

Dissertação para obtenção do Título de Mestre.

Comissão Julgadora

Profa. Dra. Karen Spadari Ferreira  
orientador/presidente

---

1o. examinador

---

2o. examinador

---

3o. examinador

---

4o. examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2024.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Karen, que sempre esteve disponível para tirar quaisquer dúvidas e me direcionar com todo seu conhecimento, e principalmente fazer isso de maneira tão fluida, amistosa e receptiva, o que claramente contribuiu ao longo do trabalho, e ao Prof. Sandro, que também sempre esteve disposto a nos ajudar.

À minha família Amilton, Penha, Emily e Nicolly, que desde sempre estiveram presentes me dando todo o suporte necessário em todas as minhas decisões, e ao meu companheiro Lucas, que me ouviu em todos os momentos de intercorrências, indecisões e claro, nas vitórias.

Aos meus colegas de laboratório e a técnica Renata, que sempre se mostraram dispostos a me ajudar, sem eles com certeza teria sido muito mais difícil conciliar a pesquisa com o meu trabalho, e ao meu colega Marcelo, que sempre contribuiu e me passou suas experiências.

Aos animais de experimentação, que todos os dias são utilizados, contribuindo com os questionamentos e avanços científicos, no que diz respeito a saúde e outros aspectos humanos e de outras espécies.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Micologia Clínica, no departamento de Fisiologia e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e contou com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo 2021/03672-6). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

SILVA, J. L. **Estudo da ativação e modulação da resposta imune contra a esporotricose experimental, a partir de vesículas extracelulares purificadas de células dendríticas.** 2024. 87f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

A esporotricose é uma zoonose micótica emergente e subcutânea, que afeta a pele, o sistema linfático e outros órgãos de humanos e animais. Assim como outras doenças infecciosas fúngicas, se torna ainda mais grave quando acomete pacientes imunossuprimidos. Essa infecção possui distribuição global e é endêmica em algumas regiões do Brasil e de outros países tropicais e subtropicais, sendo um problema de saúde pública importante em nosso país. A doença é causada por um complexo de pelo menos quatro espécies patogênicas, incluindo o *Sporothrix brasiliensis* (*S. brasiliensis*). A resposta imunológica contra estas espécies ainda não é completamente elucidada, mas estruturas como as vesículas extracelulares (VEs) poderiam transportar componentes importantes que podem contribuir na modulação e no controle desta importante infecção. Assim, o objetivo deste trabalho, é analisar a participação das VEs de células dendríticas (DCs) naive e VEs de DCs previamente primadas com leveduras de *S. brasiliensis* e primadas com VEs do fungo, na resposta imune contra a esporotricose experimental em modelos murinos. Para isso, as DCs obtidas da medula óssea de camundongos, foram cultivadas com leveduras de *S. brasiliensis* ou com VEs do fungo e posteriormente, VEs totais das DCs foram purificadas a partir de ultracentrifugação e analisadas quanto a sua participação na modulação da resposta imunológica. Essas VEs foram utilizadas em protocolo profilático em modelos murinos, previamente a infecção subcutânea experimental. Foi observado o diâmetro médio das lesões no decorrer de 35 dias de infecção e a carga fúngica da lesão na pele. Os resultados obtidos mostram que as VEs de DCs naive, e VEs de DCs previamente cultivadas com leveduras do fungo ou com VEs fúngicas, são capazes de modular a carga fúngica. Os grupos que receberam VEs de DCs de forma profilática, de modo geral apresentaram diminuição significativa da carga fúngica em relação ao grupo controle. Na análise comparativa apenas dos grupos que receberam a profilaxia, observa-se que o uso de VEs de DCs naive, resultam em uma carga fúngica maior que o uso de VEs de DCs previamente ativadas, e quando as

DCs são ativadas com levedura, essa carga fúngica é a menor. Quando analisamos o perfil de citocinas na pele de camundongos tratados com as VEs previamente a infecção, observamos aumento de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 e IL-10 principalmente nos animais previamente tratados com VEs de DCs que foram ativadas com leveduras. Em relação às citocinas produzidas, podemos sugerir até o momento, uma resposta imunológica mista, mas que de alguma maneira, ainda não esclarecida, devem contribuir para melhor controle do processo infeccioso *in vivo*. Em relação a linfoproliferação, observa-se principalmente um aumento de linfócitos T CD4+ quando acrescentamos VEs de DCs que não foram previamente ativadas, mostrando uma ação de uma resposta mais inespecífica. Vale ressaltar que todos os protocolos profiláticos foram capazes de modular e minimizar o crescimento fúngico, quando comparados ao controle, ou seja, as VEs contribuíram com o controle da infecção e agiram a favor do hospedeiro, demonstrando um caráter protetivo.

Palavras-chave: esporotricose, células dendríticas, vesículas extracelulares, resposta imune, *Sporothrix brasiliensis*.

## ABSTRACT

SILVA, J. L. **Study of the activation and modulation of the immune response against experimental sporotrichosis, using extracellular vesicles purified from dendritic cells.** 2024. 87f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

Sporotrichosis is an emerging subcutaneous mycotic zoonosis that affects the skin, lymphatic system, and other organs of humans and animals, and like other infectious fungal diseases, it becomes even more serious when it affects immunosuppressed patients. This infection has a global distribution and is endemic in some regions of Brazil and other tropicals and subtropicals countries, being an important public health problem in our country. The disease is caused by a complex of at least four pathogenic species, including *Sporothrix brasiliensis* (*S. brasiliensis*). The immunological response against these species has not yet been completely elucidated, but structures such as extracellular vesicles (EVs) could carry important components that can contribute to the modulation and control of this important infection. Thus, the objective of this work is to analyze the participation of EVs from naïve dendritic cells (DCs) and EVs from DCs previously primed with *S. brasiliensis* yeast and primed with EVs from the fungus, in the immune response against experimental sporotrichosis in murine models. For this, DCs obtained from the bone marrow of mice were cultivated with *S. brasiliensis* yeast or EVs from the fungus, and subsequently, total EVs from the DCs were purified through ultracentrifugation and analyzed for their participation in modulating the immune response. These EVs were used in a prophylactic protocol in murine models, before experimental subcutaneous infection. The average diameter of the lesions over 35 days of infection and the fungal load of the lesion on the skin were observed. The results obtained show that EVs from naïve DCs, and EVs from DCs previously cultured with yeast or fungal EVs, are capable of modulating the fungal load. The groups that received EVs from DCs prophylactically generally showed a significant decrease in fungal load compared to the control group. In the comparative analysis of only the groups that received prophylaxis, it was observed that the use of EVs from naïve DCs results in a higher fungal load than the use of EVs from previously activated DCs, and when the DCs are activated with yeast, this load fungal is smaller. When we analyzed the cytokine profile

in the skin of mice treated with EVs before infection, we observed an increase in IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, and IL-10, mainly in animals previously treated with EVs from DCs that were activated with yeast. About the cytokines produced, we can so far suggest a mixed immunological response, but in some way, not yet clear, they should contribute to better control of the infectious process *in vivo*. About lymphoproliferation, an increase in CD4+ T lymphocytes is mainly observed when we add EVs from DCs that were not previously activated, showing a more non-specific response. It is worth highlighting that all prophylactic protocols were able to modulate and minimize fungal growth, when compared to the control, that is, EVs contributed to the control of the infection and acted in favor of the host, demonstrating a protective character.

Keywords: sporotrichosis, dendritic cells, extracellular vesicles, immune response, *Sporothrix brasiliensis*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Disseminação da esporotricose no Brasil.....	20
Figura 2. Morfologia microscópica <i>Sporothrix sp.</i> .....	21
Figura 3. Aspecto morfológico macroscópicos de <i>Sporothrix schenckii</i> e fases micelial leveduriforme. ....	22
Figura 4. Relações filogenéticas entre os membros do clado clínico e ambiental em <i>Sporothrix</i> , com base em sequências de calmodulina. ....	23
Figura 5. Ciclo de transmissão da esporotricose . ....	25
Figura 6. O gato na esporotricose . ....	26
Figura 7. O efeito fundador em <i>Sporothrix brasiliensis</i> . ....	27
Figura 8. Manifestação linfocutânea e cutânea fixa da esporotricose.....	29
Figura 9. Acomentimento pulmonar em esporotricose. ....	30
Figura 10. Lesões em mucosa conjuntival. ....	30
Figura 11. Representação da abordagem One Health para prevenção e controle de esporotricose.....	31
Figura 12. Manifestações clínicas da esporotricose nos felinos.....	32
Figura 13. Achados citológicos e histopatológicos.....	33
Figura 14. Biogênese das vesículas extracelulares.....	41
Figura 15. Citometria de fluxo das células dendríticas.....	54

Figura 16. Análise e dosagem das VEs por Nano tracking analysis (NTA).....	54
Figura 17. Figuras representativas das lesões de pele formada no local de inoculação do fungo. ....	56
Figura 18. Progressão da lesão de pele na infecção no modelo murino.....	58
Figura 19. Análise histológica da lesão de pele de animais .....	58
Figura 20. Resultado da carga fúngica da lesão de pele de modelo murino.....	60
Figura 21. Dosagem de citocinas. ....	61
Figura 22. Caracterização de subpopulações das células coletadas do linfonodo.....	63
Figura 23. Ensaio de linfoproliferação.....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização de células dendríticas, relação de anticorpos e seus respectivos fluoróforos e clones. ....	53
Tabela 2 – Caracterização de células T CD4+ e CD8+, relação de anticorpos e seus respectivos fluoróforos e clones.....	63
Tabela 3 - Número total de proteínas identificadas em cada uma das amostras de vesículas extracelulares analisadas.....	65
Tabela 4 - Top proteínas (abundância maior que 1%) identificadas em amostra de vesículas extracelulares de células dendríticas sem ativação prévia, em ordem decrescente de abundância estimada. ....	66
Tabela 5 - Top proteínas (abundância maior que 1%) identificadas na amostra contendo vesículas extracelulares de células dendríticas que foram previamente ativadas com leveduras de <i>S. brasiliensis</i> , em ordem decrescente de abundância estimada.....	67
Tabela 6 - Top proteínas (abundância maior que 1%) identificadas na amostra contendo vesículas extracelulares de células dendríticas que foram previamente ativadas com vesículas extracelulares de leveduras de <i>S. brasiliensis</i> , em ordem decrescente de abundância estimada.....	67

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1</b>	<b>Esporotricose e seus aspectos históricos .....</b>	<b>18</b>
<b>1.2</b>	<b>Biologia do fungo e características morfológicas.....</b>	<b>20</b>
<b>1.3</b>	<b>Epidemiologia .....</b>	<b>24</b>
<b>1.4</b>	<b>Aspectos clínicos.....</b>	<b>28</b>
1.4.1	Esporotricose em humanos.....	28
1.4.2	Esporotricose em animais.....	30
1.4.3	Métodos Diagnósticos .....	32
1.4.4	Métodos terapêuticos .....	34
1.4.5	Métodos profiláticos .....	35
<b>1.5</b>	<b>Relação parasita e hospedeiro .....</b>	<b>37</b>
1.5.1	Fatores de virulência do fungo .....	37
1.5.2	Resposta imunológica do hospedeiro .....	38
<b>1.6</b>	<b>Vesículas extracelulares .....</b>	<b>40</b>
1.6.1	Vesículas extracelulares de células dendríticas .....	43
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>43</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>Gerais.....</b>	<b>44</b>
<b>3.2</b>	<b>Específicos.....</b>	<b>44</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
<b>4.1</b>	<b>Animais utilizados.....</b>	<b>45</b>
<b>4.2</b>	<b>Fungo e preparo do inóculo .....</b>	<b>45</b>
<b>4.3</b>	<b>Isolamento de vesículas extracelulares de <i>S. brasiliensis</i>.....</b>	<b>45</b>
<b>4.4</b>	<b>Análise das Vesículas extracelulares dos fungos por Nanoparticle Tracking Analysis (NTA).....</b>	<b>46</b>
<b>4.5</b>	<b>Diferenciação e caracterização de células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDC) de camundongos .....</b>	<b>46</b>
<b>4.6</b>	<b>Purificação e caracterização de VEs purificadas de DCs .....</b>	<b>47</b>
<b>4.7</b>	<b>Ensaio de profilaxia, histopatológico e contagem de unidades formadoras de colônia (CFU) .....</b>	<b>48</b>
<b>4.8</b>	<b>Dosagem de citocinas.....</b>	<b>49</b>

<b>4.9</b>	<b>Ensaio de linfoproliferação .....</b>	<b>49</b>
<b>4.10</b>	<b>Análise Proteômica .....</b>	<b>51</b>
4.10.1	Quantificação de Proteínas.....	51
4.10.2	Preparação das amostras para análise proteômica .....	51
4.10.3	Análise por espectrometria de massas avançada .....	52
<b>4.11</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>53</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
<b>5.1</b>	<b>Obtenção e análise das DCs e suas VEs.....</b>	<b>53</b>
<b>5.2</b>	<b>Análise das vesículas extracelulares por Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) .....</b>	<b>54</b>
<b>5.3</b>	<b>Lesões.....</b>	<b>56</b>
<b>5.4</b>	<b>Análise histopatológica.....</b>	<b>58</b>
<b>5.5</b>	<b>Ensaio de profilaxia com vesículas de células dendríticas .....</b>	<b>59</b>
<b>5.6</b>	<b>Análise das citocinas .....</b>	<b>60</b>
<b>5.7</b>	<b>Ensaio de linfoproliferação .....</b>	<b>62</b>
<b>5.8</b>	<b>Proteômica.....</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>72</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>74</b>
	<b>ANEXO .....</b>	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A esporotricose é um processo infeccioso subagudo ou crônico, causado pelo fungo *Sporothrix schenckii*, que pode ser encontrado mundialmente. A infecção geralmente envolve a pele e tecido subcutâneo, e ocorre a partir da inoculação do fungo em acidentes traumáticos, com materiais orgânicos como plantas e solo ou pela inoculação provocada em acidentes com animais. Possui ocorrência principalmente em regiões tropicais e subtropicais, e é considerada a micose subcutânea mais frequente na América Latina (CONTI DIAZ, 1989; QIN; ZHANG, 2019).

Vale ressaltar que a mortalidade e morbidade por infecções fúngicas são altas, e causam grandes prejuízos econômicos, além de serem um enorme problema de saúde pública, como é o caso da esporotricose no Brasil (GOW; NETEA, 2016; OROFINO-COSTA *et al.*, 2017).

A doença é causada por um microrganismo eucarioto, heterotrófico, que vive de forma saprofítica na natureza, se tornando patogênico a partir de sua inoculação traumática, para humanos e outros animais (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999). O desenvolvimento das micoses tem grande variabilidade de acordo com a imunidade do hospedeiro.

Em relação a esporotricose, a infecção pode se tornar sistêmica, grave e ainda mais deletéria quando acomete pacientes em condições imunossupressoras, como pacientes portadores do vírus HIV, com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), doenças neoplásicas, pacientes em quimioterapia, transplantados, além de corticoterapia e antibioticoterapia prolongadas (GOW; NETEA, 2016; MOREIRA; FREITAS; LAMAS, 2015; ROMANI, 2011).

*Sporothrix* compreende um gênero com 53 espécies, das quais *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa* e *S. luriei* causam infecções de pele em humanos e outros mamíferos, sendo a *S. brasiliensis* altamente prevalente entre os felinos domésticos, tendo esses, principal relevância nos casos de zoonoses (PIRES, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2013a).

Acidentes com mordeduras e arranhaduras de animais têm sido consideradas lesões prevalentes e frequentes, e podem levar a infecções graves e fatais (DARVISHI *et al.*, 2022). Dentre as infecções fúngicas, a esporotricose emergiu de forma importante, devido aos múltiplos surtos, as alterações no que diz respeito à distribuição, taxonomia e epidemiologia, assim como as mudanças de estilo de vida e

moradia dos indivíduos, além de suas interações com o ambiente e com os animais (CHAKRABARTI *et al.*, 2014).

Apenas até 2009, haviam sido atendidos aproximadamente 2200 casos humanos, 3244 felinos e 120 caninos (BASTOS DE LIMA BARROS *et al.*, 2010) no Rio de Janeiro. Foi identificada a disseminação da espécie *S. brasiliensis* neste surto (RODRIGUES *et al.*, 2013b).

O boletim epidemiológico da esporotricose 007/2016 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Rio de Janeiro para o período de 2013 a 2016 constatou a notificação de 3.377 casos suspeitos, com um índice de confirmação em torno de 65%. De 2016 a 2018 o estado atingiu 3.545 pacientes diagnosticados com esta infecção fúngica (Boletim Epidemiológico - Ministério da Saúde - RJ, 2018) e no município de Guarulhos (SP) só no ano de 2019, mais de 700 animais foram diagnosticados, sendo 98,5% felinos (1 o Boletim do Departamento de Vigilância em Saúde – Guarulhos, 2019).

O grande número de felinos não domiciliados, sem controle populacional, associado a uma grande ocorrência de casos sem a devida terapia, contribuem para a disseminação da doença. Esses animais errantes vivem em colônias, e possuem comportamentos de disputa, com frequentes mordeduras e arranhaduras entre eles, o que leva a uma alta transmissão do agente entre os animais (CHAVES *et al.*, 2013).

O desenvolvimento e evolução da esporotricose está intrinsicamente ligada a relação do agente com o hospedeiro, e envolve fatores relacionados à virulência do fungo, quantidade de microrganismos inoculados no acidente traumático e a resposta imunológica do hospedeiro (CARLOS *et al.*, 2009).

Diversas pesquisas já demonstraram que há uma maior virulência em cepas da espécie *S. brasiliensis*, seguido pelas espécies *S. schenckii* s. str. e *S. globosa* (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2015; ARRILLAGA-MONCRIEFF *et al.*, 2009; CASTRO *et al.*, 2013; CLAVIJO-GIRALDO *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2013; MONCRIEFF *et al.*, 2010). Estes achados podem ter relação com diversos de fatores de virulência produzidos pelo fungo, que propiciam sua adaptação ao hospedeiro e ao ambiente, como sua capacidade de termo dimorfismo e termotolerância, além da produção e liberação de diversas moléculas (RUIZ-BACA; ALBA-FIERRO; PÉREZ-TORRES, 2015).

Quase todos as células procarióticas e eucarióticas, incluindo os organismos fúngicos se comunicam por meio de diversos mecanismos, como moléculas liberadas extracelularmente, e também, vesículas extracelulares (VEs), que são pequenas

estruturas que variam de 30 à 1.000 nanômetros (nm), envoltas por uma camada bilipídica (YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015). Trabalhos demonstraram que VEs são capazes de ativar e modular o sistema imunológico e possuem um papel importante na patogênese de doenças infecciosas (ROBBINS; MORELLI, 2014).

As VEs liberadas podem interagir com outras células, a partir de endocitose ou fusão com a membrana plasmática da célula alvo, enviando seu conteúdo para o meio intracelular, ou a partir da sua ruptura liberando o conteúdo no meio extracelular (RODRIGUES *et al.*, 2015).

Além das VEs, diversas moléculas do fungo, podem ser consideradas padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) que são reconhecidas por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) de células da imunidade inata, podendo desencadear uma cascata de sinalização que leva à produção de citocinas que modulam e induzem a ativação de outros componentes imunológicos (ERWIG; GOW, 2016).

Dentre os tipos celulares que são capazes de reconhecer os PAMPs, temos as células dendríticas, que são importantes mediadoras da resposta imune contra fungos e a sua interação com moléculas fúngicas são importantes para induzirem a uma resposta imunológica efetora no hospedeiro. Além disso, recentemente, trabalhos científicos vêm demonstrando que as VEs destas células também são importantes na modulação da resposta imunológica (KOWAL; TKACH, 2019; ZITVOGEL *et al.*, 1998).

O papel das células dendríticas na proteção contra a esporotricose ainda não é bem elucidado, porém algumas pesquisas já direcionam sua importância na resposta imune, a partir do envolvimento de receptores e da produção de citocinas no controle ou exacerbação da infecção em modelos experimentais (ROSSATO *et al.*, 2019).

Nosso grupo de pesquisa mostrou que VEs purificadas dos fungos *S. brasiliensis*, não afetam a viabilidade das células dendríticas, e que apesar destas células fagocitarem mais leveduras do fungo depois de cultivadas previamente com as suas VEs, elas não foram capazes de eliminar efetivamente os fungos, não demonstrando atividade fungicida. Porém notou-se que houve uma maior produção de IL-12p40, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , o que poderia estar induzindo uma resposta do tipo Th1 (IKEDA *et al.*, 2018).

É certo que o estudo dos mecanismos que estas células utilizam para apresentar antígenos dos fungos aos linfócitos T, bem como a modulação da resposta

imunológica induzida por suas VEs previamente ativadas com componentes específicos do fungo, poderiam elucidar e auxiliar em futuros ensaios de profilaxia e/ou terapia desta grave infecção fúngica. E há a necessidade urgente de novas pesquisas objetivando o melhor entendimento da relação fungo/ hospedeiro, o desenvolvimento de testes diagnósticos eficientes, novos fármacos e vacinas eficazes.

Infelizmente, os estudos sobre a fisiopatologia das infecções fúngicas ainda estão atrás das pesquisas envolvendo outros patógenos, como agentes bacterianos e parasitários (BROWN *et al.*, 2015). Assim, esse trabalho tem como alvo a busca de novas informações que possibilitem o uso das VEs de células dendríticas, primadas ou não com o fungo, na modulação da resposta imune contra a infecção causada por leveduras de *S. brasiliensis*.

### 1.1 Esporotricose e seus aspectos históricos

O primeiro relato relacionado a esporotricose, ocorreu em 1989, nos Estados Unidos, quando Benjamin R. Schenck isolou um agente fúngico a partir da coleta de secreções de abscessos subcutâneos do membro superior direito de um paciente. As lesões se iniciavam nos dedos, e seguia pelo braço, aparentemente pelo canal linfático, com a ajuda de Erwin F. Smith, sugeriram que o agente pertencia ao gênero *Sporotrichum*, porém sua classificação exata ainda não ficou bem esclarecida.

Posteriormente, em 1900, Hektoen e Perkins relataram um caso semelhante em Chicago e propuseram um novo nome, *Sporothrix schenckii*, embora o nome *Sporotrichum schenckii* fosse usado por muito tempo (HEKTOEN; PERKINS, 1900).

Assim, chega-se a um agente fúngico constituinte da divisão Ascomycota, da classe Pyrenomycetes, ordem Ophiostomatales e família Ophiostomataceae (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999).

No Brasil, em 1907, Adolpho Lutz e Afonso Splendore, fizeram um magnífico trabalho descrevendo a doença em humanos e ratos, onde relataram desde as características das lesões, os protocolos experimentais realizados, as características macroscópicas das colônias quando cultivadas, e até a morfologia microscópica do fungo (LUTZ; SPLENDORE, 1907).

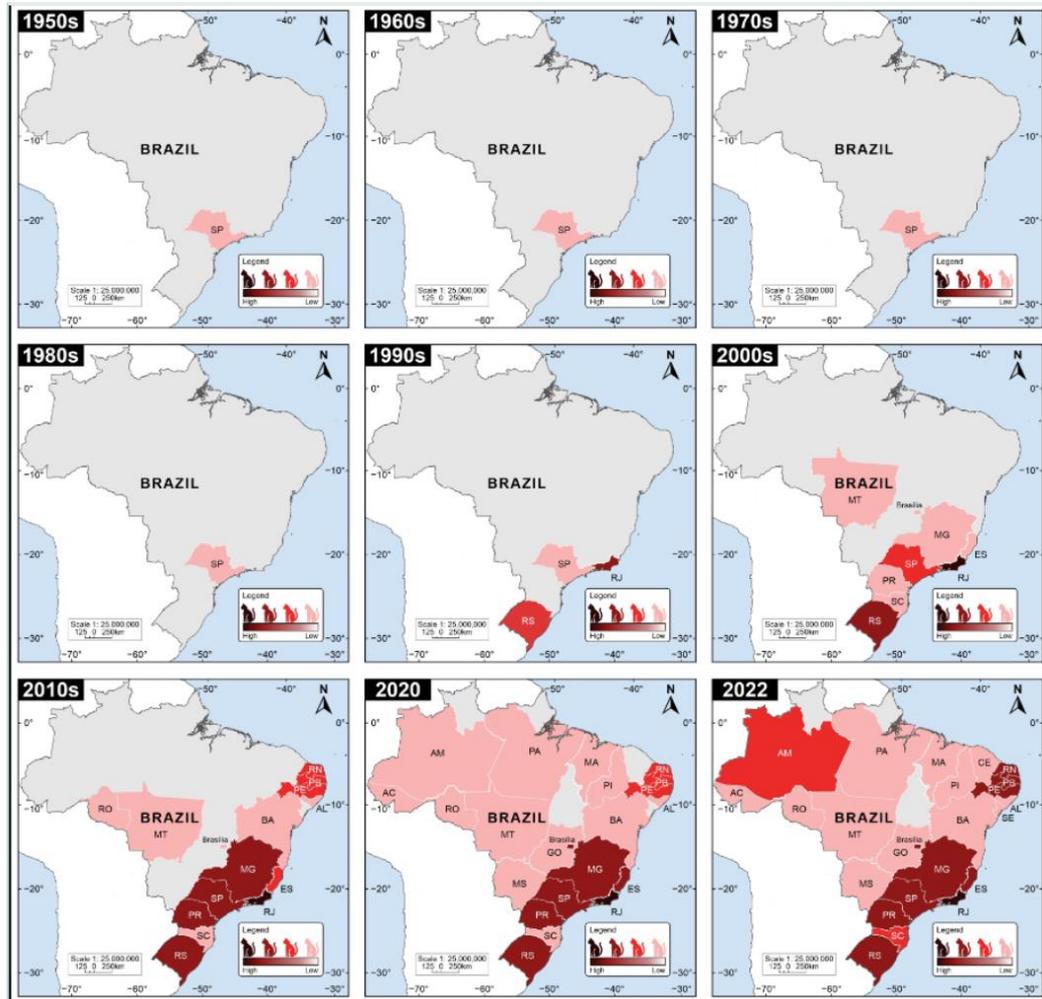
Durante muitos anos, a esporotricose tinha como único agente etiológico a espécie *Sporothrix schenckii*, que apenas se diferenciava em cepas que apresentavam graus de virulência diversificados entre si (DE LIMA; VIDAL SCHÄFFER;

DE MORAES BORBA, 2003; KONG *et al.*, 2006), mas com os avanços dos estudos moleculares, chegou-se à conclusão que em diferentes localidades, se formavam grupos geneticamente distintos (MARIMON *et al.*, 2007).

Atualmente, há grupos de espécies com maior relevância clínica e proximidade filogenética no chamado complexo *Sporothrix schenckii* ou *Sporothrix schenckii sensu lato*, onde estão agrupadas as espécies: *S.schenckii sensu stricto*, *S. globosa*, *S. brasiliensis* e *S. luriei*, e também há o grupo de espécies consideradas saprofitas, como *S. mexicana*, *S. pallida* e *S. chilensis*, que são mais distantes filogeneticamente do complexo, porém ainda podem causar a doença, caso acometa um hospedeiro suscetível (RANGEL-GAMBOA *et al.*, 2016; RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2016; ZHOU *et al.*, 2014).

Existem diferentes hipóteses sobre a disseminação do fungo e suas diferentes cepas, uma possibilidade é que o desmatamento e a expansão humana (e seus animais de estimação) tenham como consequência um maior contato com os fungos em áreas antes desabitadas. Uma segunda possibilidade é que nos últimos 20 anos o *S. brasiliensis* tenha se tornado mais virulento, ou ainda, que os avanços no diagnóstico tenham levado à uma melhor identificação e notificação de esporotricose por *S. brasiliensis* (EUDES FILHO *et al.*, 2020), visto que a mesma pode ser confundida com outras doenças como criptococose, histoplasmose, processos neoplásico, e infecções cutâneas bacterianas.

De qualquer forma, é nítido a disseminação da doença por todo território brasileiro, e o aumento significativo do número de casos, como demonstrado na figura 1.



**Figura 1. Disseminação da esporotricose no Brasil.** Aumento da incidência dos casos ao longo dos anos em território brasileiro (RODRIGUES et al.,2022).

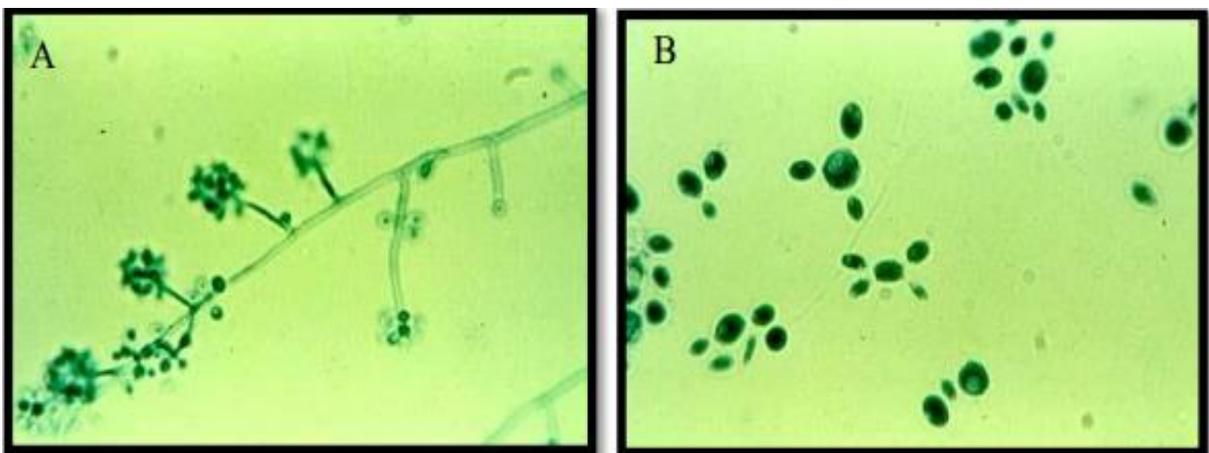
## 1.2 Biologia do fungo e características morfológicas

O fungo *Sporothrix schenckii* está classificado dentro do reino Fungi, filo Ascomycota, classe Sordamyricetes, ordem Ophiostomatales, família Ophiostomataceae, gênero *Sporothrix* e espécie *Sporothrix schenckii* (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999).

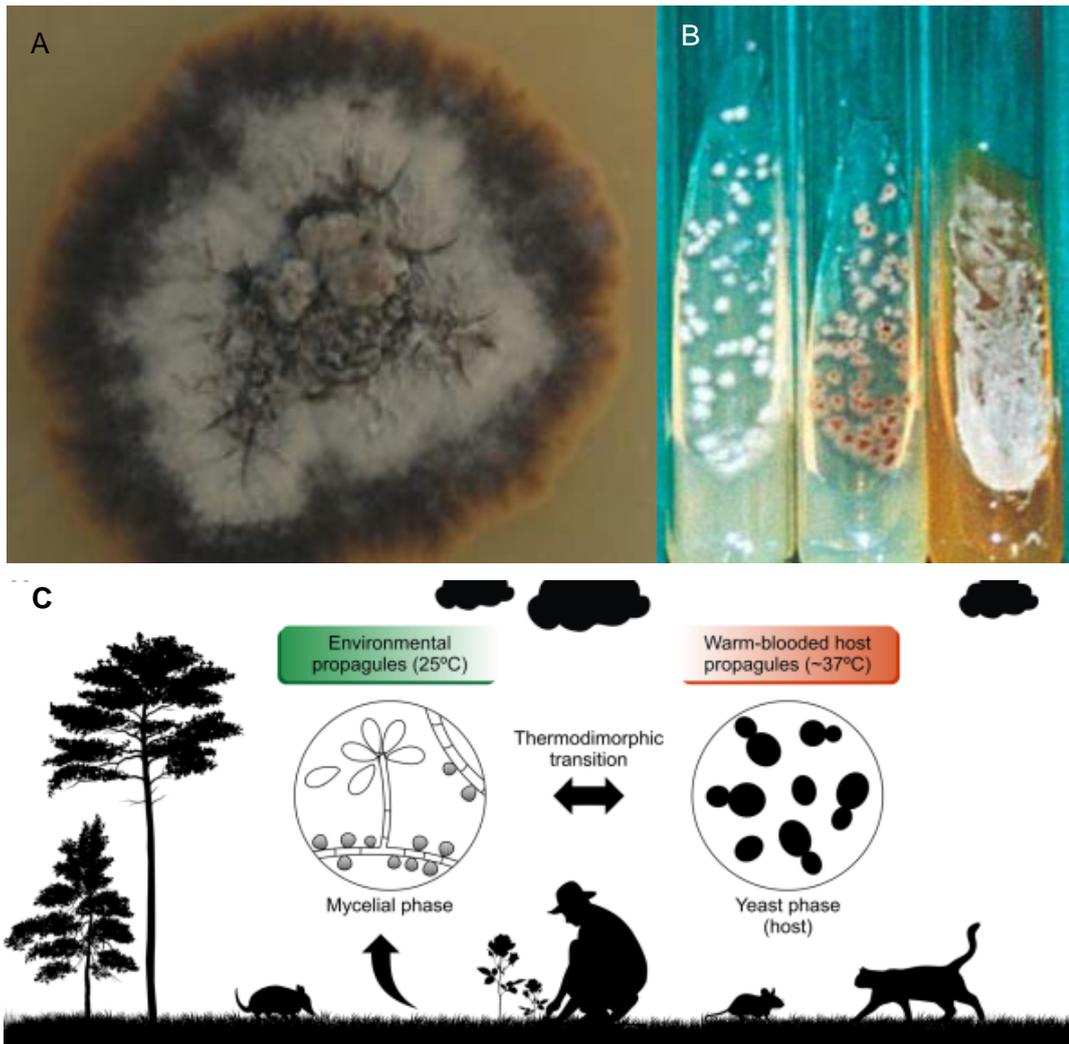
*Sporothrix spp.* é considerado um fungo dimórfico, ou seja, pode se apresentar em morfologia leveduriforme ou filamentosa (figura 2), a depender principalmente da temperatura que se encontra, em seu estágio saprofítico ou quando cultivado a 25°C, assume a forma filamentosa, composta por hifas septadas hialinas com conídios, unicelulares (LACAZ, 1998).

O fungo se desenvolve sob a forma de levedura a 37 °C, *in vitro* ou nos tecidos de um organismo vivo, essa fase parasitária e leveduriforme, mostra estruturas cuja formas podem ser redondas a ovais, com morfologia se assemelhando e um "charuto" (HOLICK *et al.*, 1972).

As colônias são identificadas fenotipicamente pelas características macroscópicas da sua superfície, com uma coloração que varia de branca a creme e com um halo central preto, ou podem ser escuros desde o início, dependendo da espécie, e das condições nutricionais e ambientais ao qual são expostas em cultivo. Por ser um fungo termodimórfico, a 25°C é possível observar o crescimento de sua forma filamentosa composta por hifas, e se cultivado a 37°C, observamos a mudança na morfologia celular e o crescimento de células leveduriformes (figura 3) (DE LIMA BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011; MARIMON *et al.*, 2007)



**Figura 2. Morfologia microscópica do *Sporothrix* sp. A. Morfologia filamentosa. B. Morfologia leveduriforme (LACAZ, 1998).**



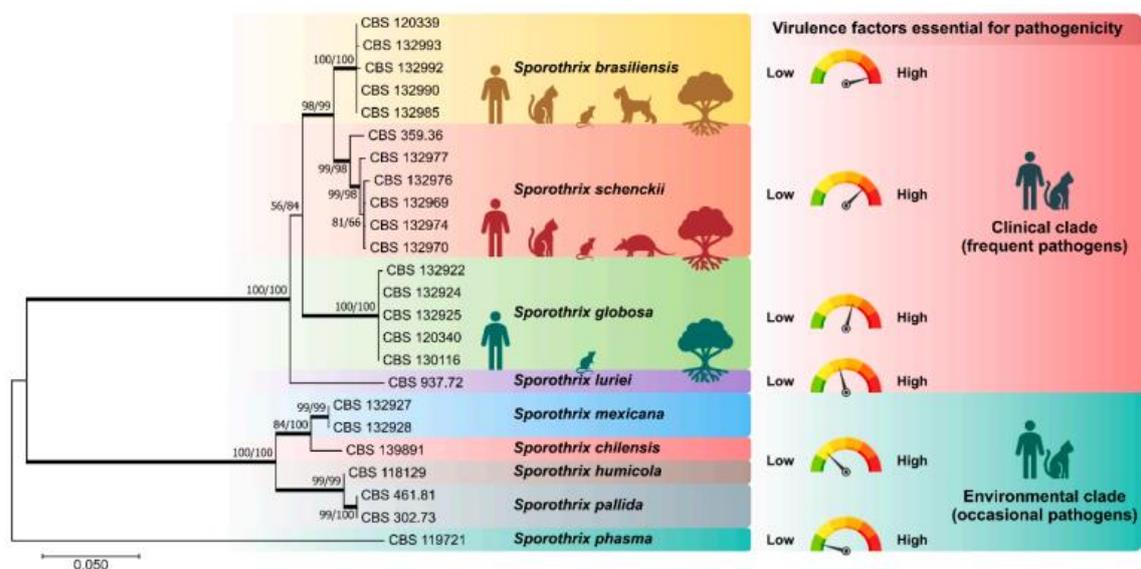
**Figura 3. Características macroscópicas da colônia e aspectos ambientais e infectantes. A.** Macromorfologia da colônia de *S. brasiliensis* em temperatura de 25°C (OROFINO-COSTA, 2017). **B.** Macromorfologia da colônia de *S. schenckii* senso lato: colônias miceliais sem pigmentação (primeiro tubo) e com pigmentação (segundo tubo) em ágar Sabouraud e forma leveduriforme (terceiro tubo) em ágar Brain Heart Infusion (BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011). **C.** Propágulos ambientais em fase micelial, representada por hifas hialinas e septadas, onde os conídios estão fixados (25°C) e propágulos no hospedeiro em fase leveduriforme com leveduras com formato oval (37°C) (RODRIGUES; HAGEN; DE CAMARGO, 2022).

O fungo possui uma parede celular altamente resistente, composta por diversos tipos de carboidratos, glucanos, quitina, glicoproteínas e pode passar por diversas mudanças estruturais nessas passagens de fases leveduriforme e filamentosa, e que o torna resistente a fatores e danos externos. Essa característica de parede, não só proporciona uma proteção física aos danos, mas também lhe confere uma capacidade de evasão contra células do sistema imunológico (ENE *et al.*, 2015; GARCIA-RUBIO *et al.*, 2020).

Estudos indicam que agentes etiológicos da esporotricose crescem em nichos ecológicos com muitas variações de temperatura e umidade, e estão associados a uma variedade de materiais vegetais como plantas, restos lenhosos, folhas de junco, talos de milho, folhas e migalhas de madeira, e esse ambiente intensifica e facilita seu estabelecimento e proliferação no ambiente, e existe um questionamento, se esses fatores ambientais poderiam estar relacionados às características de resistência do fungo (RAMÍREZ-SOTO *et al.*, 2018).

As espécies patogênicas incluem *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa* e *S. luriei*. Dentre elas *S. schenckii* e *S. globosa* já foram isolados de humanos, animais e solo, porém as tentativas de se isolar *S. brasiliensis* do solo não foram bem-sucedidas, e sabe-se que essa última, é a espécie mais frequentemente isolada nos casos clínicos de humanos e felinos e a mais prevalente no Brasil, sendo o representante mais virulento do clado clínico, além de seu grande potencial de dispersão geográfica, principalmente através da dispersão felina (DE CARVALHO *et al.*, 2021; MORGADO *et al.*, 2022).

Espécies de *Sporothrix* clinicamente relevantes podem ser facilmente reconhecidas por meio da região ITS (espaçador interno transcrito) que é-se a um pedaço de RNA não-funcional situado entre RNAs ribossômicos (rRNA), além do clado ambiental, composto por alguns outros complexos de espécies, como *S. pallida*, *S. candida*, *S. inflata*, *S. gossypina* e *S. stenoceras*, como mostrado na figura 4 (MARIMON *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2013b; ZHOU *et al.*, 2014).



**Figura 4. Relações filogenéticas entre os membros do clado clínico e ambiental em *Sporothrix*, com base em sequências de calmodulina.** O *Sporothrix brasiliensis* é o representante mais virulento para animais vertebrados dentre os representantes do clado clínico (RODRIGUES et al., 2022).

### 1.3 Epidemiologia

Estudos apontam duas principais formas de transmissão, a clássica e a zoonótica (figura 5). A forma de transmissão clássica, consiste na inoculação traumática do agente no tecido subcutâneo, seja na pele ou mucosas do hospedeiro, sendo assim, há a necessidade de um evento acidental durante a manipulação de material vegetal contaminado. Historicamente esse tipo de transmissão está relacionada com a proximidade do homem com o ambiente, como por exemplo pessoas praticantes de jardinagem e agricultura. Assim era conhecida como “micose da roseira”, ou “micose do jardineiro” (RIPPON, 1988).

Em meados da década de 90, mudanças ocorreram no que diz respeito a via de transmissão e conseqüentemente nos indivíduos de risco para a contração da doença, se trata da rota zoonótica do gato para o homem, e com essa transmissão alternativa, ocorreram mudanças nas estratégias de controle da epidemia (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017). Especificamente, a importância dessa transmissão zoonótica foi notada pela primeira vez quando foi relatado um surto envolvendo cinco pessoas expostas a um gato doente (READ; SPERLING, 1982).

Hoje no Brasil, a forma de transmissão mais comum é a zoonótica (figura 6), com a passagem do agente patogênico de um animal para o homem, e apesar da esporotricose ser relatada em outros animais, os principais carreadores do fungo são os felinos (RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2016).

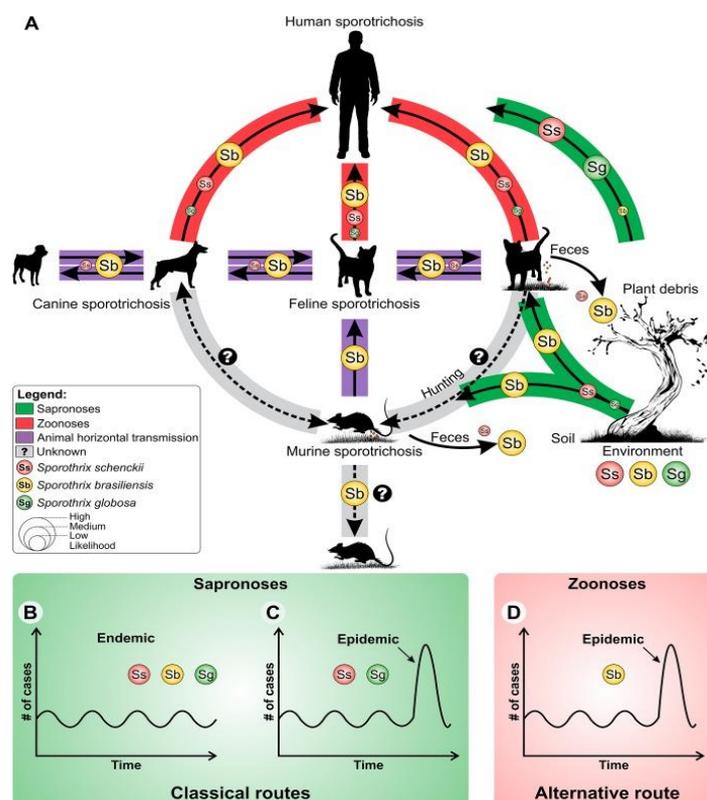
A esporotricose pode acometer diversas espécies de animais e já foi descrita em equinos, cães, bovinos, suínos, camelos, primatas e no ser humano (HIRANO *et al.*, 2006; SCHUBACH *et al.*, 2006).

Sabe-se que a espécie mais acometida e principal reservatório são os felinos, e podemos associar isso aos hábitos desses animais, que na idade reprodutiva, principalmente naqueles que têm acesso à rua, ocorrem disputas territoriais e por fêmeas, onde há a disseminação do fungo, por meio de mordeduras e arranhaduras (PIRES, 2017). Esse fato se agrava quando temos um número grande de animais errantes pelas ruas e semidomiciliados, e a doença se aproxima dos humanos à

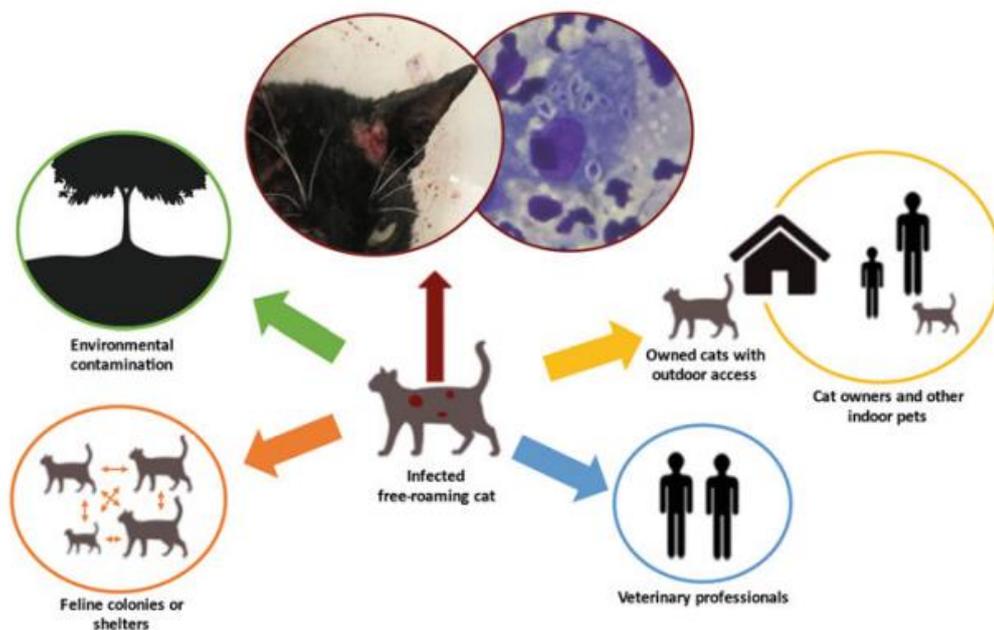
medida que a domesticação desses animais vem aumentando, ocorrendo um aumento progressivo do número de casos (MACHADO; MELO; SOUZA, 2022).

Os padrões de contato desses animais através de arranhaduras e mordeduras, mostram que as cadeias de transmissão epizoótica e zoonótica são eficazes impulsionadores do surgimento e evolução da doença, além de um maior número de frações de genótipos circulantes dentre as cepas (figura 7) que contribuem para a especialização, especiação e radiação das mesmas, assim, é aceito que um único gato doente introduzido em uma região nova pode desencadear um surto e evoluir para uma epidemia, isso pode incluir locais próximos até áreas mais distantes, como outras cidades e estados, dessa forma, a introdução de animais doentes em novas regiões ocorreu por diversas vezes na evolução da esporotricose zoonótica (DE CARVALHO *et al.*, 2021; RODRIGUES *et al.*, 2022a).

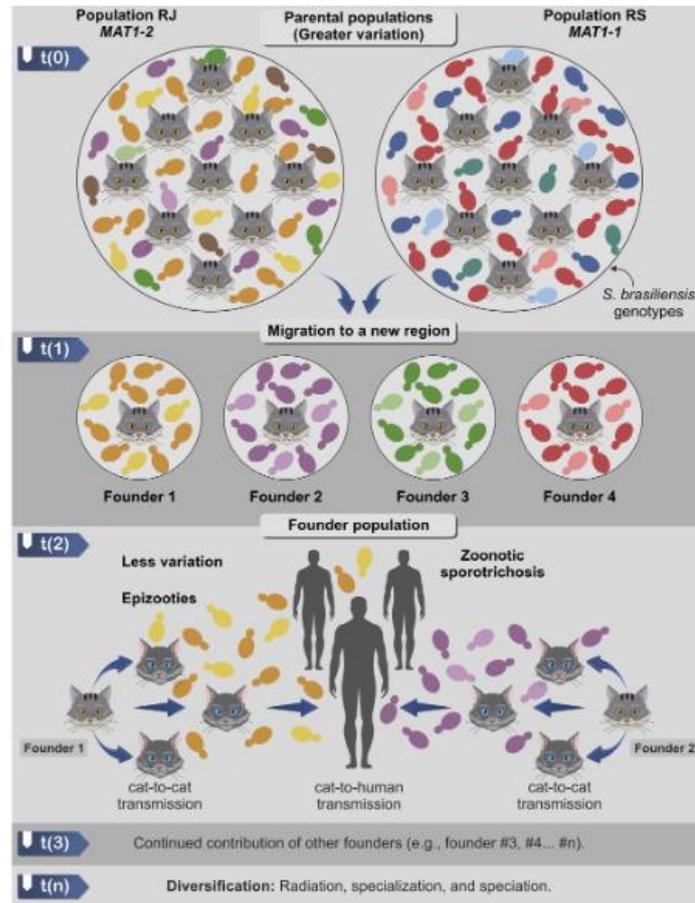
Ainda existem lugares onde a prevalência dos casos clássicos, com a inoculação traumática a partir de um material vegetal contaminado, ainda é superior aos acidentes zoonóticos, como por exemplo, quando comparamos os casos do Espírito Santo, com o Rio de Janeiro, duas regiões com grande número de casos (DE ARAUJO *et al.*, 2015). Nos casos clássicos, a espécie predominante é a *S. schenkii*, e nos zoonóticos, *S. brasiliensis*, como mostrado na figura 5.



**Figura 5. Ciclo de transmissão da esporotricose (adaptado de RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2016).** Representadas na figura, algumas possíveis formas de transmissão, associadas à espécie do fungo. O tamanho dos círculos das espécies é proporcional a sua frequência no respectivo ciclo. Na forma clássica, temos uma saproozoonose, onde o microrganismo é adquirido através de acidente traumático com material contaminado, e está mais relacionado às espécies *S. schenckii s. str.* e *S. globosa*. Em sequência vemos o ciclo zoonótico, onde a transmissão da doença ocorre do animal para o homem através de mordedura e/ou arranhadura, e é mais associado à espécie *S. brasiliensis*. Também podemos ver o ciclo animal-animal com a transmissão interespecie e intra espécie do agente. Na imagem, observamos também a possibilidade de contaminação do ambiente com o contato com lesões dos animais e seus excrementos.



**Figura 6. O gato na esporotricose.** Leveduras de *Sporothrix brasiliensis* que podem colonizar a cavidade oral e as unhas, lesões de animais doentes, esses animais podem transmitir o fungo para humanos, como veterinários (azul) e outros animais (laranja), que quando domiciliados (amarelo) podem levar o fungo para casa, e ainda pode ocorrer contaminação ambiental por fezes e secreções contaminadas ou por animais mortos infectados (verde) (IKEDA; FERREIRA, 2021).



**Figura 7. O efeito fundador em *Sporothrix brasiliensis*.** A população parental de *S. brasiliensis* representada por dois epicentros dos surtos (Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul) pode dar origem a diferentes populações fundadoras. A análise genética revelou que as populações parentais de *S. brasiliensis* possuem grande variação genética. A migração do novo indivíduo fundador  $t(1)$ , ou seja, um gato doente para uma nova região leva à transmissão animal direta horizontal (gato-a-gato) e zoonótica transmissão (gato-para-humano), gerando uma população fundadora, que é composta por uma fração de genótipos circulando na população parental (ou seja, menor variação). A ausência de barreiras sanitárias e de polícia sanitária pública para mitigar a epidemia leva à continuidade da contribuição de outros fundadores, acelerando o ritmo de diversificação da população fundadora. Essa diversificação por meio de saltos de hospedeiro geralmente é seguida por radiação, especialização e especiação (DE CARVALHO et al., 2021).

Atualmente no Brasil, a esporotricose humana e animal são de notificação compulsória, e é feita Rio de Janeiro e Pernambuco, além dos municípios de Guarulhos (SP), Conselheiro Lafaiete e Belo Horizonte (MG), Salvador e Camaçari (estado de Bahia), Natal (Rio Grande do Norte) e João Pessoa (Paraíba), que são consideradas regiões endêmicas para a doença, e mesmo fora dessas regiões a notificação deve ser feita por veterinários, e com esses dados a incidência é apontada com base em estudos anteriores.

Entre os anos de 2013 e 2014, o primeiro estado onde a notificação se tornou compulsória foi no Rio de Janeiro e desde então todos os casos devem ser registrados Sistema de Informação de Notificação de Acidentes de acordo com as diretrizes e rotinas estabelecidas pela Secretaria Estadual de Saúde do Rio de Janeiro (GREMIÃO *et al.*, 2021). Com a notificação obrigatória, há o aumento da conscientização e diminuição do ciclo zoonótico, além de facilitar a identificação dos surtos logo no seu início.

## 1.4 Aspectos clínicos

### 1.4.1 Esporotricose em humanos

Dentre as espécies fúngicas existentes, cerca de 100 representantes, são capazes de causar doenças em humanos e animais, causando alergias, infecções superficiais, bem como micoses invasivas nos casos mais graves (CRESPO *et al.*, 2016).

Após a inoculação do *S. brasiliensis*, estabelece-se um período de latência variável, que dura em média de 21 dias, até que se dê início aos sinais clínicos. Sendo que o tipo de manifestação que se desencadeia a partir desse momento, está diretamente relacionada à cepa envolvida no acidente e o sistema imunológico do paciente acidentado (LARSSON, 2011).

Dentre as manifestações cutânea e subcutânea, a mais ocorrente é a linfocutânea (figura 8), onde o agente a partir da perda da solução de continuidade na pele, acaba atingindo os vasos linfáticos, e esse padrão de lesão muitas vezes é perceptível no exame físico do paciente.

Existe também a manifestação cutânea fixa (figura 8), onde a lesão fica delimitada ao local do trauma. E pode ocorrer a forma cutânea disseminada, onde o agente alcança as vias hematogênicas após uma lesão primária e pode evoluir, desenvolvendo lesões por grandes extensões da pele (GUTIERREZ-GALHARDO; FREITAS; DO VALLE, 2015).



**Figura 8. Manifestações clínicas.** Manifestação linfocutânea, onde vemos lesões se iniciando no dedo indicador, atingindo via linfática ascendente, e a manifestação cutânea fixa com lesões de característica verrucosa no dorso da mão (Orofino-Costa et al., 2022).

Ademais, existe a forma extracutânea da doença, que ocorre mais frequentemente em pacientes imunossuprimidos, onde o fungo pode acometer, sistema nervoso central, ósseo, e até o endocárdio a partir de disseminação hematogênica oriunda de uma lesão primária.

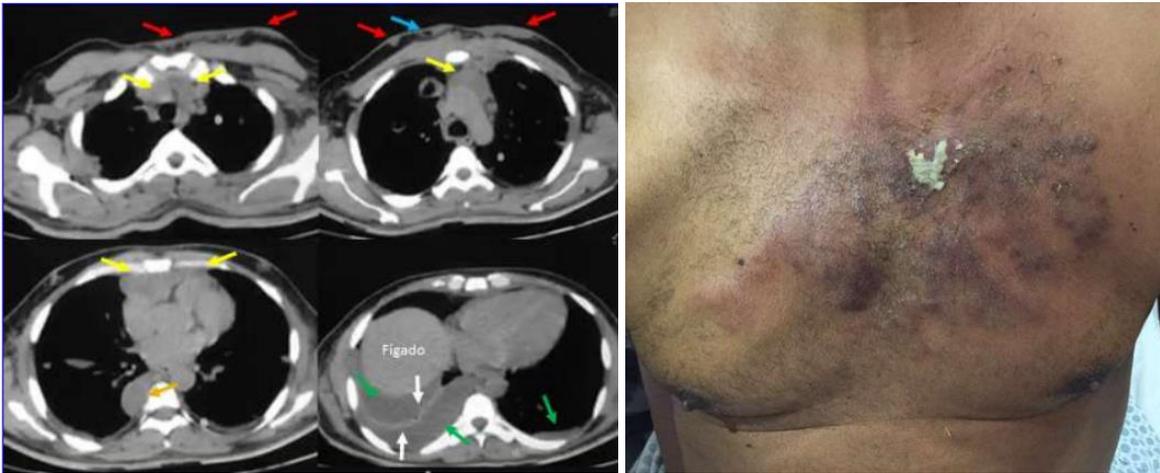
Pulmões e mucosas podem ser afetados tanto por disseminação, quanto por contato direto com o agente, porém o acometimento pulmonar, a partir da inalação de propágulos fúngicos (conídios ou leveduras), é incomum (AUNG *et al.*, 2013; FREITAS *et al.*, 2012; TOMOKO *et al.*, 2002; VILELA *et al.*, 2007). Deve-se considerar a possibilidade de esporotricose pulmonar (figura 9) em pacientes com tosse crônica, principalmente se tratando de pacientes com condições imunossupressoras (SILVA; ANDRADE TELLES; MARTINS, 2017).

As formas clínicas mais comuns da esporotricose são as formas linfocutânea e cutânea fixa, com algumas diferenças no perfil celular e na atividade inflamatória nas lesões, onde a forma linfocutânea apresenta um maior número de lesões, carga fúngica e maior infiltrado de neutrófilos (MORGADO *et al.*, 2011).

Novas apresentações clínicas da esporotricose têm sido reportadas. Em 2012, um paciente, portador do vírus da imunodeficiência humana (HIV), desenvolveu um quadro disseminado de esporotricose, com acometimentos como endocardite, endoftalmite bilateral e envolvimento linfático, e após procedimento cirúrgico para substituição da valva mitral, isolados de *Sporothrix brasiliensis* foram obtidos de culturas de nódulos subcutâneos e fragmentos de valva mitral (SILVA-VERGARA *et al.*, 2012).

Posteriormente, em 2020, já foram relatados 10 casos de síndrome oculoglandular, com lesões oftálmicas (figura 10), causada pelo fungo, todos os casos

foram após contato com gatos domésticos diagnosticados com esporotricose (RIBEIRO *et al.*, 2020)



**Figura 9. Acomentimento pulmonar da esporotricose.** Tomografia computadorizada de tórax com áreas de espessamento da pele com extensão ao tecido celular subcutâneo adjacente, localizada ao nível dos hemitórax anteriores (setas vermelhas), destacando pequeno foco com conteúdo gasoso (seta azul), linfonodomegalias mediastinais anteriores e lateralmente à croça da aorta (setas amarelas), derrame pleural de aspecto encistado ao nível do lobo inferior direito (seta laranja), derrame pleural bilateral (setas verdes), parênquima pulmonar adjacente por compressão extrínseca (setas brancas). E drenagem de secreção purulenta do tórax (SILVA *et al.*, 2017).

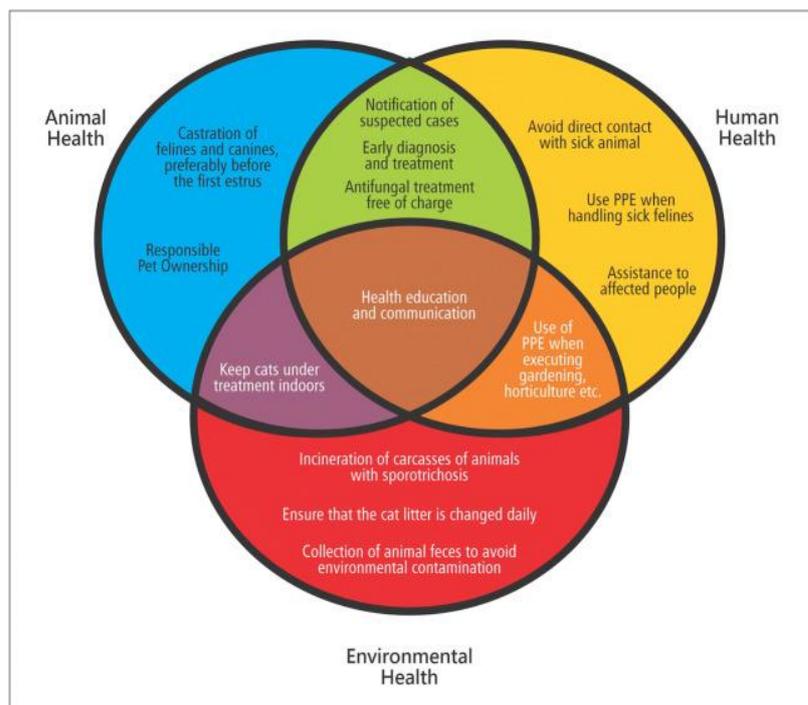


**Figura 10. Manifestações oftálmicas.** Lesões em mucosa conjuntival, mais uma manifestação clínica de esporotricose (OROFINO-COSTA, 2022).

#### 1.4.2 Esporotricose em animais

Entender a ocorrência da esporotricose nos animais, principalmente nos felinos, que hoje são considerados principais hospedeiros desse agente, nos auxilia no entendimento da afecção nos seres humanos.

Atualmente, o termo *One Health* (figura 11) está muito presente nos ambientes hospitalares e de saúde, principalmente no que diz respeito às doenças infecciosas, pois a cada dia, com a domesticação dos animais, há uma proximidade cada vez maior dos mesmos com os seres humanos, e com essa interconexão, observamos o surgimento, evolução e disseminação da resistência a antibióticos, por exemplo (foco da abordagem *One Health*) que pode representar um risco para a saúde, sendo assim é necessário uma abordagem *One Health* para implementar com sucesso as medidas de controle da saúde pública (HERNANDO-AMADO *et al.*, 2019; ROSSOW *et al.*, 2020).



**Figura 11. One Health.** Representação da abordagem One Health para prevenção e controle de esporotricose (GREMIÃO *et al.*, 2020).

Os felinos domésticos são os hospedeiros mais suscetíveis à infecção pelo *Sporothrix* e frequentemente podem desenvolver as manifestações mais graves da doença, podendo evoluir para óbito. Em grande parte dos casos, múltiplas lesões ulcerativas (figura 12) são observadas na região cefálica, principalmente em plano nasal e das patas, justamente como consequência do seu comportamento que envolve arranhar e morder durante as brigas, principalmente entre machos adultos, não domesticados e não castrados (GREMIÃO *et al.*, 2014).

Estudos mostram que os gatos podem adquirir esporotricose causada tanto por *S. schenckii* quanto por *S. brasiliensis*, o que indica que gatos selvagens e de rua

podem ser reservatórios da doença (EUDES FILHO *et al.*, 2020). Ademais, gatos aparentemente saudáveis domiciliados, ou semi-domiciliados, quando entram em contato com animais afetados, podem carrear o fungo, sem necessariamente apresentar manifestações clínicas referentes a doença, o que já foi evidenciado a partir de estudos com amostras de fluidos, com resultados positivos na cultura fúngica (SCHUBACH *et al.*, 2001).



**Figura 12. Manifestações clínicas da esporotricose em felinos. A.** Úlceras em plano nasal. **B.** Úlceras e crostas em região cefálica. **C.** Múltiplas lesões em região de membros e região cefálica. **D.** Lesão em região ungueal.

#### 1.4.3 Métodos Diagnósticos

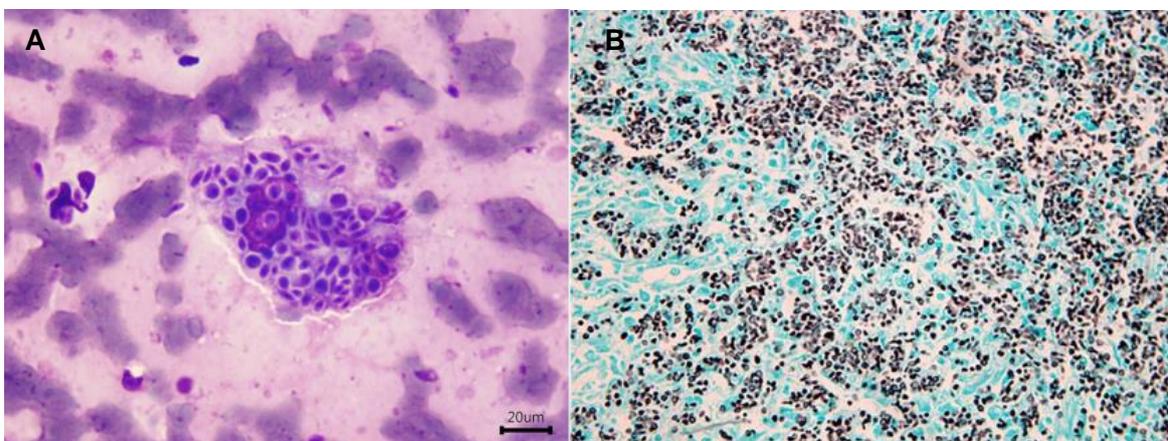
O método diagnóstico considerado padrão ouro, e de melhor sensibilidade para o diagnóstico da esporotricose é a cultura fúngica, porém, ela pode resultar em um falso negativo. Os materiais de escolha são os aspirados das lesões, biópsias, e fluidos corporais, que são semeados preferencialmente em ágar Sabouraud dextrose, Brain Heart Infusion Broth (BHI) ou Mycosel, que deve ser seguido da identificação macro e micromorfológicas, além da prova de termoconversão *in vitro*.

Apesar de ser o método de escolha, outras abordagens diagnósticas como sorologias, análises citológicas e histopatológicas (figura 13), além de técnicas moleculares vêm sendo adotadas como ferramentas para o diagnóstico da infecção (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017; SCHUBACH *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2015).

O exame citopatológico é um método sensível, rápido e prático para ser utilizado no diagnóstico da esporotricose felina em surtos desta micose (SILVA *et al.*, 2015).

Deve-se ter atenção em acompanhamentos terapêuticos onde se utiliza apenas um método diagnóstico, como por exemplo o emprego apenas da citopatologia, pois já foi demonstrado que esse recurso quando único, principalmente em animais tratados com mais de 100 mg/dia de itraconazol pode ser limitante e resultar em resultados falso negativo (MACÊDO-SALES *et al.*, 2018).

O exame direto por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) de lesões sugestivas da infecção nos felinos é um bom método para confirmar a infecção e determinar as espécies de *Sporothrix*, garantindo um diagnóstico rápido; esse método tem uma boa concordância com o isolamento fúngico (GONSALES *et al.*, 2020). A identificação em nível de espécie de *Sporothrix* é possível com diagnóstico molecular e necessária para rastrear a expansão geográfica de *S. brasiliensis*, além de entender melhor sua epidemiologia (ROSSOW *et al.*, 2020).



**Figura 13. Achados citológicos e histológicos.** **A.** Visualização de leveduras fagocitadas por macrófago em lâmina corada em Diff-Quick. **B.** Achados histológicos de lesão proveniente de infecção por *Sporothrix spp.* em lâmina corada por impregnação de prata de Grocott. Ambas coletadas de lesões de felinos acometidos, onde pode-se visualizar as estruturas leveduriformes (GREMIÃO *et al.*, 2020).

Existem algumas patologias que devem ser consideradas como diagnósticos diferenciais das apresentações clínicas da esporotricose humana, como as leishmanioses, tuberculose, nocardiose, cromoblastomicose, toxoplasmose, paracoccidioomicose, histoplasmose e carcinoma espinocelular, dentre outros (OROFINO-COSTA *et al.*, 2022).

Nos felinos e devem ser incluídas doenças como leishmaniose, síndrome leproide felina (micobacteriose atípica felina), nocardiose cutânea (SECCHIN *et al.*, 2017), carcinoma de células escamosas, que em gatos ocorrem principalmente no plano nasal e ponta de orelhas (SCHURT; CARDINOT; BARBOSA, 2017), além da criptococose, que é considerado o principal diagnóstico diferencial em gatos (GROSS *et al.*, 2009).

#### 1.4.4 Métodos terapêuticos

Os protocolos terapêuticos utilizados para o tratamento da esporotricose vão depender basicamente da tríade: (i) manifestações clínicas da doença, (ii) condições do sistema imunológico do hospedeiro e (iii) espécies de *Sporothrix* envolvidas (*S. brasiliensis*, *S. schenckii*, e *S. globosa*) (ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2022b).

Infelizmente, dentre os agentes fúngicos e fármacos, a informação genética sobre os mecanismos de resistência está mais esclarecida para o agente *A. fumigatus* e os triazóis. Até onde se sabe essa informação não está esclarecida para espécies de *Sporothrix* clinicamente relevantes (ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2017).

Em humanos, a administração oral de itraconazol é a primeira escolha para o tratamento, por estar menos associado a efeitos adversos quando comparado a outros agentes antifúngicos (BUSTAMANTE; CAMPOS, 2001).

O custo, tempo de administração e efeitos adversos atribuíveis a essa droga, são impactos importantes, assim, as vantagens relacionadas ao uso do itraconazol, o tornaram de utilização extensiva e indiscriminada, tanto na clínica médica humana e veterinária, resultando em frequentes isolados fúngicos resistentes, tendo como consequência, a falha terapêutica (RAQUEL *et al.*, 2007).

Sendo assim, recentemente, pesquisas sobre o complexo *Sporothrix* têm focado em encontrar novas moléculas e componentes com potencial para abordagens terapêuticas e profiláticas. Um exemplo é um trabalho recente, que propôs uma

estratégia para otimizar o tratamento, trata-se do desenvolvimento de um gel hidrofílico com nanomicelas carregadas com itraconazol (HGN-ITZ), cujo resultados sugerem seu uso como uma estratégia promissora no tratamento da esporotricose (GABRIELE SANTIAGO *et al.*, 2023).

A anfotericina B também tem sido indicada para o tratamento de micoses causadas por *Sporothrix spp.*, além de *Histoplasma spp.*, *Cryptococcus spp.*, com sua ação antifúngica, a anfotericina B também apresenta ação imunoestimulante, aumentando a resistência do hospedeiro à infecção, melhorando as propriedades fungicidas dos macrófagos (GREENE, 2012).

Anteriormente, o iodeto de potássio era considerado um fármaco de escolha, porém, por motivos de intoxicação em felinos, seu emprego foi diminuído com o passar dos anos, mas os cães e humanos são bem tolerantes e respondem bem ao tratamento (JERICÓ; NETO; KOGIKA, 2015). A terbinafina, antifúngico do grupo das alilaminas, demonstrou ação fungicida frente ao *S. schenckii*, não demonstrando problemas de resistência frente ao agente, além de efeitos tóxicos reduzidos quando comparado ao itraconazol (RAQUEL *et al.*, 2007).

Estudos relacionados a farmacologia são imprescindíveis, pois nota-se evidente aumento da resistência de cepas de *Sporothrix* frente aos antifúngicos. Já foi demonstrado *in vitro* os possíveis mecanismos para o desenvolvimento dessa resistência, que podem ser associados à capacidade de produção de melanina, diversidade genética e mutações.

Já foi mostrado que as espécies de *Sporothrix* em geral demonstram altos níveis de resistência às drogas antifúngicas disponíveis, e avaliações de cepas geneticamente diversificadas, revela evidências de fenótipos multirresistentes, direcionando a uma necessidade de identificação molecular desses agentes para prever o resultado dos protocolos terapêuticos (RODRIGUES *et al.*, 2014; WALLER *et al.*, 2021).

#### 1.4.5 Métodos profiláticos

Como métodos profiláticos, deve-se afinar medidas que incluem a vigilância, rápido diagnóstico, melhor acompanhamento dos casos, acesso a anti-inflamatórios e antifúngicos, além da educação e conhecimento da população sobre a esporotricose (DE CARVALHO *et al.*, 2021).

No que diz respeito ao controle e profilaxia envolvendo felinos contaminados, é indispensável o cuidado no manuseio desses animais, com o uso de EPIs (equipamentos de proteção individual), como luvas para profissionais durante a coleta de amostras para citologia e cultivos microbiológicos. Além da desinfecção dos locais contaminados com hipoclorito de sódio, como o ambiente que o animal vive e ambulatório que foi atendido. Deve-se manter a terapia e o isolamento do animal com esporotricose até sua cura completa (JERICÓ; NETO; KOGIKA, 2015; TORRES DA SILVA et al., 2012)

Uma medida de grande importância é a manutenção de animais de estimação, principalmente felinos, em condições domiciliadas estritas, pois a hipótese de que animais que vivem em ambiente limpo, controlado e que não tem acesso a rua, são os menos afetados, tendo quase zero notificação, vem sendo confirmada (MACHADO; MELO; SOUZA, 2022).

Até o presente momento não há uma vacina padronizada contra a esporotricose para controle principalmente nos gatos.

A complexidade genética, conhecimento limitado dos mecanismos dos fármacos antifúngicos, e a falta de um antígeno alvo definido, dificultam esse processo, porém, nos últimos anos, vem sendo estudados potenciais alvos antigênicos, para a criação de possíveis protocolos terapêuticos, com o foco na criação de uma vacina efetiva. Sabe-se que a parede celular desse fungo é uma importante fonte de antígenos para o desenvolvimento de potenciais vacinas. Recentemente, um estudo utilizando anticorpo monoclonal contra gp70 (mAbP6E7) no tratamento da esporotricose mostrou resultados promissores (ALMEIDA, 2012).

Foi demonstrado que proteínas da parede celular do fungo *S. schenckii* são capazes de ativar células dendríticas aumentando a expressão de moléculas co-estimulatórias e citocinas pró- inflamatórias, e a imunização com BMDCs (células dendríticas derivadas da medula óssea) estimuladas com PSC (proteínas da superfície celular) favorece uma resposta imune induzida por Th17 *in vitro*, influenciando na liberação IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-4 e IL-2, mostrando que BMDCs são capazes de conferir proteção terapêutica contra *S. schenckii*, promovendo uma resposta Th1/Th17 mista, ou seja o uso de BMDCs estimuladas podem ser grandes candidatas a terapêutica da doença (JELLMAYER, 2019).

Seguindo esse princípio, como as VEs de células imunológicas podem carrear as características de suas células de origem também são fortes alvos terapêuticos e

precisam ser mais bem avaliadas para os tratamentos contra a esporotricose (ZITVOGEL *et al.*, 1998).

## 1.5 Relação parasita e hospedeiro

### 1.5.1 Fatores de virulência do fungo

A evolução da esporotricose depende de fatores relacionados ao fungo juntamente com o hospedeiro, e envolve fatores relacionados quantidade de microrganismos inoculados, a resposta imune do hospedeiro, tal como a virulência do *S. schenckii* que é um dos fatores que se acredita desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento da doença (CARLOS *et al.*, 2009).

A maioria dos organismos fúngicos estão presentes no ambiente, e os seres humanos e outros animais são expostos frequentemente aos mesmos, seja pela inalação de esporos, ou o contato cutâneo direto com filamentos e leveduras. Dentre eles podemos citar *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium marneffeii* e também membros do complexo *Sporothrix schenckii*.

Muitos fungos patogênicos adquiriram essa capacidade de virulência recentemente na sua evolução, a capacidade de colonizar em diferentes condições, sejam elas no ambiente ou dentro de um organismo animal, resultou de vários eventos de adaptação que envolve a luta por nutrientes ou até mesmo a luta contra a defesa do hospedeiro (COONEY; KLEIN, 2008; HUBE, 2009).

Um dos fatores de virulência de fungos do gênero *Sporothrix*, e outros fungos patogênicos é a termotolerância (CASADEVALL, 2006), a síntese de melanina, que é um fator importante para completar seu ciclo de vida, e auxilia na sua sobrevivência em condições ambientais desfavoráveis (Morris-Jones *et al.*, 2003), a capacidade de adesão, e aqui podemos citar as glicoproteínas, dentre elas, a glicoproteína de 70 kDa (Gp 70) que foi descrita tendo participação na adesão à matriz extracelular dérmica (RUIZ-BACA *et al.*, 2009), dentre outros fatores.

A parede celular do fungo possui diversos componentes com alta capacidade imunogênica, e esses componentes podem conduzir o sistema imunológico do hospedeiro a uma resposta que promove o crescimento e a disseminação do fungo (GARCIA-RUBIO *et al.*, 2020).

As camadas da parede celular são heterogêneas e incluem componentes como proteínas hidrofóbicas e  $\alpha$ -glucana que não ativam os receptores imunológicos e ainda podem encobrir outros componentes da parede que, seriam detectados por células do sistema imune (ERWIG; GOW, 2016).

Além disso, já foi relatado a presença de componentes imunogênicos e proteínas nas VEs produzidas pelo fungo que podem estar relacionadas com a virulência da infecção por *S. brasiliensis* (IKEDA *et al.*, 2018).

### 1.5.2 Resposta imunológica do hospedeiro

Assim que o fungo entra em contato com o sistema imune do hospedeiro, através da introdução dos elementos fúngicos no organismo de forma traumática, uma sequência de eventos se desencadeia: o recrutamento de células do sistema imune, fagocitose, apresentação de antígeno, produção de anticorpos, e uma infinidade de moléculas e ativação de diferentes células do hospedeiro. Após essa inoculação, as hifas transicionam sua morfologia para leveduriforme, devido à mudança de temperatura do meio e estímulos recebidos (DE LIMA BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011).

Condições imunossupressoras como doenças primárias, condições terapêuticas e experimentais, estão relacionadas com as formas mais graves da esporotricose (MOREIRA; FREITAS; LAMAS, 2015).

Logo após a infecção, nos primeiros dias, há a ação da resposta imune inata, que é mediada por células, proteínas do sistema complemento e outras substâncias microbidas, com 7 a 10 dias, temos a ativação da imunidade adaptativa, mediada principalmente por linfócitos B e T, em uma resposta celular e humoral (ALBA-FIERRO *et al.*, 2016; ALMEIDA, 2012).

É necessário que toda essa resposta ocorra de forma organizada e equilibrada, e alguns estudos apontam que lesões mais brandas estão associadas a uma resposta inflamatória menos intensa, com infecção controlada e menor destruição dos tecidos envolvidos, já em manifestações disseminadas, observa-se respostas intensas e difusas, com mais lesões e patógenos (MIRANDA *et al.*, 2016; MORGADO *et al.*, 2011).

Muitas pesquisas em imunologia fúngica concentram-se na definição das interações moleculares entre PAMPs, que são polissacarídeos presentes na parede

celular fúngica, e seus PRRs que estão presentes em macrófagos e células dendríticas (DCs), que são recrutados para o local da lesão onde ocorrerá o primeiro reconhecimento, aqui, podemos citar receptores tipo toll-like (TLR) e receptores da família das lectinas tipo C (CTL) (ERWIG; GOW, 2016; LIN *et al.*, 2022).

Quando esse reconhecimento acontece, nós temos a ativação das respostas inata e adaptativa, onde essas células da resposta inata geralmente são as primeiras a responder e chegar ao local, desencadeando uma cascata de sinalização que leva à produção de citocinas que regulam e ativam outras células, promovendo a eliminação de grande parte dos agentes fúngicos, por meio de mecanismos de fagocitose e eliminação, além do auxílio do sistema complemento (IWASAKI; MEDZHITOV, 2004), que a partir de cascatas proteolíticas, acaba por opsonizar estruturas estranhas ao organismo com opsoninas que compõe o sistema, resultando na formação do complexo de ataque à membrana (MAC), poros na membrana, rompimento do envoltório celular e morte da célula, além de produzir potentes moléculas pró-inflamatórias, além de que, o sistema complemento teve sua participação expandida a vinculada às respostas imunes adaptativas (DUNKELBERGER; SONG, 2010).

Os macrófagos atuam por liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), em paralelo ao recrutamento de neutrófilos, células NK e DCs a partir liberação TNF- $\alpha$  (Fator de necrose tumoral) pelos mesmos, que realizam a quimiotaxia e aumentam a expressão da ICAM-1 (Molécula de Adesão Celular 1), que facilitará a infiltração dos neutrófilos no foco de infecção (GRIFFIN *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2009).

A afecção se manifesta frequentemente como um processo inflamatório infeccioso granulomatoso crônico, onde os monócitos e macrófagos desempenham um papel central no sistema de defesa do hospedeiro. Pesquisas relatam a importância do Toll-like receptor 4 (TLR4) na resposta contra a esporotricose, sendo o TLR4, (CD 284), uma importante molécula envolvida na ativação da resposta inata, reconhecendo moléculas do fungo e induzindo uma explosão oxidativa contra o fungo (CARLOS *et al.*, 2009), além disso, os TLRs estão envolvidos no controle de diversas funções celulares das DCs e na ativação de sinais que estão envolvidos no início de respostas imunes adaptativas (IWASAKI; MEDZHITOV, 2004).

É importante considerar que as características associadas a *S. schenckii* e/ou o hospedeiro pode influenciar a polarização dos macrófagos (M1/M2), o recrutamento celular e o tipo de resposta imune Th1, Th2 e Th17 (RUIZ-BACA *et al.*, 2021), em infecções fúngicas, se observa frequentemente atividade antifúngica em respostas do tipo Th1 e Th17 (ERWIG; GOW, 2016).

Quanto ao perfil de citocinas produzidas durante a infecção micótica, tem sido demonstrado resposta envolvendo as células Th17 e produção de IL-17, caracterizando essa resposta mais direcionada a um perfil Th1/Th17 que também poderia ser ativada em contatos futuros através das células T CD4+ de memória, com produção novamente de IL-10, IL-17a, IFN- $\gamma$ , e TNF- $\alpha$  (GARCÍA-LOZANO *et al.*, 2018).

Estudos com esporotricose felina demonstraram que respostas com lesões mais organizadas com menor parasitemia, tem sido associada com maiores porcentagem de linfócitos CD4+, enquanto aumentos de células CD8+ estão relacionadas com lesões mais disseminadas, acompanhadas de maiores cargas fúngicas, demonstrando que o balanço CD4:CD8 é ponto chave na determinação resolução clínica da doença em felinos (MIRANDA *et al.*, 2016).

As DCs apresentam papel essencial na resposta contra o patógeno fúngico, participando tanto da resposta inata como adaptativa, ela é considerada uma célula apresentadora de antígeno (APC) profissional, possuem diversos PRRs em toda sua superfície e capacidade fagocítica, além da ação no processo de maturação dos linfócitos T, capturando, processando e apresentando o antígeno do patógeno, por meio do transporte desses peptídeos em moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classes I e II, às células T CD4+/CD8+ naive, após migração para os órgãos linfóides secundários, para que posteriormente essas células T se diferenciem em células efetoras ou de memória (GUERMONPREZ *et al.*, 2002; VERDAN *et al.*, 2012).

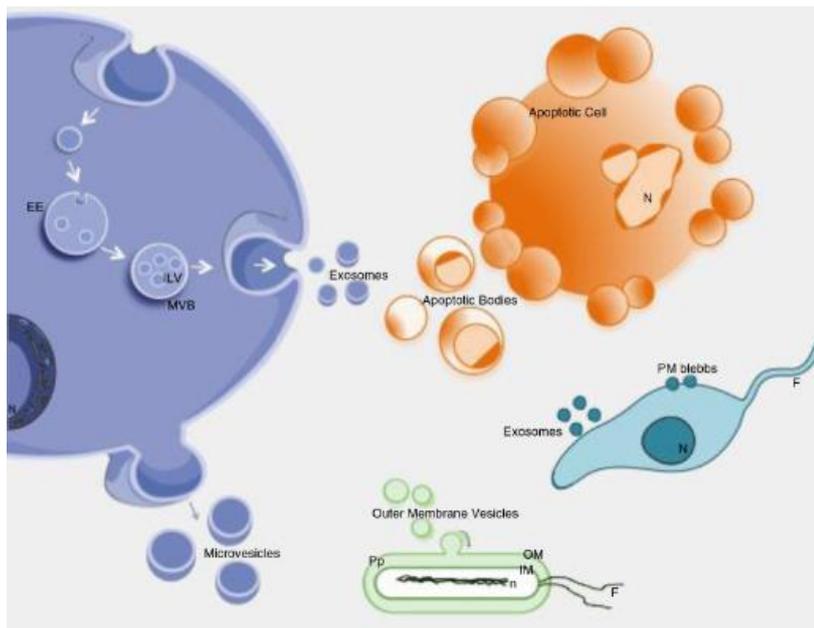
## 1.6 Vesículas extracelulares

As vesículas extracelulares (VEs) são estruturas liberadas por quase todos os organismos procarióticos e eucarióticos, através de sua membrana celular, são compostas por uma bicamada lipídica, e variam de 30 a 1000 nanômetros (nm), com função de transportar para o meio extracelular diversas moléculas produzidas no

interior da célula de origem, e podem ser divididas a depender se seu tamanho e sua biogênese (figura 14). Em sua composição encontramos lipídeos, ácidos nucleicos (DNA, mRNA, siRNA, miRNA) e proteínas (BROWN *et al.*, 2015; CRUZ *et al.*, 2018; YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015).

De acordo o MISEV (Minimal information for studies of extracellular vesicles) publicado em dezembro de 2023, os termos e nomenclaturas relacionadas as subdivisões da EVs, baseados nas vias de biogênese devem ser usados com cautela, de modo geral, o termo exossomo refere-se a EVs de compartimentos internos da célula que são liberados através dos corpos multivesiculares (MVBs), enquanto os ectossomos, conhecidos como microvesículas, micropartículas, referem-se a EVs da superfície celular. Diversos termos especializados também têm sido usados para EVs que surgem durante processos celulares específicos, como migrassomas, em processos de migração celular, ou corpos apoptóticos em morte celular programada (WELSH *et al.*, 2023).

Elas interagem com outros tipos celulares, a partir de endocitose ou fusão com a membrana plasmática da célula alvo, liberando o seu conteúdo no meio intracelular, ou através da sua ruptura, liberando o conteúdo no meio extracelular (RODRIGUES *et al.*, 2015).



**Figura 14. Biogênese das VEs.** **A.** Microvesículas são produzidos por brotamento externo e fissão da membrana plasmática; **B.** Exossomos que são formados dentro da rede endossomal e liberados após a fusão de corpos multivesiculares com a membrana plasmática. **C.** Corpos apoptóticos são liberados como bolhas de células em apoptose. Outros organismos bactérias e parasitas, também são capazes de secretar VEs (YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015).

Inicialmente, acreditava-se que as VEs tinham como função apenas a eliminação de componentes indesejados durante a maturação eritrocítica e secreção de receptores de transferrina, porém por volta de 1980, endossomas tardios intracelulares, que são estruturas celulares esféricas contendo muitas vesículas luminais, foram considerados parte do complexo processo pré-degenerativo. Naquele período esses resultados não foram considerados, pois tratavam de células morrendo, porém publicações que vem surgindo desde então demonstram a liberação dessas VEs por fusão entre corpos multivesiculares (MVB), contendo endossomos tardios e membranas plasmáticas de linfócitos T e B, células dendríticas, mastócitos, células neoplásicas, dentre outras (MEARS *et al.*, 2004; MECKES *et al.*, 2010; PETERS *et al.*, 1989; RAPOSO *et al.*, 1996, 1997; ZITVOGEL *et al.*, 1998).

Podem ser encontradas em diversos fluidos biológicos como lavado broncoalveolar, urina, soro e leite materno (ADMYRE *et al.*, 2008).

Agentes infecciosos também são capazes de produzirem VEs, como células bacterianas (BROWN *et al.*, 2015) e células fúngicas, essa produção já foi descrita em diversas espécies patogênicas como *Paracoccidioides brasiliensis* (VALLEJO *et al.*, 2011), *Cryptococcus neoformans* (RODRIGUES *et al.*, 2007), *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Sporothrix schenckii* e *Saccharomyces cerevisiae* (ALBUQUERQUE *et al.*, 2008), *Malassezia sympodialis* (GEHRMANN *et al.*, 2011), ademais, especificamente em *S. brasiliensis* (IKEDA *et al.*, 2018).

As VEs têm sido associadas a vários processos patológicos, incluindo transformação maligna e progressão de tumores, doenças infecciosas, alergias e autoimunidade (ADMYRE *et al.*, 2008; HARDING; HEUSER; STAHL, 1983; KOWAL; TKACH, 2019). Estudos primários mostram que células do sistema imunológico podem utilizar VEs, para mediar a apresentação de antígenos a outras células em nível sistêmico e células tumorais que liberam VEs que atuam como fonte antigênica para promover a ativação de células T citotóxicas (RAPOSO *et al.*, 1996; ZITVOGEL *et al.*, 1998).

VEs apresentam diversas propriedades que as tornam capazes e vantajosas como veículos terapêuticos, pois além deu potencial em atravessar barreiras biológicas, como a barreira hematoencefálica, possui uma meia-vida longa de

circulação, além de sua eficiência imunoestimulatória (HERRMANN; WOOD; FUHRMANN, 2021; MURPHY et al., 2019).

Com os recentes problemas da severa síndrome respiratória aguda (SARS) pelo coronavírus (SARS-CoV) surgiram dados envolvendo o uso de VEs para imunização viral, onde o domínio chave de reconhecimento do coronavírus e VEs que apresentam a proteína S do pico (spike) do coronavírus, foram indicados como possíveis vacinas contra o agente, além da incorporação de um pequeno domínio ou proteína S completa em VEs foi sugerida para SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2 (FU; XIONG, 2021; KUATE *et al.*, 2007).

### 1.6.1 Vesículas extracelulares de células dendríticas

As DCs podem controlar ativar e modular o início da resposta imune adaptativa, a partir do contato direto célula a célula, mas também a partir da liberação de suas VEs, que contém moléculas imunomoduladoras com estruturas e propriedades bioquímicas diferentes a depender da sua região intracelular de origem (KOWAL; TKACH, 2019).

VEs de DCs, são capazes de carrear MHC-I e MHC-II, além de moléculas coestimulatórias de células T, assim como suas células de origem. As DCs podem liberar abundantes peptídeos de complexos MHC de classe I e II transferidos dentro de seus exossomos para outras DCs virgens para uma iniciação eficiente de células T CD8 + (ANDRÉ *et al.*, 2004; ZITVOGEL *et al.*, 1998).

O potencial de exossomos derivados de DCs, como vacinas livres de células contra o câncer, tem sido bem elucidado (CHAPUT, 2006).

Em estudos anteriores, observou-se que VEs de *S. brasiliensis* aumentaram a capacidade de fagocitose de DCs contra leveduras do fungo, e que as VEs são capazes de modular a capacidade de DCs eliminarem o fungo (IKEDA *et al.*, 2018).

## 2 JUSTIFICATIVA

A atual epidemia de esporotricose no Brasil é preocupante e um grande problema de saúde pública. Existem diversos estudos relacionados a infecções pelo complexo *Sporothrix schenckii*, porém, ainda há poucas informações específicas sobre *S. brasiliensis* e a resposta imunológica frente a sua infecção.

É de grande importância o entendimento da ativação e da modulação da resposta imune frente a esporotricose, e as vesículas extracelulares de células dendríticas são potenciais moduladoras da resposta imunológica no hospedeiro, e seu melhor entendimento pode auxiliar a traçar caminhos que levam a protocolos eficazes de profilaxia e terapêutica da infecção.

O presente trabalho pode proporcionar maior conhecimento acerca das infecções causadas por *S. brasiliensis*, assim como parte dos mecanismos envolvidos na ativação e modulação do sistema imune frente a interação com vesículas extracelulares de células dendríticas primadas com leveduras de *S. brasiliensis*.

Uma vez que tais células são consideradas apresentadoras de antígenos profissionais e suas vesículas podem carregar características primordiais de suas células de origem, esse trabalho auxilia a uma melhor compreensão do papel destas VEs na carga fúngica, bem como na apresentação de antígenos do fungo aos linfócitos T CD4+ e CD8+, e na capacidade destas VEs na proteção contra a esporotricose experimental.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Gerais**

- Analisar o papel das vesículas extracelulares purificadas de células dendríticas na modulação da resposta imune na esporotricose experimental.

#### **3.2 Específicos**

- Análise das proteínas presentes nas VEs purificadas de DCs derivadas de medula óssea, previamente ativadas ou não com leveduras ou VEs de *S. brasiliensis*;
- Análise da capacidade de apresentação de antígeno das VEs de DCs, frente à interação prévia destas células com as VEs ou com leveduras do fungo, bem como, análise do tipo de células T ativadas;
- Análise da evolução da esporotricose subcutânea por *S. brasiliensis* em camundongos BALB/c, que receberam VEs de células dendríticas previamente primadas com o fungo ou suas VEs em esquema profilático, por meio de análise de

unidades formadoras de colônias, análise histopatológica das lesões e determinação do perfil de citocinas.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Animais utilizados**

Foram utilizados camundongos Specific Pathogen Free machos da linhagem isogênica BALB/c, de 8 a 12 semanas de idade. Todos os procedimentos foram realizados de acordo de acordo com os preceitos da Lei Federal no 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto Federal no 6.899, de 15 de julho de 2009, e das normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), em reunião de 12 de maio de 2022. O projeto foi aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais da USP, registrada com o n° 638 (certificado em anexo).

### **4.2 Fungo e preparo do inóculo**

Foram utilizadas leveduras das espécies *S. brasiliensis* cepa 5110 (ATCC® MYA-4823TM), cedida pela Profa. Dra. Leila Lopes de Bezerra, isolada de esporotricose cutânea felina no Rio de Janeiro. As culturas foram mantidas com repiques quinzenais em tubos de ágar Brain heart infusion (BHI) inclinado em estufa microbiológica à 37°C. Para os inóculos, as leveduras foram ressuspendidas em tampão fosfato-salina (PBS) 1x estéril e as leveduras foram contadas na câmara de Neubauer para definir as concentrações de uso, de acordo com cada experimento.

### **4.3 Isolamento de vesículas extracelulares de *S. brasiliensis***

O isolamento baseia-se em protocolos anteriores com VEs de outras espécies fúngicas (REIS *et al.*, 2019). Foi realizada uma cultura de leveduras de *S. brasiliensis* em ágar BHI, em placas de 90 mm, à 37°C por 6 dias. Após o cultivo, as leveduras foram removidas da placa, diluídas em PBS estéril, essa solução foi submetida a uma centrifugação à 4.000g por 15 minutos e à 15.000g por 15 minutos, para remoção de

células fúngicas e debris celulares, respectivamente. Em seguida, o sobrenadante foi submetido a uma ultracentrifugação à 100.000g por 1 hora, para precipitar as VEs. O pellet diluído em PBS estéril e submetido novamente à ultracentrifugação à 100.000g por 1 hora, para remoção de possíveis impurezas. O pellet final foi diluído em PBS estéril, filtrado em membrana de 0,2 µL e estocado à temperatura de – 80°C até o uso.

#### **4.4 Análise das Vesículas extracelulares dos fungos por Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)**

A concentração e tamanho médio das VEs foram estabelecidos pela técnica Nanoparticle Tracking Analysis, no aparelho NS300 (Nanosight® 3.4 Build 3.4.003 – Malvern Instruments Ltd.) disponível no departamento de Nefrologia da Universidade Federal de São Paulo, Campus Vila Clementino. As análises foram realizadas na viscosidade ajustada para água (0,9 cP), temperatura de 25°C, com detecção de 749 frames, na velocidade de 25 frames por segundo. Para todos os experimentos, as VEs foram ajustadas para concentração de  $17,3 \times 10^7$ , que foi a concentração média padronizada previamente pelo grupo (IKEDA *et al.*, 2018).

#### **4.5 Diferenciação e caracterização de células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDC) de camundongos**

As DCs foram obtidas segundo o protocolo de Inaba e colaboradores (INABA *et al.*, 1992). As células da medula óssea da tíbia e do fêmur dos camundongos, foram obtidas por meio de lavagem com RPMI. As células foram cultivadas em meio RPMI contendo 10 % de soro fetal bovino ultracentrifugado (para remoção das vesículas do soro) e suplementado com 50 ng/mL da citocina recombinante GM-CSF por 7 dias na estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. No 3° e 5° dia as células flutuantes foram removidas enquanto as células aderentes serão recultivadas em meio RPMI com GM-CSF. No 7° dia, as células aderidas foram removidas e seu perfil analisado por citometria de fluxo FACSCanto IITM.

Os marcadores de superfície CD11c e MHC-II foram analisados utilizando anticorpos anti-CD11c e anti-IA/I-E. Para análise por citometria de fluxo foi utilizado o aparelho FacsCanto II TM e os dados gerados, analisados com auxílio de software FlowJo (TREE STAR, Inc.-USA).

As subpopulações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades de FSc – Forward Scatter e SSc – Side Scatter, que avaliam o tamanho e a complexidade interna, respectivamente. Para distinguir células auto fluorescentes de células que expressam poucas concentrações de marcadores de superfície, utilizamos a metodologia de fluorescence- minus-one (FMO).

Controles FMO são determinados através da marcação das células com todos os anticorpos/marcadores exceto aquele que será analisado. Os valores obtidos nessa análise são considerados limite FMO, e todos os valores de fluorescência acima deste são considerados verdadeiros positivos.

O nível de fluorescência da população de interesse, obtido no canal no qual é medido um determinado marcador revela a auto-fluorescência inerente daquela população alvo. Esse valor permite estabelecer um limite com o qual se faz a distinção entre células auto florescentes daquelas que expressam um determinante que se liga ao anticorpo fluorescente usado para detectá-lo (HERZENBERG *et al.*, 2006).

#### **4.6 Purificação e caracterização de VEs purificadas de DCs**

Para obtenção de VEs de DCs *naive* (cultivo de 24 horas a 37°C/5% CO<sub>2</sub>), VEs de DCs primadas com leveduras de *S. brasiliensis* (2 leveduras para cada célula, por 24 horas a 37°C/5% CO<sub>2</sub>), ou VEs de DCs primadas com VEs do fungo (3 VEs para cada célula, por 24 horas a 37°C/5% CO<sub>2</sub>), as DCs, depois de diferenciadas, como descrito anteriormente, foram cultivadas nas condições citadas acima, em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino previamente ultracentrifugado para remoção de VEs presentes no próprio meio.

Posteriormente, as células dendríticas foram lavadas com PBS, e então, mantidas no mesmo meio de cultura (1 mL) e então, submetidas a repetidos processos de ultracentrifugação para obtermos as VEs. Para isso, os sobrenadantes de cultura foram coletados e centrifugados por 10 minutos a 500g, seguido por 10 min a 3.000g mais 15 minutos a 8.000g para remover os debris celulares.

Os pellets obtidos foram ressuspensos em 35 mL de PBS 1x, centrifugados novamente por 1 hora a 100.000g e então, ressuspensos em 300 uL de PBS 1x (EVs das células dendríticas), como descrito no guia MISEV (CRONEMBERGER-ANDRADE *et al.*, 2020; THÉRY *et al.*, 2018).

Para a caracterização das VEs (número de partículas e tamanho), as mesmas foram analisadas por nanoparticle tracking analysis (NTA), usando NanoSight NS300 e os resultados obtidos, analisados no software NTA 2.3. Como controle, utilizamos VEs obtidas de células dendríticas sem estímulo e os experimentos serão realizados em triplicata.

#### **4.7 Ensaio de profilaxia, histopatológico e contagem de unidades formadoras de colônia (CFU)**

Para os ensaios de profilaxia, utilizamos 4 camundongos/grupo, divididos da seguinte maneira: 3 grupos tratados com VEs purificadas de células dendríticas, grupo 1: somente VEs de DCs, grupo 2: VEs de DCs cultivadas com leveduras, grupo 3: VEs cultivadas com VEs do fungo, grupo 4: controle positivo (apenas infectados, sem profilaxia), ou seja, 4 grupos no total. Para este ensaio,  $17,3 \times 10^7$  VEs foram ajustadas em 100  $\mu$ L de PBS e aplicadas via intramuscular em região de coxa de membros posteriores.

Para o grupo controle positivo foi aplicado 100  $\mu$ L de PBS. Foram realizadas duas aplicações com intervalo de sete dias, e após sete dias da segunda aplicação foi realizado a infecção com  $10^7$  leveduras também ajustadas em 100  $\mu$ L inoculadas no subcutâneo dos animais em região sacral dorsal.

Os animais foram acompanhados em relação ao seu estado geral, peso e diâmetro médio da lesão. Ao final de 35 dias, os animais de cada grupo foram eutanasiados, e após a mensuração das lesões, foi coletado de forma asséptica, a lesão de pele. Uma parte da lesão da pele foi fixada em solução de formol tamponado a 10% por 48 horas, em seguida transferido para uma solução de álcool 70% e mantido até o processamento.

O fragmento fixado foi incluído em bloco de parafina, seccionado em cortes de 4  $\mu$ m, e corado pela coloração de Periodic Acid Schiff (PAS). Foi realizada a análise em microscópio óptico para avaliação da carga fúngica. Já, para análise do crescimento fúngico, parte da secreção da lesão de pele foi pesada, macerada em PBS estéril, e inoculada em placas de petri contendo ágar BHI, onde após 7 dias de cultivo, foi feita a contagem de CFU.

#### 4.8 Dosagem de citocinas

Para dosagem das citocinas produzidas nas diferentes situações do ensaio de infecção (profilaxia com VEs de DCs naive, VEs de DCs previamente cultivadas com leveduras de *S. brasiliensis*, VEs de DCs previamente cultivadas com VEs do fungo e grupo controle positivo, apenas infectado), fragmentos das lesões foram coletados pós eutanásia, mascarados com PBS, centrifugados, e com o sobrenadante dessas amostras dosamos algumas citocinas produzidas a partir da infecção. Utilizamos o *BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit*, que mensura as concentrações de Interleucina-2 (*IL-2*), Interleucina-4 (*IL-4*), Interleucina-6 (*IL-6*), Interleucina-10 (*IL-10*), Fator de Necrose Tumoral (*TNF*), Interferon- $\gamma$  (*IFN- $\gamma$* ) e níveis de proteína interleucina-17A (*IL-17A*).

Os ensaios de CBA fornecem um método de captura de um ou mais analitos com granulação e fluorescência conhecidos, tornando possível detectar analitos usando citometria de fluxo que identifica partículas com características de fluorescência tanto do grânulo quanto do detector. O reagente de detecção fornecido no kit é uma mistura de ficoeritrina (PE) conjugada a anticorpos, que fornecem um sinal fluorescente proporcional à quantidade de analito ligado.

Também foram realizadas as dosagens das citocinas *IL-10*, *TNF- $\alpha$* , e *IFN- $\gamma$*  pelo método de *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* de acordo com as recomendações do fabricante (R&D Systems). Resumidamente, microplacas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos primários overnight. Após a sensibilização, foi adicionado PBS + BSA 1% para bloquear os sítios livres por 1 hora, adicionado as amostras e o padrão, e deixado overnight.

Posteriormente, as placas foram incubadas com anticorpo secundário por 2 horas, adicionado a streptavidina por 20 minutos, em seguida, foi acrescentado o substrato TMB por 20 minutos e a reação foi parada com solução de ácido sulfúrico 2M. Foi realizado a leitura das placas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm.

#### 4.9 Ensaio de linfoproliferação

Para o ensaio de linfoproliferação, 4 camundongos BALB/c foram infectados por via subcutânea, uma adaptação do modelo de esporotricose experimental

subcutânea de Castro et al. (2013). Para isso, foram preparados inóculos de 100 µL contendo  $1 \times 10^7$  leveduras de *S. brasiliensis*, diluídos em PBS, para a infecção na região sacral dorsal dos animais, que foram inoculados por via subcutânea. Após 35 dias de infecção, as células de tecido linfóide foram coletadas.

Os linfonodos de cada animal foram removidos assepticamente e colocados em placas de petri, com o auxílio do êmbolo de uma seringa, os órgãos foram macerados em água destilada estéril para lise de hemácias. Em seguida, as células foram suspensas em 10 mL de meio RPMI em um tubo *falcon* de 15 mL. Os tubos foram centrifugados a 700 rpm, por 5 segundos, para remoção de debris e os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos. Os tubos foram centrifugados a 1.600 RPM, por 10 minutos, a 4 °C.

O sedimento de cada tubo foi ressuspensão com 2 mL meio RPMI. A concentração celular foi determinada, através de contagem em câmara de Neubauer. As células coletadas e quantificadas, foram ajustadas a  $2,5 \times 10^7$  em 250 µL de PBS/BSA1% contendo 1µM de 5(6)-carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester (CFSE) (Life Technologie) para sua marcação e incubadas à temperatura de 37°C, no abrigo de luz, sobre agitação constante por 10 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS/SFB 3% 3 vezes, e em seguida, ressuspensas com meio R10 suplementado (RPMI com 5% soro fetal bovino (SFB), com 1% de Aminoácidos Não Essenciais – (MEM NEAA (Gibco) e 1mM Piruvato de Sódio (Gibco).

O material obtido foi plaqueado, em placa de 96 poços com fundo em “U”, e distribuídas em grupos:

- Controle negativo - células sem marcação de CFSE
- Controle positivo - linfócitos CFSE + com 5 µL de fitohemaglutinina (PHA).
- Células CFSE + + VEs purificadas de DCs naive;
- Células CFSE + + VEs purificadas de DCs cultivadas com leveduras;
- Células CFSE + + VEs purificadas de células dendríticas cultivadas com VEs de leveduras.

A placa foi incubada por 5 dias (37°C, com 5% CO<sub>2</sub>). Após os 5 dias as células foram centrifugadas (500 x g, 4°C, 5 min), os sobrenadantes recolhidos e armazenados a -20°C. As células foram ressuspensas em 200 µL PBS e transferidas em tubos de citometria. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FACSCantoll,

BD) e a análise pelo software FlowJo. A proliferação é determinada pela diminuição da intensidade de fluorescência do CFSE. E são adquiridos 100.000 eventos.

Para distinguir células auto fluorescentes de células que expressam poucas concentrações de marcadores de superfície, é utilizado a metodologia de fluorescence-minus-one (FMO) (ROEDERER, 2001).

#### **4.10 Análise Proteômica**

Para identificarmos as proteínas existentes na VEs de células dendríticas infectadas ou não com as leveduras ou VEs de *S. brasiliensis*, as amostras de VEs das células dendríticas foram precipitadas em 10v de acetona e dissolvida em 8M de uréia, seguida pela redução e alquilação. Posteriormente, as amostras foram enviadas para a empresa Veritas, a qual procedeu com as análises através do equipamento Orbitrap Eclipse.

##### **4.10.1 Quantificação de Proteínas**

Para a quantificação de proteínas foi utilizado o método de Bradford com o reagente Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, cód. 500-0006). A curva padrão foi realizada com diferentes diluições de BSA, preparada a partir de estoque adquirido comercialmente (Protein Standard 200mg/mL, Sigma, Cód. # P5369-10 mL). As amostras foram distribuídas na microplaca em duplicatas de 20uL cada. A absorbância em 595 nm foi lida em espectrofotômetro (Molecular Devices, SpectraMax Plus 384). Através dos dados obtidos na quantificação, foi estimada a massa total de proteínas presentes nas amostras recebidas.

##### **4.10.2 Preparação das amostras para análise proteômica**

A preparação da amostra para a espectrometria de massas avançada consistiu basicamente em 2 etapas principais: i) redução e alquilação das proteínas e ii) digestão enzimática das proteínas com tripsina. Essa etapa foi realizada diretamente nos filtros de ultracentrifugação, conforme o método de preparação de amostra auxiliada por filtro denominado FASP.

Em resumo, 500uL das amostras foram concentrados até o volume de 50uL em sistema de ultracentrifugação Vivaspin 10kDa (GE Healthcare, cod. 28-9322-25, 0.5 mL) conforme instruções do fabricante. As amostras foram submetidas a redução das pontes de dissulfeto das proteínas pela adição direta no filtro de 200uL de bicarbonato de amônio 50 mM contendo uréia 8M e 50ug de DTT (ditiotreitól), seguida de incubação por 1 hora a 37OC.

A alquilação foi realizada pela adição de 250ug de I.A. (iodoacetamida) e incubação por 30 min em temperatura ambiente, no escuro. Após centrifugação a 10.000xg por 20 min, foram realizadas 2 lavagens do filtro com 100 µl de bicarbonato de amônio 50 mM contendo uréia 8M. Finalmente, foram adicionados 120uL bicarbonato de amônio 50 mM contendo a tripsina (0.25ug) e a incubação foi realizada a 37OC por 18h. O filtrado, contendo os peptídeos trípticos, foram coletados após centrifugação a 10.000g, secos em speed vac em tubos de baixa absorção de proteínas (*ependorf*) e aplicados em espectrômetro de massas, conforme descrito a seguir.

#### 4.10.3 Análise por espectrometria de massas avançada

A amostra preparada conforme descrito acima, foi aplicada no espectrômetro de massas de última geração: Orbitrap Eclipse (ThermoFisher) acoplado a um sistema de cromatografia nanoflow Nano LC-MS/MS (Dionex Ultimate 3000 RLSCnano System, Thermofisher). Cerca de 1ug da amostra foi injetado para análise. Os peptídeos foram separados em coluna Nanoease MZ peptide BEH C18 (130A, 1.7um, 75umx250mm, Waters) 300 nL/min utilizando um gradiente de 4-50% de acetonitrile em 90 minutos.

Os dados foram adquiridos no MS1 na faixa de M/Z 375–1500 (120.000 de resolução, AGC target 1 E6 com tempo máximo de injeção de 100 ms). Os íons mais abundantes foram submetidos a MSMS com energia de colisão de 30%, janela de isolamento da precursora de 1.2 m/z, AGC target 1E5 e resolução de 15.000.

Os dados brutos (arquivos.raw) foram convertidos a mzXML e processados utilizando o algoritmo Comet (v. 2018). Foi utilizado o banco de dados Uniprot para fungo. Os peptídeos identificados que atingiram o critério máximo de 3% de erro pelo

Peptide Prophet foram utilizados para a extração da intensidade para quantificação pelo algoritmo Xpress.

Os peptídeos e suas intensidades foram agrupados para gerar a intensidade da proteína utilizando um script na linguagem R.

#### 4.11 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA e múltiplas comparações pelo teste de Tukey (ZAR, 2010), com o auxílio do *software GraphPad® Prism®* 6. Serão considerados estatisticamente significantes os resultados com  $p < 0.05$ .

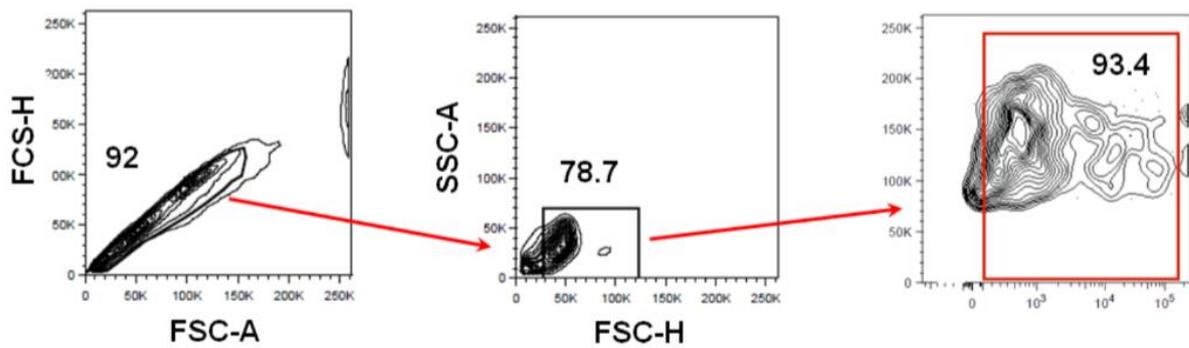
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Obtenção e análise das DCs e suas VEs

Para obtenção das VEs, DCs foram geradas a partir da cultura de células da medula óssea de camundongos da linhagem BALB/c, cultivadas com GM-CSF, como descrito em material e métodos. Posteriormente, as DCs foram analisadas em citometria de fluxo, para análise das moléculas de superfície MHC-II e CD11c (figura 15). Como podemos observar, as células diferenciadas com GM-CSF, apresentaram dupla marcação para moléculas de MHC-II e CD11c, características de DCs.

Tabela 1 – Caracterização de células dendríticas, e relação de anticorpos e seus respectivos fluoróforos e clones.

Anticorpo	Fluoróforo	Clone
CD11c	APC	HL3 (BD)
MHC II	PE	2G9 (BD)

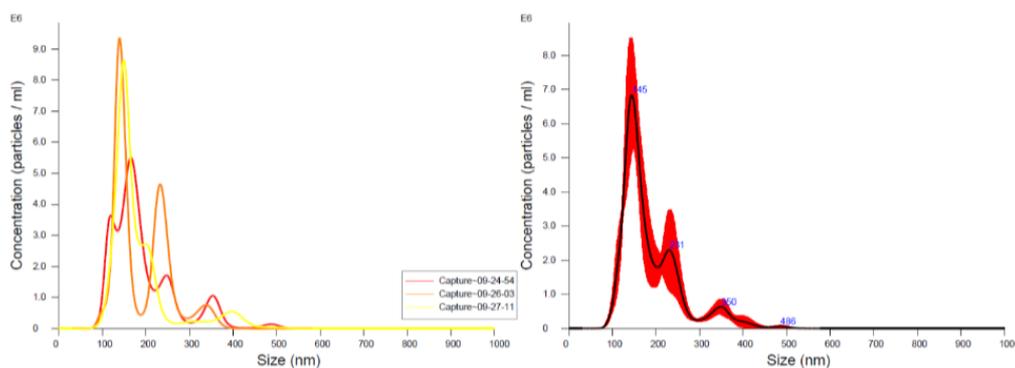


**Figura 15. Citometria de fluxo das DCs.** A medula óssea de camundongos BALB/c foi obtida e cultivada na presença de GM-CSF para gerar DCs, as quais foram analisadas com os marcadores específicos de CD11c e MHC-II e analisadas por citometria de fluxo.

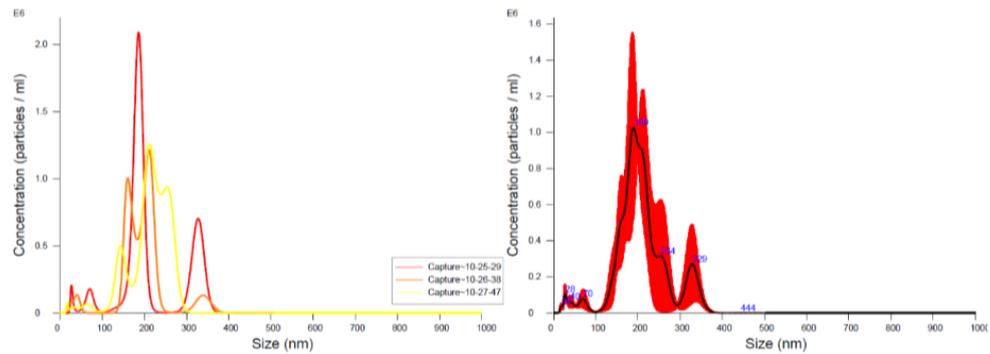
## 5.2 Análise das vesículas extracelulares por Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

As VEs de *S. brasiliensis* foram obtidas a partir da diluição de leveduras cultivadas em meio sólido BHI, e ultracentrifugadas por duas vezes em 100.000 g por 60 minutos na Ultracentrífuga Optima XE 90 da Beckman Coulter. Posteriormente, as DCs que foram obtidas, foram também ultracentrifugadas para obtenção de suas VEs. Além disso DCs, foram cultivadas com leveduras de *S. brasiliensis*, e outras DCs foram cultivadas com as VEs dos fungos, ambas os grupos por 24 horas, e então as VEs totais dessas diferentes condições, foram obtidas por ultracentrifugação, analisadas por NTA (figura 16) e ajustadas para os experimentos de infecção.

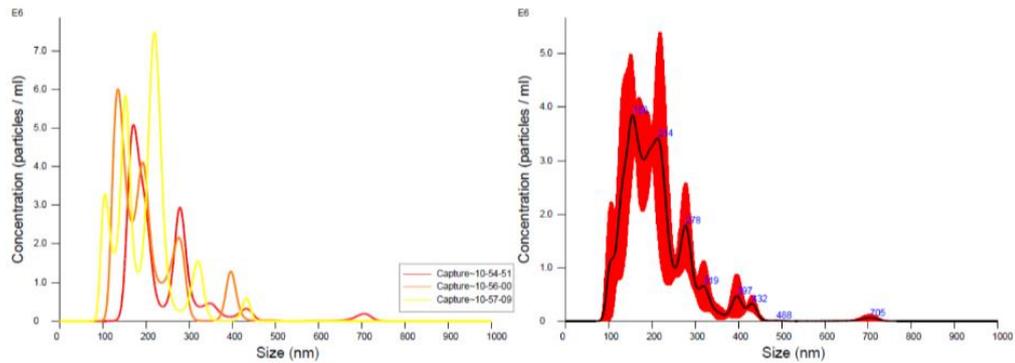
### A.



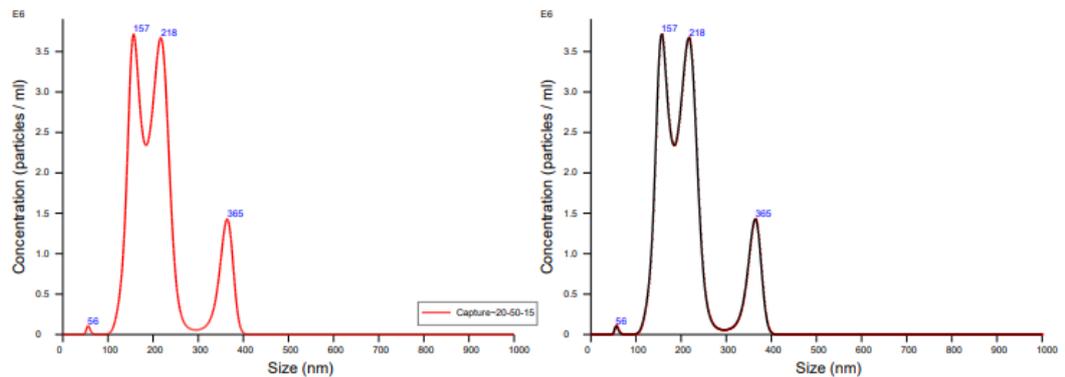
B.



C.



D.



**Figura 16. Análise e dosagem das VEs por NTA.** O gráfico apresenta a distribuição de VEs na amostra, no eixo x temos o tamanho das VEs em nm, e no eixo y temos a concentração de partículas por mL. A linha preta representa o valor médio e a faixa vermelha o desvio padrão, obtidos de 3 análises da mesma amostra. (A) VEs purificadas a partir de DCs sem ativação prévia (Concentração:  $5,60 \times 10^8 \pm 9,48 \times 10^6$  partículas / ml) com tamanho médio de 159,4 nm.; (B) VEs purificadas a partir de DCs que interagiram por 24 horas com leveduras do fungo (Concentração:  $9,44 \times 10^7 \pm 8,44 \times 10^6$  partículas / ml) com tamanho médio de 182,5 nm.; (C) VEs purificadas de leveduras de *S. brasiliensis*

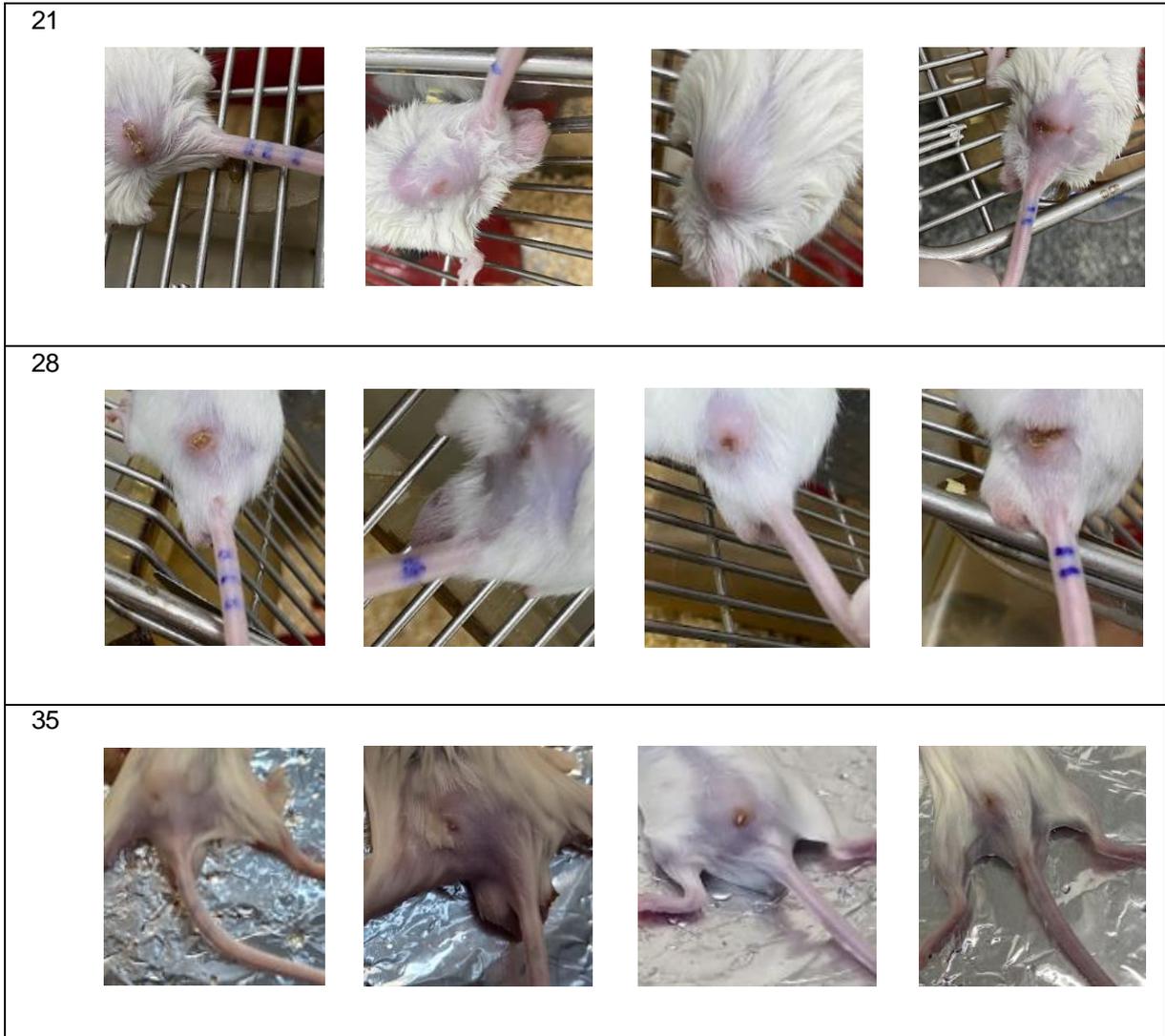
(Concentração:  $5,27 \times 10^8 \pm 6,69 \times 10^7$  partículas / ml) com tamanho médio de 229,7 nm.; (D) VEs purificadas com DCs que interagiram por 24 horas com VEs de fungo (Concentração:  $3,87 \times 10^8 \pm 0,00 \times 10^0$  partículas / ml) com tamanho médio de 213,7 nm.

Assim observamos que, assim como as células fúngicas produzem VEs, células dendríticas murinas naive, ou cultivadas com o fungo, ou até mesmo com a vesícula do fungo também são capazes de produzir VEs.

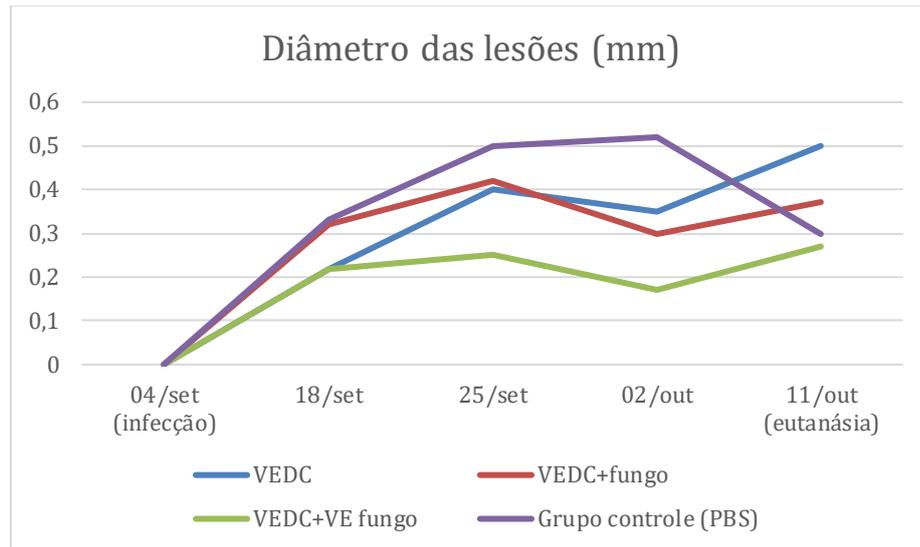
### 5.3 Lesões

Com os ensaios de profilaxia e infecção, acompanhamos diariamente o estado geral dos animais e as lesões desenvolvidas durante a evolução da infecção, nos camundongos tratados ou não com VEs. Nossos resultados (figura 18) demonstram diminuição do tamanho das lesões no último dia de mensuração, nos camundongos não tratados do grupo controle. No entanto, ao decorrer dos 35 dias de infecção, os animais que receberam as VEs de forma profilática, exibiram lesões menores, e mais controladas, quando comparados ao grupo controle positivo. E em todos os grupos testados, ao final dos 35 dias de infecção, apesar de não haver diminuição significativa no tamanho das lesões, havia uma melhora do aspecto geral da lesão, como diminuição do edema, formação de crostas, direcionando a uma cicatrização e coincidindo com uma característica de regressão da infecção, como já é conhecido da doença, como demonstrado na figura 17.





**Figura 17. Figuras representativas das lesões de pele formada no local de inoculação do fungo.** Observa-se um aumento de volume, com formação nodular na região sacral dorsal, com ulcerações. Os camundongos tratados ou não com VEs e posteriormente infectados com leveduras de *S. brasiliensis*, foram acompanhados durante o período de 35 dias, para análise da evolução da doença.



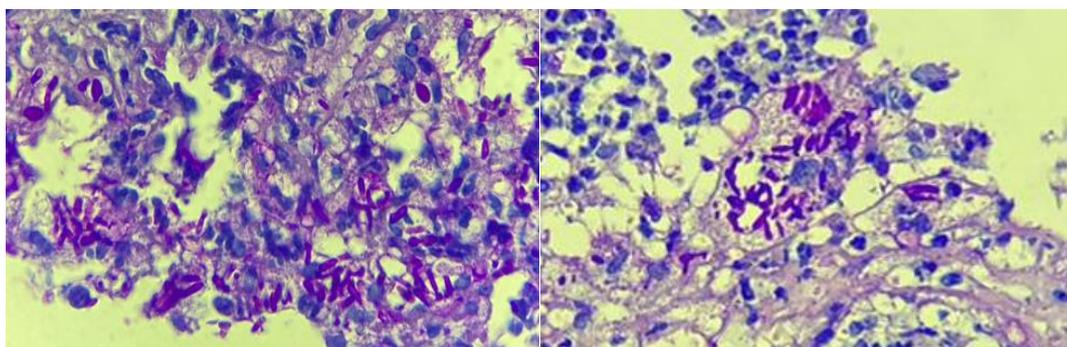
**Figura 18. Progressão da lesão de pele na infecção no modelo murino.** O tamanho da lesão em animais que receberam as VEs de forma profilática, modo geral foi menor em relação aos animais que não receberam a profilaxia (grupo controle), porém no terço final da infecção, os animais que não receberam a profilaxia (grupo controle) tiveram uma regressão mais significativa do tamanho da lesão, quando comparado aos animais tratados. **VEDC** (vesícula extracelular de célula dendrítica naive), **VEDC+fungo** (vesícula extracelular de célula dendrítica previamente cultivada cum fungo), **VEDC+VE fungo** (vesícula extracelular de célula dendrítica previamente cultivada com vesículas extracelulares de *S. brasiliensis*).

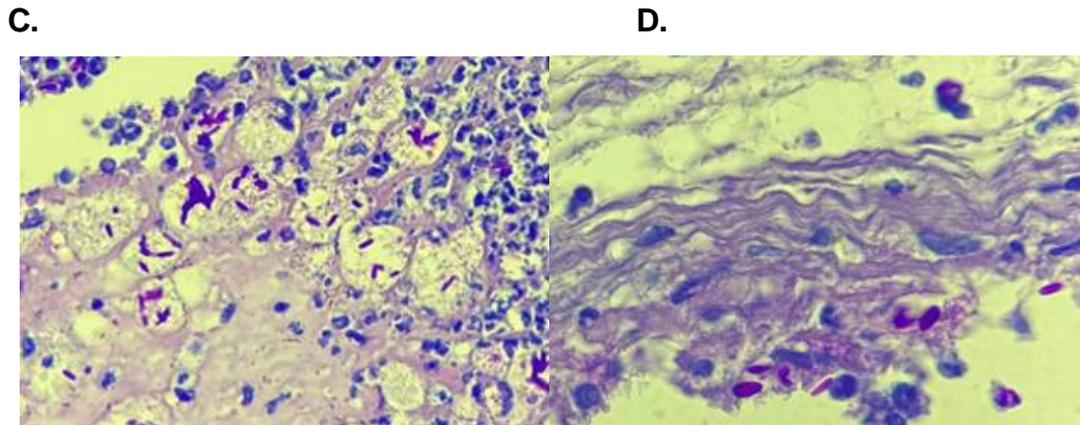
#### 5.4 Análise histopatológica

Após a eutanásia, amostras de fragmentos das lesões foram coletadas e encaminhadas para processamento e confecção de lâminas, que foram coradas em Ácido Periódico de Schiff (PAS), para análise histopatológica das lesões, a fim de avaliar e complementar informações a respeito da carga fúngica, e padrões de lesão. Ao total foram 16 lâminas, obtidas de 16 animais (4 grupos com 4 animais). Nota-se, de acordo com a figura 19, que de modo geral os animais que receberam VEs de forma profilática, apresentaram uma carga fúngica menor, com um intenso infiltrado inflamatório, composto principalmente por neutrófilos e linfócitos, e com resultados compatíveis com a análise de CFU.

**A.**

**B.**





**Figura 19. Análise histológica da lesão de pele de animais após 35 dias de infecção. Coloração em PAS, aumento de 100x. A.** Controle positivo: Nota-se uma grande quantidade de estruturas leveduriformes coradas na amostra. **B.** Nota-se uma menor quantidade de leveduras e muitas células inflamatórias em animal que recebeu a profilaxia com VEs de DCs naive, quando comparado ao controle. **C e D.** Nota-se a menor frequência de leveduras nos animais que receberam profilaxia com VEs de DCs ativadas com o fungo, ou com VEs do fungo, respectivamente.

### 5.5 Ensaio de profilaxia com vesículas de células dendríticas

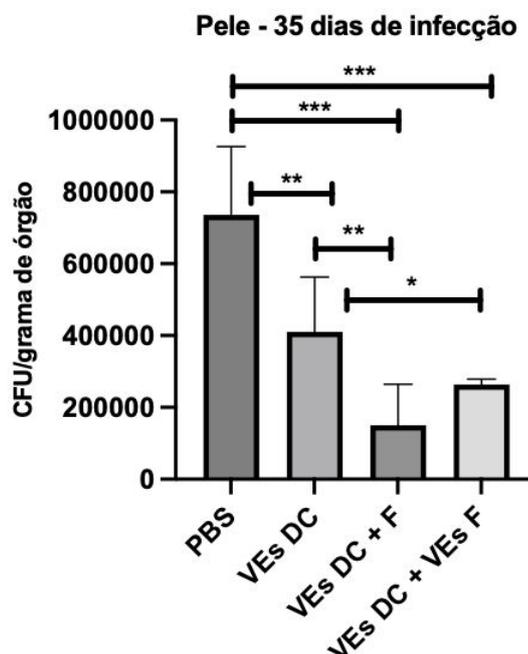
Para análise da capacidade das VEs em modular a resposta imune e a disseminação do processo infeccioso, camundongos BALB/c foram imunizados com VEs purificadas de DCs *naive*, VEs purificadas de DCs que interagiram com leveduras do fungo e VEs de DCs que interagiram com VEs previamente obtidas do fungo, a fim de realizar uma análise comparativa dos protocolos profiláticos com vesículas de DCs. As VEs ( $17 \times 10^7$  partículas/ml) foram administradas no membro posterior dos animais, em via intramuscular, com duas aplicações a cada 7 dias. Sendo assim, os camundongos foram divididos em 4 grupos.

- Grupo controle positivo (apenas infecção, não receberam VEs profilaticamente);
- Grupo que recebeu VEs de DCs naive;
- Grupo que recebeu VEs de DCs cultivadas com leveduras de *S. brasiliensis* 5110;
- Grupo que recebeu VEs de DCs cultivadas com VEs de leveduras de *S. brasiliensis* 5110.

Posteriormente, os animais foram infectados pela via subcutânea e acompanhados, após 35 dias, foi realizada a eutanásia dos animais e fragmentos de lesão foram coletados, cultivados em ágar BHI, e passados 7 dias, as colônias foram contadas. Como mostra a figura 20, os camundongos que receberam duas doses de

VEs purificadas de DCs de forma profilática, tiveram diminuição significativa da carga fúngica da lesão, quando comparados ao grupo controle cujos animais receberam apenas inoculações de PBS, previamente a infecção. Por conseguinte, dentre os grupos que receberam a profilaxia, temos as VEs previamente ativadas demonstrando uma melhor característica protetiva.

De acordo com esses resultados, é possível observarmos que a profilaxia com VEs de DCs ativadas com o fungo, resultou numa melhor proteção (menor carga fúngica), seguida pela profilaxia com VEs de DCs ativadas com VEs fúngicas, e por último, a profilaxia com VEs de DCs naive (sem ativação prévia), o que nos direciona a uma resposta específica mais eficiente, quando comparada a uma resposta inespecífica.



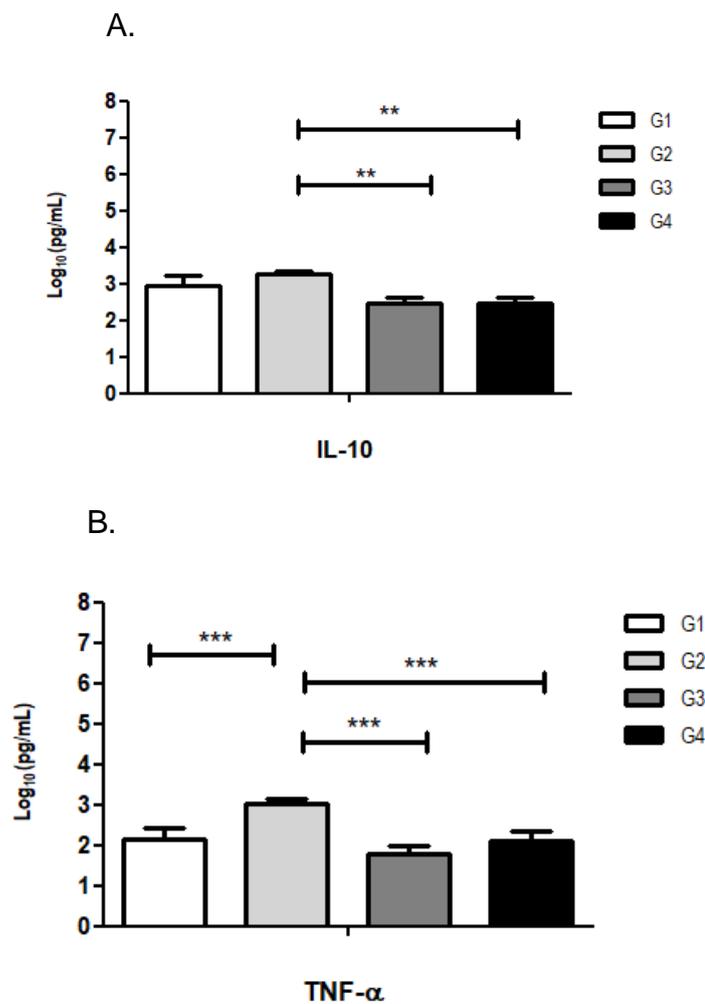
**Figura 20. Resultado da carga fúngica da lesão, na infecção no modelo murino.** Com o cultivo do macerado da lesão de pele, coletado no 35º dia de infecção, observa-se que a carga fúngica da lesão dos animais que receberam a profilaxia com VEs de DCs, ativadas ou não com o fungo e VEs fúngicas, foi significativamente menor em relação ao grupo controle positivo. Foi aplicado a análise One way ANOVA, com múltiplas comparações pelo teste de Tukey, foi considerado a significância de \* $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,005$  em relação ao controle.

## 5.6 Análise das citocinas

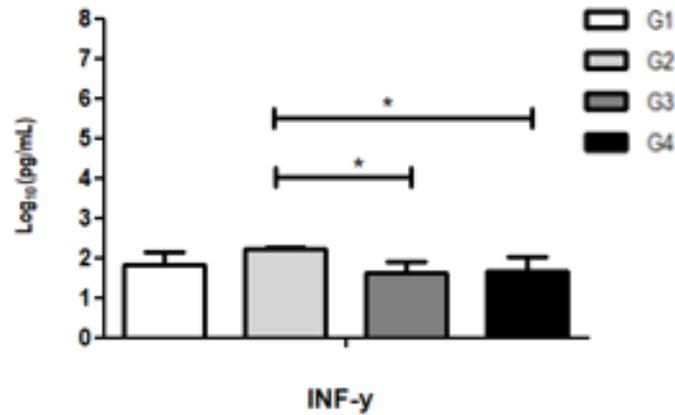
Com o intuito de analisar as citocinas produzidas durante a infecção experimental dos diferentes grupos do ensaio de profilaxia, sendo o primeiro grupo,

animais que receberam de forma profilática, VEs de DCs naive, o segundo grupo, animais que receberam VEs de DCs previamente ativadas com leveduras de Sb 5110, e o terceiro grupo, controle positivo.

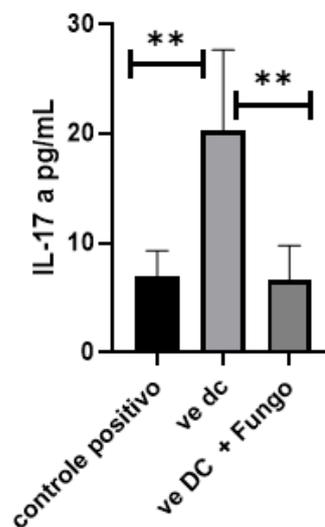
Após o protocolo de profilaxia, infecção e eutanásia, coletamos fragmentos de pele. Parte do material foi destinado para cultivo, outra parte foi macerada em PBS 1x estéril, centrifugado para remoção dos debris e coletado o sobrenadante, que foi posteriormente armazenado em -20 C, para posterior análise (figura 21), utilizando o ELISA convencional e *BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine*



C.



D.



**Figura 21. Dosagem de citocinas.** Citocinas dosadas (pg/ml) a partir do tecido de camundongos que foram imunizados com VEs de DC naíve ou VEs de DCs cultivadas com leveduras de *S. brasiliensis*, e com VEs de DCs ativadas VEs das leveduras por 35 dias (G1: VE de DC naíve, G2: VE de DC + fungo, G3: VE de DC +VE de fungo, G4: Controle positivo -PBS). **A.** IL-10 – Aumento de IL-10 nos animais que receberam VEs de DC ativadas com fungo. **B.** TNF-alfa – Intensa produção desta citocina lesão de animais que receberam VEs de DCs ativadas com o fungo. **C.** IFN-gama – Aumento IFN-gama na lesão de animais imunizados com VEs de DCs ativadas com o fungo. **D.** IL-17a – Aumento significativo de IL-17a nos animais imunizados com VEs de DC naíve. Foi aplicado a análise One way ANOVA, com múltiplas comparações pelo teste de Tukey, foi considerado a significância de \* $p < 0.05$  e \*\*  $p < 0,005$  em relação ao controle.

## 5.7 Ensaio de linfoproliferação

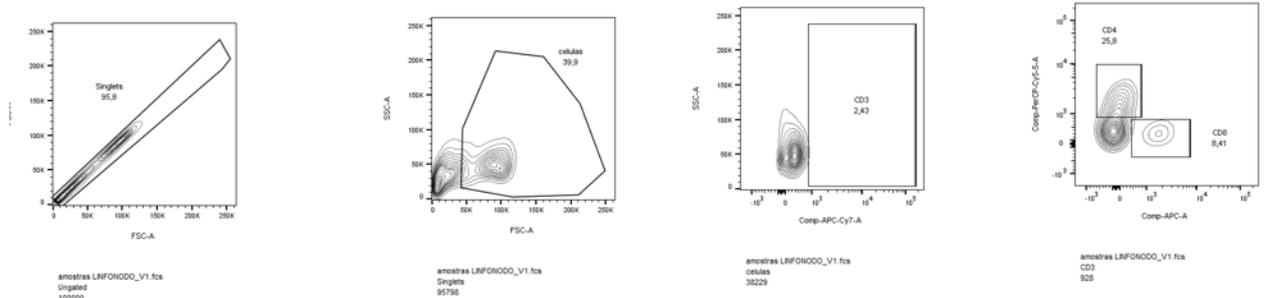
Para analisarmos a capacidade das VEs em reestimar o sistema imune após infecção, camundongos foram previamente infectados com leveduras de *S.*

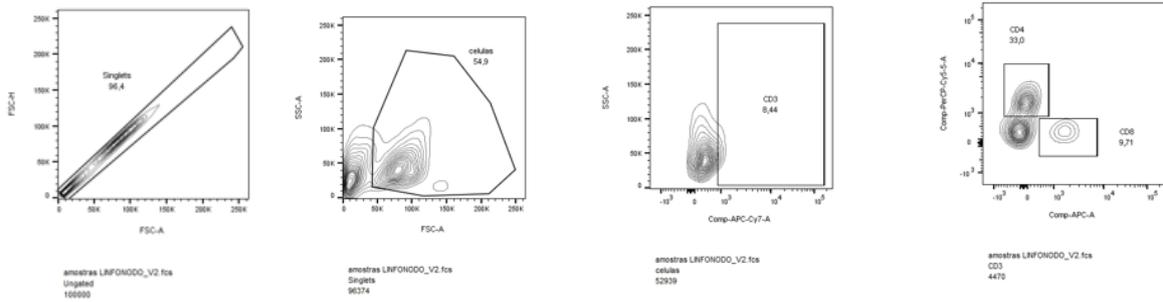
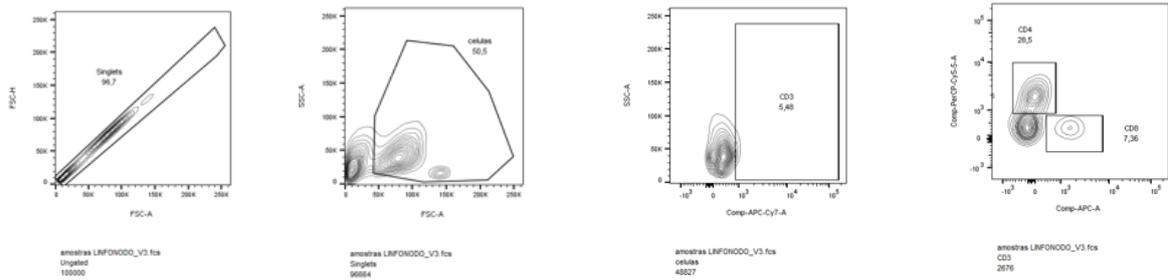
*brasiliensis* 5110, e após 35 dias de infecção, esses animais foram eutanasiados, e os linfonodos foram coletados, as células totais dos linfonodos foram quantificadas, plaqueadas e reestimuladas com VEs (VEs de DCs naive, VEs de DCs que foram primadas leveduras e VEs de DCs primadas com VEs das leveduras). Então, para entendermos a participação de células T CD4+ e CD8+ nesse processo, estas células foram marcadas e analisadas em relação a sua capacidade de linfoproliferação frente a interação com essas VEs. Os resultados mostrados na figura 23 indicam que ocorreu um aumento na porcentagem de células T CD4+ (4,72%) em relação ao CFSE (0,36%) somente quando reestimulamos as células com VEs de DCs naive, que são DCs não estimuladas previamente, direcionando a uma resposta inespecífica, justificada por características inerentes a própria APC, assim, de acordo com esses resultados, as VEs de DCs estimuladas com fungo ou suas VEs fúngicas, poderiam inibir a resposta imune ao invés de estimulá-la, ou até mesmo resultar em outro tipo de resposta que por hora não elucidamos bem.

Tabela 2 – Caracterização de células T CD4+ e CD8+, relação de anticorpos e seus respectivos fluoróforos e clones.

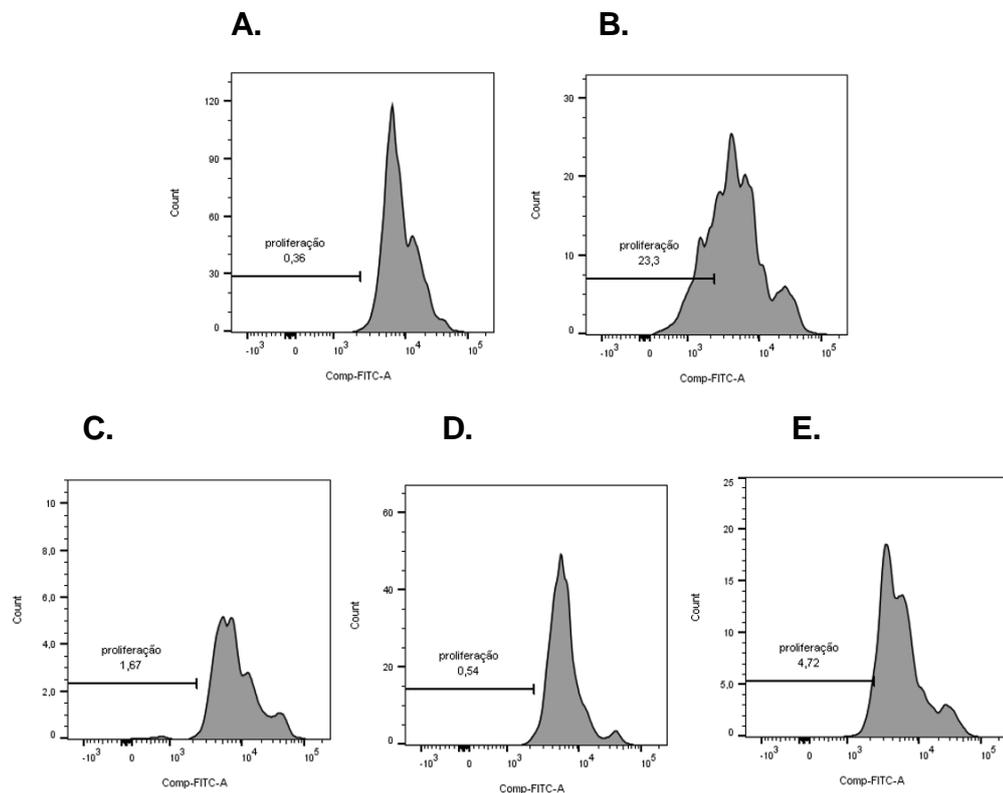
Anticorpo	Fluoróforo	Clone
CD3	APCCY7	145-2C11
CD4	PERCP	RM4-5
CD8	APC	53-6.7

A.



**B.****C.**

**Figura 22. Caracterização de subpopulações das células coletadas do linfonodo (na ordem: células totais, linfócitos totais, linfócitos T CD3+, linfócitos T CD8+ e T CD4+).** A. Células de linfonodo obtidas de camundongos infectados, e reestimulados com VE de DC ativadas com vesícula fungo. B. Células reestimulados com VE de DC ativadas com fungo. E. Células reestimulados com VE de DC naiva



**Figura 23. Ensaio de linfoproliferação, com a expressão de linfócitos T CD4+.** **A.** Gráfico representativo da marcação com *Carboxyfluorescein succinimidyl ester* (CFSE) mostrando a fluorescência basal emitida pela célula alvo marcada. **B.** Controle positivo - Phitohemaglutinina (PHI). **C.** Expressão de CD4+ por linfócitos obtidos de camundongos infectados, e reestimulados com VE de DC ativadas com vesícula fungo. **D.** Expressão de CD4+ por linfócitos reestimulados com VE de DC ativadas com fungo. **E.** Expressão de CD4+ por linfócitos reestimulados com VE de DC naive.

## 5.8 Proteômica

A definição das proteínas presentes nas VEs das DCs, nas VEs de DCs cultivadas com leveduras e VEs de DCs cultivadas com VEs fúngicas são importantes para o entendimento da capacidade, e os mecanismos tanto das DCs, dos fungos e das suas VEs, em modularem a resposta imunológica de forma protetiva, agindo em prol do hospedeiro e/ou trabalhando em prol do agente infeccioso, auxiliando no escape dos mecanismos de proteção do hospedeiro.

Inicialmente foi realizada a determinação concentração proteica, que foi solúvel em cada amostra, pelo método de Bradford. Os valores obtidos foram abaixo do limite inferior de detecção do método, indicando a presença de 10 ug, ou menos, de proteína total. Devido à baixa quantidade de proteína optou-se por utilizar uma metodologia e equipamento de última geração e alta sensibilidade em conjunto com o método de preparação e digestão das amostras diretamente nos filtros de concentração, conforme descrito em métodos. A seguir estão os resultados da análise por espectrometria de massas avançada das 3 amostras, para a identificação das proteínas presentes nas VEs.

Tabela 3 - Número total de proteínas identificadas em cada uma das amostras analisadas.

AMOSTRAS	NÚMERO TOTAL DE PROTEÍNAS
VEs de DCs naive	2037
VEs de DCs cultivadas com leveduras de 5110	1558
VEs de DCs cultivadas com VEs de <i>S.</i> <i>brasiliensis</i> 5110	1440

A área dos picos obtidos de cada proteína foi utilizada como indicativo aproximado de abundância.

Tabela 4 - Top proteínas (abundância maior que 1%) identificadas na amostra contendo VEs de DC, sem ativação prévia, em ordem decrescente de abundância estimada.

<b>VE de DC naive</b>	
<b>area%</b>	<b>Protein names</b>
12%	Far11/STRP C-terminal domain-containing protein
10%	Transcriptional regulatory protein RXT2 N-terminal domain-containing protein
8%	SMP domain-containing protein
6%	HECT-type E3 ubiquitin transferase (EC 2.3.2.26)
6%	DDT domain-containing protein
4%	Uncharacterized protein
4%	Aminoglycoside phosphotransferase domain-containing protein
3%	leucine--tRNA ligase (EC 6.1.1.4) (Leucyl-tRNA synthetase)
3%	HpcH/HpaI aldolase/citrate lyase domain-containing protein
3%	Zn(2)-C6 fungal-type domain-containing protein
3%	Nucleolar GTP-binding protein 1
3%	Uncharacterized protein
3%	Pre-mRNA-splicing factor 18
3%	Mitochondrial ribosomal protein subunit S4
2%	Uncharacterized protein
2%	Uncharacterized protein
2%	Zn(2)-C6 fungal-type domain-containing protein
2%	Uncharacterized protein
2%	DNA mismatch repair protein HSM3 N-terminal domain-containing protein
2%	Major facilitator superfamily (MFS) profile domain-containing protein
2%	F-box domain-containing protein
2%	STE/STE20/YSK protein kinase
1%	Alternative oxidase
1%	NADH-ubiquinone oxidoreductase 29.9 kDa subunit, mitochondrial
1%	Uncharacterized protein
1%	DUF1479 domain protein
1%	Glycosyltransferase family 31 protein
1%	EF-hand domain-containing protein
1%	Luciferase-like domain-containing protein
1%	PNPLA domain-containing protein

1%	Concentrative nucleoside transporter, CNT family
1%	Mur ligase central domain-containing protein

Tabela 5 - Top proteínas (abundância maior que 1%) identificadas na amostra contendo VEs de DC que foram previamente ativadas com leveduras de *S. brasiliensis*, em ordem decrescente de abundância estimada.

<b>VE de DC com fungo</b>	
<b>area%</b>	<b>Protein names</b>
4%	FAD/NAD(P)-binding domain-containing protein
3%	DNA mismatch repair protein HSM3 N-terminal domain-containing protein
3%	Histone H3
2%	Uncharacterized protein
1%	Histone H4
1%	PAN2-PAN3 deadenylation complex subunit PAN3 (PAB1P-dependent poly(A)-specific ribonuclease) (Poly(A)-nuclease deadenylation complex subunit 3) (PAN deadenylation complex subunit 3)
1%	SMP domain-containing protein
1%	Major facilitator superfamily (MFS) profile domain-containing protein
1%	Uncharacterized protein
1%	VPS9 domain-containing protein
1%	Transcription factor domain-containing protein
1%	Polyketide synthase

Tabela 6 - Top proteínas (abundância maior que 1%) identificadas na amostra contendo VEs de DC que foram previamente ativadas com VEs de leveduras de *S. brasiliensis*, em ordem decrescente de abundância estimada.

<b>VE DC com VE de fungo</b>	
<b>area %</b>	<b>Protein names</b>
4%	Uncharacterized protein
3%	DNA mismatch repair protein HSM3 N-terminal domain-containing protein
2%	Histone H4
1%	Histone H3
1%	Uncharacterized protein
1%	PAN2-PAN3 deadenylation complex subunit PAN3 (PAB1P-dependent poly(A)-specific ribonuclease) (Poly(A)-nuclease deadenylation complex subunit 3) (PAN deadenylation complex subunit 3)
1%	Actin beta/gamma 1

Em relação às análises das VEs purificadas de DCs, observamos proteínas envolvidas em processo de autofagia, migração, moduladoras de ligação de lipídeos, mediadora de Rho, superóxido desmutase, hidrolases, entre outras, as quais ainda não identificamos suas funções, mas que necessitam de uma análise mais cuidadosa, a qual está sendo realizada por colaboradores com expertise na área e deve estar pronta para a publicação do trabalho científico. Em relação as VEs de DC cultivadas previamente com as leveduras de *S. brasiliensis* 5110, observamos, dentre as mais prevalentes, a presença de histonas 3 e 4, enzimas citoplasmáticas envolvidas no turnover de mRNA, componentes lipídicos presentes em microrganismos, proteínas reguladoras de conteúdo endossomal e nas VEs de DCs cultivadas com VEs de leveduras, encontramos dados semelhantes com as cultivas com as próprias leveduras, como histonas e enzimas citoplasmáticas envolvidas no turnover de mRNA (interpor – [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)).

A previsão de ligação precisa peptídeo-MHC é importante para se verificar a capacidade de identificação de epítomos de células T e, portanto, para estudos de possíveis protocolos profiláticos e terapêuticos, baseadas em peptídeos e proteínas. Para tal análise, utilizamos a ferramenta computacionais, como por exemplo o servidor IEDB Analysis Resource, que é amplamente utilizado para previsão de ligação de classe II de MHC, com altos níveis de especificidade (DIMITROV *et al.*, 2010).

Em uma rápida análise utilizando essa ferramenta, nenhuma top proteína identificada nas amostras de VE de DC, VE DC cultivada com fungo, demonstrou uma sequência de peptídeos com um bom score de ligação com MHCII.

Apenas uma top proteína proveniente da VE de DC cultivada com VE do fungo, apresentou um bom escore de compatibilidade de ligação com MHC II: Actin beta/gama 1, cujas sequências peptídicas e score são considerados bons no direcionamento de uma boa ligação peptídeo-MHC:

- RQEYDESGPSIVHRS: 0,81;
- LRQEYDESGPSIVHR: 0,79;
- ELRQEYDESGPSIVH: 0,65.

As actinas citoplasmáticas e suas isoformas ( $\beta$ - e  $\gamma$ -) contribuem grandemente para processos celulares, como interações celulares, polarização, motilidade e divisão celular (DUGINA; SHAGIEVA; KOPNIN, 2022), porém, não se sabe muito a respeito de sua ligação específica ao MHC-II.

Quando o comparamos o CFU dos protocolos de profilaxia, observamos que a VE de DC cultivada com a VE do fungo, resultou numa boa diminuição da carga fúngica, quando comparada ao grupo controle ou ao grupo que recebeu profilaxia com VE de DC naive. Obviamente, precisamos de uma análise muito mais minuciosa a respeito dessas ligações, para checar o real impacto dessa proteína, e outras proteínas e sequência de peptídeos, que ainda não foram analisadas e estão fora da lista de top proteínas, porém podem ser importantes.

## 6 DISCUSSÃO

A esporotricose é uma doença infecciosa fúngica que afeta principalmente o tecido cutâneo, subcutâneo, sistema linfático e dependendo da virulência da cepa, e do sistema imune do hospedeiro pode se disseminar para outros órgãos.

Com os resultados podemos observar, primeiramente por meio da análise NTA, a confirmação da produção de VEs por células dendríticas cultivadas com o fungo *S. brasiliensis*, ou com suas VEs, mostrando que o mecanismo de formação de VEs é mantido em culturas celulares, como já relatado por ZITVOGEL e colaboradores, 1998, assim como em culturas exclusivamente fúngicas do gênero *Sporothrix*, como foi observado anteriormente por Ikeda, 2018, e como já foi descrito na espécie *S. schenckii* (ALBUQUERQUE et al., 2008).

Essas VEs têm a capacidade de carrear diversos tipos de moléculas, como fatores de virulência no caso das VEs fúngicas, ou fatores inerentes a célula de defesa, como no caso de VEs provenientes de DCs, que podem interagir com outras células do hospedeiro e modular a sua resposta.

As VEs vem sendo relatadas como possíveis aliadas a protocolos profiláticos, terapêuticos, e como marcadores diagnósticos, seja em processos patológicos neoplásicos, degenerativos, metabólicos e infecciosos, lançando-se mão de vesículas obtidas de células-tronco embrionárias e adultas, células sanguíneas, imunológicas, do sistema nervoso, até células tumorais e infecciosas (ARIAS et al., 2019; OPHELDERS et al., 2016; PÉREZ-MACEDONIO et al., 2022; RETANA MOREIRA et al., 2022; ROVIRA et al., 2017).

Existem diversos dados sugerindo o uso de VEs oriundas de microrganismos, para controle dos respectivos processos infecciosos, sejam eles bacterianos, fúngicos ou parasitários (CHEN et al., 2020; SILVERMAN et al., 2010; ZAMITH-MIRANDA et al.,

2021). Porém pouco se sabe sobre os efeitos das VEs provenientes da interação dos microrganismos com DCs.

Nos nossos ensaios, com o cultivo por sete dias da secreção coletada das lesões dos animais, e da contagem de unidades formadoras de colônia (CFU), observamos que o uso profilático de todas as VEs de DCs, resultou numa menor carga fúngica na pele, quando comparadas ao grupo controle. Quando utilizamos as VEs de DCs primadas com leveduras ou com VEs fúngicas, ou seja, uma VE de DC mais madura e previamente ativada, consegue-se controlar melhor o crescimento fúngico, sugerindo até o momento que as VEs de DCs cultivadas com o fungo ou VEs fúngicas, podem conter componentes que remetem a células de origem, contendo moléculas suas moléculas de superfície (MHC I e MHC II), além de componentes oriundos do próprio fungo ou das VEs do fungo, que poderiam estar sendo reconhecidas e induzindo um mecanismo de maior proteção nos animais infectados, assim como já foi sublinhado que mecanismos de comunicação entre DCs infectadas por bactérias alertariam as DCs vizinhas não infectadas a promover respostas antivirais, sugerindo que essas VEs derivados de DCs infectadas, regulam positivamente genes antipatogênicos como citocinas inflamatórias em DCs imaturas receptoras, o que poderia resultar na proteção contra infecção subsequente pelo vírus vaccínia (IZQUIERDO-SERRANO et al., 2022).

Também já foi demonstrado que VEs provenientes da interação de DCs com tripomastigotas do sangue foram facilmente capturados por DCs não estimuladas em comparação com VEs de DCs cultivadas sem o parasita, o que resultou na proteção de animais tratados com VEs de DCs cultivadas com os tripomastigotas e desafiados com *Trypanosoma cruzi* em uma infecção letal (GUTIERREZ et al., 2022).

Já profilaxia com VEs de DCs naive (sem a ativação prévia), a partir de uma resposta inespecífica, também demonstram melhor controle da carga fúngica quando comparadas ao controle, além de melhores taxas de linfoproliferação e aumento de células T CD4+, pois como dito anteriormente, as DCs por si só, particularmente as VEs liberadas pelas DCs, contêm moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e classe II capazes de ativar células T cognatas e promover respostas humorais (KOWAL; TKACH, 2019)

Destacando, que as duas situações de profilaxia com VEs de DCs ativadas com componentes fúngicos, se mostraram mais protetivas em comparação ao grupo que recebem VEs de DCs naive.

Tais achados mostram que estudo do uso das VEs, ainda deve ser mais bem elucidado, e pode ser interessante como um alvo para novos protocolos profiláticos ou terapêuticos contra a esporotricose.

Vale ressaltar que ao ultracentrifugarmos as DCs cultivadas com fungo ou DCs coltivadas com VEs fúngicas, resulta-se em uma solução mista, de VEs de DCs e VEs de fungo, e foi demonstrado em trabalhos anteriores do próprio grupo, que VEs do fungo podem atuar como fatores de virulência do agente (IKEDA; FERREIRA, 2021), que podem trabalhar em benefício do fungo, sem deixar de mencionar outros exoantígenos presentes principalmente na parede do fungo. Porém ao associar fatores inerentes a uma célula de defesa, como a DC, houve uma ação em prol do hospedeiro.

Ao analisarmos as características e diâmetro das lesões, vimos que os animais que receberam as VEs de forma profilática, exibiam lesões menores ao longo do acompanhamento, porém no terço final do protocolo de infecção, tivemos uma menor regressão da lesão, quando comparado ao grupo controle, esse achado pode se relacionar com uma maior resposta inflamatória local, ainda mais estimulada pelas VEs na tentativa de combater o fungo, além da característica que tem sido observada de regressão superficial da lesão, tanto nas infecções naturais, como nas experimentais, onde, no momento da coleta do fragmento cutâneo, observa-se que uma área maior no tecido subcutâneo ainda está acometido.

Quando analisa-se o perfil de citocinas na lesão de camundongos tratados com as VEs previamente a infecção, observamos principalmente um aumento das citocinas IFN gama, TNF alfa e IL-10, principalmente no grupo que recebeu VEs de DCs previamente ativadas com o fungo, esse perfil de citocinas a princípio nos remeteria a uma resposta mais anérgica, porém esse também foi o grupo onde observa-se a menor carga fúngica no ensaio de infecção, o que remete a uma resposta tendenciosamente mista, ainda não totalmente elucidada, mas que foi efetiva quando comparada aos outros grupos.

O aumento da produção de IL-6 (dados não mostrados) nos grupos tratados, já havia sido demonstrado em *Sporothrix schenki*, onde foram considerados mediadores cruciais na defesa do hospedeiro contra doenças fúngicas, podendo contribuir para a resposta geral do sistema imune do hospedeiro durante a infecção pelo complexo *S. schenckii* (ROMO-LOZANO; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ; SALINAS, 2014).

O aumento de IFN- $\gamma$  (pró-inflamatória, nos animais que receberam a profilaxia com VEs de DCs previamente ativadas com fungo (VEs totais), nos mostra a ação de uma resposta Th1, com características protetoras e efetivas, e que corrobora com achados anteriores do grupo nessa interação de DC com a levedura. Quando analisamos o grupo de animais que receberam VEs de DCs sem ativação prévia, observamos um aumento de IL-17, que vem sendo relatado como um mediador chave na proteção contra microrganismos extracelulares, com um papel cada vez mais claro nas doenças fúngicas, principalmente pela regulação positiva de citocinas como IL-6, quimiocinas recrutadores de neutrófilos (CXCL1, CXCL5), peptídeos antimicrobianos como defensinas agindo principalmente no tecido cutâneo, que são capazes de limitar o crescimento fúngico (CONTI; GAFFEN, 2015; SAWADA *et al.*, 2021; SPARBER; LEIBUNDGUT-LANDMANN, 2019) .

Na análise proteômica das VEs, foi possível encontrar proteínas relacionadas a diversos processos metabólicos, como processos de autofagia, migração, modulação de ligação a lipídeos, mediadores de Rho, contribuindo com o processo de inflamação, de superóxido desmutase, com ação direta no processo oxidativo celular, hidrolases, dentre outras proteínas, e suas funções deverão ser analisadas mais a fundo. No entanto, sugere-se que essas proteínas também poderiam estar associadas a fatores de proteção durante a infecção, o que poderia justificar a menor carga fúngica presente nos grupos que receberam a profilaxia com as VEs de DCs.

Sendo assim, de acordo com os resultados apresentados, podemos sugerir que as VEs de DCs associadas com as leveduras, ou com as VEs fúngicas, foram capazes de modular positivamente a resposta imune do hospedeiro. No entanto, muitas análises ainda são necessárias para que possamos entender o papel das proteínas presentes nas VEs, bem como, a resposta imune celular e humoral a partir do uso de VEs no modelo de esporotricose experimental

## **7 CONCLUSÕES**

O mecanismo de formação de VEs é mantido quanto cultivamos as DCs com células fúngicas ou com VEs fúngicas.

O uso profilático de VEs de DCs, previamente cultivadas com leveduras de *S. brasiliensis* podem minimizar a carga fúngica em ensaios de infecção de esporotricose experimental, em modelos murinos.

As citocinas produzidas nesses ensaios, direcionam a um perfil de resposta misto e não totalmente elucidado.

Dentre as top proteínas encontradas nas VEs de DCs previamente ativadas com o fungo (tipo de VE que resultou em uma menor carga fúngica), foi identificada a actin beta/gama 1, que demonstrou sequências peptídicas com bom escore de previsão de ligação entre peptídeo-MHC.

## REFERÊNCIAS

- ADMYRE, C.; TELEMO, E.; ALMQVIST, N.; LÖTVALL, J.; LAHESMAA, R.; SCHEYNIUS, A.; GABRIELSSON, S. **Exosomes - Nanovesicles with possible roles in allergic inflammation***Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*abr. 2008.
- ALBA-FIERRO, C. A.; PÉREZ-TORRES, A.; TORIELLO, C.; PULIDO-CAMARILLO, E.; LÓPEZ-ROMERO, E.; ROMO-LOZANO, Y.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G.; RUIZ-BACA, E. Immune Response Induced by an Immunodominant 60 kDa Glycoprotein of the Cell Wall of *Sporothrix schenckii* in Two Mice Strains with Experimental Sporotrichosis. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, 2016.
- ALBUQUERQUE, P. C.; NAKAYASU, E. S.; RODRIGUES, M. L.; FRASES, S.; CASADEVALL, A.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; ALMEIDA, I. C.; NOSANCHUK, J. D. Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: An effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 8, p. 1695–1710, ago. 2008.
- ALMEIDA, S. R. **Therapeutic monoclonal antibody for sporotrichosis***Frontiers in Microbiology*Frontiers Research Foundation, 2012.
- ALMEIDA-PAES, R.; DE OLIVEIRA, L. C.; OLIVEIRA, M. M. E.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; NOSANCHUK, J. D.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from the sporothrix complex. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.
- ANDRÉ, F.; CHAPUT, N.; SCHATZ, N. E. C.; FLAMENT, C.; AUBERT, N.; BERNARD, J.; LEMONNIER, F.; RAPOSO, G.; ESCUDIER, B.; HSU, D.-H.; TURSZ, T.; AMIGORENA, S.; ANGEVIN, E.; ZITVOGEL, L. Exosomes as Potent Cell-Free Peptide-Based Vaccine. I. Dendritic Cell-Derived Exosomes Transfer Functional MHC Class I/Peptide Complexes to Dendritic Cells. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 4, p. 2126–2136, 15 fev. 2004.
- ARIAS, M.; MONTEIRO, L. J.; ACUÑA-GALLARDO, S.; VARAS-GODOY, M.; RICE, G. E. **Vesículas extracelulares como predictores tempranos de diabetes gestacional***Rev Med Chile*. [s.l: s.n.].
- ARRILLAGA-MONCRIEFF, I.; CAPILLA, J.; MAYAYO, E.; MARIMON, R.; MARINÉ, M.; GENÉ, J.; CANO, J.; GUARRO, J. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 7, p. 651–655, 2009.
- 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. **Medical Mycology**, v. 51, n. 5, p. 534–544, 2013.
- BASTOS DE LIMA BARROS, M.; SCHUBACH, T. P.; COLL, J. O.; GREMIÃO, I. D.; WANKE, B.; SCHUBACH, A. **Temas de actualidad / Current topics Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia***Rev Panam Salud Publica*. [s.l: s.n.].
- BROWN, L.; WOLF, J. M.; PRADOS-ROSALES, R.; CASADEVALL, A. **Through the wall: Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi***Nature Reviews Microbiology*Nature Publishing Group, 16 set. 2015.
- BUSTAMANTE, B.; CAMPOS, P. E. Endemic sporotrichosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 145–149, abr. 2001.
- CARLOS, I. Z.; SASSÁ, M. F.; DA GRAÇA SGARBI, D. B.; PLACERES, M. C. P.; MAIA, D. C. G. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 168, n. 1, p. 1–10, jul. 2009.

- CASADEVALL, A. Cards of Virulence and the Global Virulome for Humans. **Microbe**, v. 1, p. 359–364, 2006.
- CASTRO, R. A.; KUBITSCHKEK-BARREIRA, P. H.; TEIXEIRA, P. A. C.; SANCHES, G. F.; TEIXEIRA, M. M.; QUINTELLA, L. P.; ALMEIDA, S. R.; COSTA, R. O.; CAMARGO, Z. P.; FELIPE, M. S. 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, 7 out. 2013.
- CHAKRABARTI, A.; BONIFAZ, A.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; MOCHIZUKI, T.; LI, S. **Global epidemiology of sporotrichosis** *Medical Mycology* Oxford University Press, 16 dez. 2014.
- CHAPUT, N. Dendritic cell derived-exosomes: biology and clinical implementations. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, n. 3, p. 471–478, 20 jul. 2006.
- CHAVES, A. R.; DE CAMPOS, M. P.; BARROS, M. B. L.; DO CARMO, C. N.; GREMIÃO, I. D. F.; PEREIRA, S. A.; SCHUBACH, T. M. P. Treatment abandonment in feline sporotrichosis - study of 147 cases. **Zoonoses and Public Health**, v. 60, n. 2, p. 149–153, mar. 2013.
- CHEN, G.; BAI, Y.; LI, Z.; WANG, F.; FAN, X.; ZHOU, X. Bacterial extracellular vesicle-coated multi-antigenic nanovaccines protect against drug-resistant *Staphylococcus aureus* infection by modulating antigen processing and presentation pathways. **Theranostics**, v. 10, n. 16, p. 7131–7149, 2020.
- CLAVIJO-GIRALDO, D. M.; MATÍNEZ-ALVAREZ, J. A.; LOPES-BEZERRA, L. M.; PONCE-NOYOLA, P.; FRANCO, B.; ALMEIDA, R. S.; MORA-MONTES, H. M. Analysis of *Sporothrix schenckii sensu stricto* and *Sporothrix brasiliensis* virulence in *Galleria mellonella*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 122, p. 73–77, 1 mar. 2016.
- CONTI DIAZ, I. A. **Epidemiology of sporotrichosis in Latin America** \**Mycopathologia*. [s.l.] Kluwer Academic Publishers, 1989. .
- CONTI, H. R.; GAFFEN, S. L. IL-17–Mediated Immunity to the Opportunistic Fungal Pathogen *Candida albicans*. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 3, p. 780–788, 1 ago. 2015.
- COONEY, N. M.; KLEIN, B. S. **Fungal adaptation to the mammalian host: it is a new world, after all** *Current Opinion in Microbiology* dez. 2008.
- CRESPO, A.; CROUS, P. W.; DIVAKAR, P. K.; LUMBSCH, H. T. A Festschrift for David L. Hawksworth. **Fungal Biology**, v. 120, n. 11, p. 1269–1271, 1 nov. 2016. . Acesso em: 1 fev. 2023.
- CRONEMBERGER-ANDRADE, A.; XANDER, P.; SOARES, R. P.; PESSOA, N. L.; CAMPOS, M. A.; ELLIS, C. C.; GRAJEDA, B.; OFIR-BIRIN, Y.; ALMEIDA, I. C.; REGEV-RUDZKI, N.; TORRECILHAS, A. C. Trypanosoma cruzi-Infected Human Macrophages Shed Proinflammatory Extracellular Vesicles That Enhance Host-Cell Invasion via Toll-Like Receptor 2. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 20 mar. 2020.
- CRUZ, L.; ROMERO, J. A. A.; IGLESIA, R. P.; LOPES, M. H. **Extracellular vesicles: Decoding a new language for cellular communication in early embryonic development** *Frontiers in Cell and Developmental Biology* Frontiers Media S.A., 28 ago. 2018.
- DARVISHI, M.; OMRANI NAVA, A.; KARIMI, E.; NOURI, M.; MEIGOONI, S. S.; HEJRIPOOR, Z. **Human and animal bites**. [s.l: s.n.].
- DE ARAUJO, M. L.; RODRIGUES, A. M.; FERNANDES, G. F.; DE CAMARGO, Z. P.; DE HOOG, G. S. Human sporotrichosis beyond the epidemic front reveals classical transmission types in Espírito Santo, Brazil. **Mycoses**, v. 58, n. 8, p. 485–490, 1 ago. 2015.
- DE CARVALHO, J. A.; BEALE, M. A.; HAGEN, F.; FISHER, M. C.; KANO, R.; BONIFAZ, A.; TORIELLO, C.; NEGRONI, R.; REGO, R. S. de M.; GREMIÃO, I. D. F.; PEREIRA, S. A.; DE

- CAMARGO, Z. P.; RODRIGUES, A. M. Trends in the molecular epidemiology and population genetics of emerging *Sporothrix* species. **Studies in Mycology**, v. 100, 1 set. 2021.
- DE LIMA BARROS, M. B.; DE ALMEIDA PAES, R.; SCHUBACH, A. O. **Sporothrix schenckii and sporotrichosis** *Clinical Microbiology Reviews* out. 2011.
- DE LIMA, R. F.; VIDAL SCHÄFFER, G.; DE MORAES BORBA, C. Variants of *Sporothrix schenckii* with attenuated virulence for mice. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 11, p. 933–938, 2003.
- DIMITROV, I.; GARNEV, P.; FLOWER, D. R.; DOYTCHINOVA, I. MHC class II binding prediction A little help from a friend. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.
- DUGINA, V. B.; SHAGIEVA, G. S.; KOPNIN, P. B. **Cytoplasmic Beta and Gamma Actin Isoforms Reorganization and Regulation in Tumor Cells in Culture and Tissue** *Frontiers in Pharmacology* *Frontiers Media S.A.*, 26 maio 2022.
- DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W. C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell Research**, v. 20, n. 1, p. 34–50, jan. 2010.
- ENE, I. v.; WALKER, L. A.; SCHIAVONE, M.; LEE, K. K.; MARTIN-YKEN, H.; DAGUE, E.; GOW, N. A. R.; MUNRO, C. A.; BROWN, A. J. P. Cell wall remodeling enzymes modulate fungal cell wall elasticity and osmotic stress resistance. **mBio**, v. 6, n. 4, 28 jul. 2015.
- ERWIG, L. P.; GOW, N. A. R. **Interactions of fungal pathogens with phagocytes** *Nature Reviews Microbiology* *Nature Publishing Group*, 15 fev. 2016.
- ESPINEL-INGROFF, A.; ABREU, D. P. B.; ALMEIDA-PAES, R.; BRILHANTE, R. S. N.; CHAKRABARTI, A.; CHOWDHARY, A.; HAGEN, F.; CÓRDOBA, S.; GONZALEZ, G. M.; GOVENDER, N. P.; GUARRO, J.; JOHNSON, E. M.; KIDD, S. E.; PEREIRA, S. A.; RODRIGUES, A. M.; ROZENTAL, S.; SZESZS, M. W.; BALLESTÉ ALANIZ, R.; BONIFAZ, A.; BONFIETTI, L. X.; BORBA-SANTOS, L. P.; CAPILLA, J.; COLOMBO, A. L.; DOLANDE, M.; ISLA, M. G.; MELHEM, M. S. C.; MESA-ARANGO, A. C.; OLIVEIRA, M. M. E.; PANIZO, M. M.; PIRES DE CAMARGO, Z.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; MEIS, J. F.; TURNIDGE, J. Multicenter, international study of MIC/MEC distributions for definition of epidemiological cutoff values for *Sporothrix* species identified by molecular methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 10, 2017.
- EUDES FILHO, J.; SANTOS, I. B. dos; REIS, C. M. S.; PATANÉ, J. S. L.; PAREDES, V.; BERNARDES, J. P. R. A.; POGGIANI, S. dos S. C.; CASTRO, T. de C. B.; GOMEZ, O. M.; PEREIRA, S. A.; SCHUBACH, E. Y. P.; GOMES, K. P.; MAVENGERE, H.; ALVES, L. G. de B.; LUCAS, J.; PAES, H. C.; ALBUQUERQUE, P.; CRUZ, L. M.; MCEWEN, J. G.; STAJICH, J. E.; ALMEIDA-PAES, R.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; MATUTE, D. R.; BARKER, B. M.; FELIPE, M. S. S.; TEIXEIRA, M. de M.; NICOLA, A. M. A novel *Sporothrix brasiliensis* genomic variant in Midwestern Brazil: evidence for an older and wider sporotrichosis epidemic. **Emerging Microbes and Infections**, v. 9, n. 1, p. 2515–2525, 2020.
- FERNANDES, G. F.; DOS SANTOS, P. O.; RODRIGUES, A. M.; SASAKI, A. A.; BURGER, E.; DE CAMARGO, Z. P. Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 241–249, 2013.
- FREITAS, D. F. S.; DE SIQUEIRA HOAGLAND, B.; DO VALLE, A. C. F.; FRAGA, B. B.; DE BARROS, M. B.; DE OLIVEIRA SCHUBACH, A.; DE ALMEIDA-PAES, R.; CUZZI, T.; ROSALINO, C. M. V.; 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. **Medical Mycology**, v. 50, n. 2, p. 170–178, fev. 2012.

- FU, Y.; XIONG, S. Tagged extracellular vesicles with the RBD of the viral spike protein for delivery of antiviral agents against SARS-COV-2 infection. **Journal of Controlled Release**, v. 335, p. 584–595, 10 jul. 2021.
- GABRIELE SANTIAGO, M.; DOHANIK DA SILVA, C.; MOREIRA DE SOUZA, B.; RODRIGUES DIAS ASSIS, B.; NATÁLIA PINTO, P.; MOURA KELLER, K.; VIRGÍNIA ROCHA VILELA, R.; STEFANIE FONSECA DE OLIVEIRA, C.; ASSIS CASTRO GOULART, G. Topical hydrophilic gel with itraconazole-loaded polymeric nanomicelles improves wound healing in the treatment of feline sporotrichosis. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 122619, 20 jan. 2023. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037851732300039X>>. Acesso em: 31 jan. 2023.
- GARCÍA-LOZANO, A.; TORIELLO, C.; ANTONIO-HERRERA, L.; BONIFAZ, L. C. Sporothrix schenckii immunization, but not infection, induces protective Th17 responses mediated by circulating memory CD4+ T cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JUN, 12 jun. 2018.
- GARCIA-RUBIO, R.; DE OLIVEIRA, H. C.; RIVERA, J.; TREVIJANO-CONTADOR, N. **The Fungal Cell Wall: Candida, Cryptococcus, and Aspergillus Species** **Frontiers in Microbiology** Frontiers Media S.A., 9 jan. 2020.
- GEHRMANN, U.; QAZI, K. R.; JOHANSSON, C.; HULTENBY, K.; KARLSSON, M.; LUNDEBERG, L.; GABRIELSSON, S.; SCHEYNIUS, A. Nanovesicles from malassezia sympodialis and host exosomes induce cytokine responses - novel mechanisms for host-microbe interactions in atopic eczema. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, 2011.
- GONSALES, F. F.; FERNANDES, N. C. C. A.; MANSO, W.; MONTENEGRO, H.; BENITES, N. R. Direct PCR of lesions suggestive of sporotrichosis in felines. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 5, p. 2001–2006, 1 jan. 2020.
- GOW, N. A. R.; NETEA, M. G. **Medical mycology and fungal immunology: New research perspectives addressing a major world health challenge** **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences** Royal Society of London, 5 dez. 2016.
- GREMIÃO, I. D. F.; MARTINS DA SILVA DA ROCHA, E.; MONTENEGRO, H.; CARNEIRO, A. J. B.; XAVIER, M. O.; DE FARIAS, M. R.; MONTI, F.; MANSO, W.; DE MACEDO ASSUNÇÃO PEREIRA, R. H.; PEREIRA, S. A.; LOPES-BEZERRA, L. M. **Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by Sporothrix brasiliensis and literature revision** **Brazilian Journal of Microbiology** Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 1 mar. 2021.
- GREMIÃO, I. D. F.; MENEZES, R. C.; SCHUBACH, T. M. P.; FIGUEIREDO, A. B. F.; CAVALCANTI, M. C. H.; PEREIRA, S. A. **Feline sporotrichosis: Epidemiological and clinical aspects** **Medical Mycology** Oxford University Press, 16 dez. 2014.
- GRIFFIN, G. K.; NEWTON, G.; TARRIO, M. L.; BU, D.; MAGANTO-GARCIA, E.; AZCUTIA, V.; ALCAIDE, P.; GRABIE, N.; LUSCINSKAS, F. W.; CROCE, K. J.; LICHTMAN, A. H. IL-17 and TNF- $\alpha$  Sustain Neutrophil Recruitment during Inflammation through Synergistic Effects on Endothelial Activation. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 12, p. 6287–6299, 15 jun. 2012.
- GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. M. **Developments in Fungal Taxonomy** **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**. [s.l: s.n.].
- GUERMONPREZ, P.; VALLADEAU, J.; ZITVOGEL, L.; THÉRY, C.; AMIGORENA, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 621–667, 2002.
- GUTIERREZ, B. C.; ANCAROLA, M. E.; VOLPATO-ROSSI, I.; MARCILLA, A.; RAMIREZ, M. I.; ROSENZVIT, M. C.; CUCHER, M.; PONCINI, C. V. Extracellular vesicles from Trypanosoma cruzi-dendritic cell interaction show modulatory properties and confer resistance to lethal

- infection as a cell-free based therapy strategy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 16 nov. 2022.
- GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; FREITAS, D. F. S.; DO VALLE, A. C. F. Clinical Forms of Human Sporotrichosis and Host Immunocompetence. *Em: Sporotrichosis*. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 73–82.
- HARDING, C.; HEUSER, J.; STAHL, P. **Receptor-mediated Endocytosis of Transferrin and of the Transferrin Receptor in Rat Reticulocytes Recycling** **THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY • VOLUME**. [s.l: s.n.].
- HEKTOEN, L.; PERKINS, A.-D. C. F. **REFRACTORY SUBCUTANEOUS ABSCESES CAUSED BY SCHENCKII. A NEW PATHOGENIC FUNGUS**. ~. [s.l: s.n.].
- HERNANDO-AMADO, S.; COQUE, T. M.; BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L. **Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives** **Nature Microbiology** Nature Publishing Group, 1 set. 2019.
- HERRMANN, I. K.; WOOD, M. J. A.; FUHRMANN, G. **Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform** **Nature Nanotechnology** Nature Research, 1 jul. 2021.
- HERZENBERG, L. A.; TUNG, J.; MOORE, W. A.; HERZENBERG, L. A.; PARKS, D. R. **Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.TreeStar.com>.
- HIRANO, M.; WATANABE, K.; MURAKAMI, M.; KANO, R.; YANAI, T.; YAMAZOE, K.; FUKATA, T.; KUDO, T. A Case of Feline Sporotrichosis. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 68, n. 3, p. 283–284, 2006.
- HOLICK, J.; MENDONGA, L.; J GORIN, P. A.; TRAVASSOS, L. R. **Polymorphism of Sporothrix schenckii Surface Polysaccharides as a Function of Morphological Differentiation?** **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** [s.l: s.n.].
- HUBE, B. **Fungal adaptation to the host environment** **Current Opinion in Microbiology** ago. 2009.
- IKEDA, M. A. K.; DE ALMEIDA, J. R. F.; JANNUZZI, G. P.; CRONEMBERGER-ANDRADE, A.; TORRECILHAS, A. C. T.; MORETTI, N. S.; DA CUNHA, J. P. C.; DE ALMEIDA, S. R.; FERREIRA, K. S. Extracellular vesicles from sporothrix brasiliensis are an important virulence factor that induce an increase in fungal burden in experimental sporotrichosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. OCT, 2 out. 2018.
- IKEDA, M. A. K.; FERREIRA, K. S. Extracellular Vesicles from Sporothrix Yeast Cells. *Em: [s.l: s.n.]* p. 35–44.
- INABA, K.; INABA, M.; ROMANI, N.; AYA, H.; DEGUCHI, M.; IKEHARA, S.; MURAMATSU, S.; STEINMANLL, R. M. **Generation of Large Numbers of Dendritic Cells from Mouse Bone Marrow Cultures Supplemented with Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor**. [s.l: s.n.].
- IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. **Toll-like receptor control of the adaptive immune responses** **Nature Immunology** out. 2004.
- IZQUIERDO-SERRANO, R.; FERNÁNDEZ-DELGADO, I.; MORENO-GONZALO, O.; MARTÍN-GAYO, E.; CALZADA-FRAILE, D.; RAMÍREZ-HUESCA, M.; JORGE, I.; CAMAFEITA, E.; ABIÁN, J.; VICENTE-MANZANARES, M.; VEIGA, E.; VÁZQUEZ, J.; SÁNCHEZ-MADRID, F. Extracellular vesicles from Listeria monocytogenes-infected dendritic cells alert the innate immune response. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 5 set. 2022.
- JELLMAYER, J. **Avaliação de células dendríticas ativadas como tratamento da esporotricose murina em modelo experimental**. 2019. Araraquara, 2019.

- 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.
- KOWAL, J.; TKACH, M. **Dendritic Cell Extracellular Vesicles**. [s.l.: s.n.].
- KUATE, S.; CINATL, J.; DOERR, H. W.; ÜBERLA, K. Exosomal vaccines containing the S protein of the SARS coronavirus induce high levels of neutralizing antibodies. **Virology**, v. 362, n. 1, p. 26–37, 25 maio 2007.
- LARSSON, C. E. Sporotrichosis. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci**, v. 48, n. 3, p. 250–259, 2011.
- LIN, P.; ZHANG, J.; XIE, G.; LI, J.; GUO, C.; LIN, H.; ZHANG, Y. Innate Immune Responses to *Sporothrix schenckii*: Recognition and Elimination. **Mycopathologia**, 4 nov. 2022.
- LUTZ, A.; SPLENDORE, A. Sobre uma micose observada em homens e ratos: contribuição para o conhecimento das assim chamadas esporotricoses. **Revista Médica de São Paulo**, v. 21, p. 443–450, 1907.
- MACÊDO-SALES, P.; SOUTO, S.; DESTEFANI, C.; LUCENA, R.; ROCHA, E.; BAPTISTA, A. Laboratory diagnosis of feline sporotrichosis in samples from Rio de Janeiro State, Brazil: imprint cytopathology limitations. **Rev Pan-Amaz Saud**, v. 2, p. 13–19, 2018.
- MACHADO, P.; MELO, T. E.; SOUZA, S. Estudo de notificações de casos de esporotricose no centro de controle de zoonoses da cidade de Manaus-AM. *Em: Tópicos em Ciência Animal – Volume 2*. [s.l.] Editora Poisson, 2022. p. 30–34.
- MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; SUTTON, D. A.; KAWASAKI, M.; GUARRO, J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3198–3206, out. 2007.
- MEARS, R.; CRAVEN, R. A.; HANRAHAN, S.; TOTTY, N.; UPTON, C.; YOUNG, S. L.; PATEL, P.; SELBY, P. J.; BANKS, R. E. Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. **Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 4019–4031, dez. 2004.
- MECKES, D. G.; SHAIR, K. H. Y.; MARQUITZ, A. R.; KUNG, C. P.; EDWARDS, R. H.; RAAB-TRAUB, N. Human tumor virus utilizes exosomes for intercellular communication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 47, p. 20370–20375, 23 nov. 2010.
- MIRANDA, L. H. M.; SANTIAGO, M. A.; SCHUBACH, T. M. P.; MORGADO, F. N.; PEREIRA, S. A.; DE OLIVEIRA, R. de V. C.; CONCEIÇÃO-SILVA, F. Severe feline sporotrichosis associated with an increased population of CD8low cells and a decrease in CD4+ cells. **Medical Mycology**, v. 54, n. 1, p. 29–39, 1 jan. 2016.
- MONCRIEFF, I. A.; CAPILLA, J.; FERNÁNDEZ, A. M.; FARIÑAS, F.; MAYAYO, E. **Patología Revista latinoamericana Volumen 48, núm. 2, abril-junio**. [s.l.: s.n.].
- MOREIRA, J. A. S.; FREITAS, D. F. S.; LAMAS, C. C. **The impact of sporotrichosis in HIV-infected patients: a systematic review***Infection* Urban und Vogel GmbH, 4 jun. 2015.
- MORGADO, D. S.; CASTRO, R.; RIBEIRO-ALVES, M.; CORRÊA-MOREIRA, D.; CASTRO-ALVES, J.; PEREIRA, S. A.; MENEZES, R. C.; OLIVEIRA, M. M. E. **Global distribution of animal sporotrichosis: A systematic review of *Sporothrix* sp. identified using molecular tools***Current Research in Microbial Sciences* Elsevier Ltd, 1 jan. 2022.
- MORGADO, F. N.; SCHUBACH, A. O.; BARROS, M. B. L.; CONCEIÇÃO-SILVA, F. The in situ inflammatory profile of lymphocutaneous and fixed forms of human sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 49, n. 6, p. 612–620, ago. 2011.
- MURPHY, D. E.; DE JONG, O. G.; BROUWER, M.; WOOD, M. J.; LAVIEU, G.; SCHIFFELERS, R. M.; VADER, P. **Extracellular vesicle-based therapeutics: natural**

- versus engineered targeting and trafficking** *Experimental and Molecular Medicine* Nature Publishing Group, 1 mar. 2019.
- OPHELDERS, D. R. M. G.; WOLFS, T. G. A. M.; JELLEMA, R. K.; ZWANENBURG, A.; ANDRIESSEN, P.; DELHAAS, T.; LUDWIG, A.-K.; RADTKE, S.; PETERS, V.; JANSSEN, L.; GIEBEL, B.; KRAMER, B. W. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Protect the Fetal Brain After Hypoxia-Ischemia. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 5, n. 6, p. 754–763, 1 jun. 2016.
- OROFINO-COSTA, R.; FREITAS, D. F. S.; BERNARDES-ENGEMANN, A. R.; RODRIGUES, A. M.; TALHARI, C.; FERRAZ, C. E.; VEASEY, J. V.; QUINTELLA, L.; SOUSA, M. S. L. A. de; VETTORATO, R.; ALMEIDA-PAES, R. de; DE MACEDO, P. M. Human sporotrichosis: recommendations from the Brazilian Society of Dermatology for the clinical, diagnostic and therapeutic management. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 97, n. 6, p. 757–777, 1 nov. 2022.
- OROFINO-COSTA, R.; RODRIGUES, A. M.; DE MACEDO, P. M.; BERNARDES-ENGEMANN, A. R. Sporotrichosis: An update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, n. 5, p. 606–620, 1 set. 2017.
- PÉREZ-MACEDONIO, C. P.; FLORES-ALFARO, E.; ALARCÓN-ROMERO, L. del C.; VENCES-VELÁZQUEZ, A.; CASTRO-ALARCÓN, N.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, E.; RAMIREZ, M. CD14 and CD26 from serum exosomes are associated with type 2 diabetes, exosomal Cystatin C and CD14 are associated with metabolic syndrome and atherogenic index of plasma. **PeerJ**, v. 10, 12 jul. 2022.
- PETERS, P. J.; GEUZE, H. J.; VAN DER DONK, H. A.; SLOT, J. W.; GRIFFITH, J. M.; STAM, N. J.; CLEVERS, H. C.; BORST, J. **Immuno-electron microscopy of human cytotoxic T cell granules 1469** *Eur. J. Immunol.* [s.l: s.n.].
- PIRES, C. Feline sporotrichosis: a literature review Resumo Revisão de literatura: esporotricose felina\*. p. 16–23, 2017. Disponível em: <<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>>.
- QIN, J.; ZHANG, J. Sporotrichosis. **New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 8, p. 771–771, 21 fev. 2019. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMicm1809179>>.
- RAMÍREZ-SOTO, M. C.; AGUILAR-ANCORI, E. G.; TIRADO-SÁNCHEZ, A.; BONIFAZ, A. Ecological determinants of sporotrichosis etiological agents. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, 1 set. 2018.
- RANGEL-GAMBOA, L.; MARTÍNEZ-HERNANDEZ, F.; MARAVILLA, P.; ARENAS-GUZMÁN, R.; FLISSER, A. Update of phylogenetic and genetic diversity of *Sporothrix schenckii* sensu lato. **Medical Mycology**, v. 54, n. 3, p. 248–255, 14 jan. 2016.
- RAPOSO, G.; NIJMAN, H. W.; STOORVOGEL, ~willem; LEIJENDEKKER, R.; HARDINGFL CORNELIS, C.; MELIEF, J. M.; GEUZE, H. J. **B Lymphocytes Secrete Antigen-presenting Vesicles.** [s.l: s.n.].
- RAPOSO, G.; TENZA, D.; MECHERI, S.; PERONET, R.; BONNEROT, C.; DESAYMARD, C. **Accumulation of Major Histocompatibility Complex Class II Molecules in Mast Cell Secretory Granules and Their Release upon Degranulation** *Molecular Biology of the Cell.* [s.l: s.n.].
- RAQUEL, A.; MEINERZ, M.; DA, P.; NASCENTE, S.; FILIPE, L.; SCHUCH, D.; BRUM CLEFF, M.; SANTIN, R.; DA, C.; BRUM, S.; DE OLIVEIRA NOBRE, M.; CARLOS, M.; MEIRELES, A.; ROBERTO, J.; MELLO, B. **In vitro susceptibility of isolates of *Sporothrix schenckii* to terbinafine and itraconazole** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* [s.l: s.n.].

- READ, S. I.; SPERLING, L. C. Feline Sporotrichosis. **Archives of Dermatology**, v. 118, n. 6, p. 429, 1 jun. 1982.
- REIS, F. C.; BORGES, B. S.; JOZEFOWICZ, L. J.; SENA, B. A.; GARCIA, A. W.; MEDEIROS, L. C.; MARTINS, S. T.; HONORATO, L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H.; KMETZSCH, L.; NIMRICHTER, L.; ALVES, L. R.; STAATS, C. C.; RODRIGUES, M. L.; CARLOS CHAGAS, I.; OSWALDO CRUZ, F. A Novel Protocol for the Isolation of Fungal Extracellular Vesicles Reveals the Participation of a Putative Scramblase in Polysaccharide Export and Capsule Construction in *Cryptococcus gattii*. **Molecular Biology and Physiology**, v. 4, p. 80–99, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/mSphere>>.
- RETANA MOREIRA, L.; STELLER ESPINOZA, M. F.; CHACÓN CAMACHO, N.; CORNET-GOMEZ, A.; SÁENZ-ARCE, G.; OSUNA, A.; LOMONTE, B.; ABRAHAMS SANDÍ, E. Characterization of Extracellular Vesicles Secreted by a Clinical Isolate of *Naegleria fowleri* and Identification of Immunogenic Components within Their Protein Cargo. **Biology**, v. 11, n. 7, 1 jul. 2022.
- RIBEIRO, C. R.; SILVA, B. P.; ALMEIDA COSTA, A. de A.; NETO, A. B.; VIEIRA, L. A.; LIMA, M. A. de; LIMA, M. H. C. de. Ocular Sporotrichosis. **American Journal of Ophthalmology Case Reports**, v. 19, 1 set. 2020.
- ROBBINS, P. D.; MORELLI, A. E. **Regulation of immune responses by extracellular vesicles** *Nature Reviews Immunology* mar. 2014.
- RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. **Sporothrix Species Causing Outbreaks in Animals and Humans Driven by Animal–Animal Transmission** *PLoS Pathogens* Public Library of Science, 1 jul. 2016.
- RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CÁSSIA PIRES, D.; BRIHANTE, R. S. N.; DA COSTA SIDRIM, J. J.; GADELHA, M. F.; COLOMBO, A. L.; DE CAMARGO, Z. P. Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, 23 abr. 2014.
- RODRIGUES, A. M.; DE MELO TEIXEIRA, M.; DE HOOG, G. S.; SCHUBACH, T. M. P.; PEREIRA, S. A.; FERNANDES, G. F.; BEZERRA, L. M. L.; FELIPE, M. S.; DE CAMARGO, Z. P. Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, 2013a.
- RODRIGUES, A. M.; DE MELO TEIXEIRA, M.; DE HOOG, G. S.; SCHUBACH, T. M. P.; PEREIRA, S. A.; FERNANDES, G. F.; BEZERRA, L. M. L.; FELIPE, M. S.; DE CAMARGO, Z. P. Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, 2013b.
- RODRIGUES, A. M.; GONÇALVES, S. S.; DE CARVALHO, J. A.; BORBA-SANTOS, L. P.; ROZENTAL, S.; CAMARGO, Z. P. de. **Current Progress on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Sporotrichosis and Their Future Trends** *Journal of Fungi* MDPI, 1 ago. 2022a.
- RODRIGUES, A. M.; GONÇALVES, S. S.; DE CARVALHO, J. A.; BORBA-SANTOS, L. P.; ROZENTAL, S.; CAMARGO, Z. P. de. **Current Progress on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Sporotrichosis and Their Future Trends** *Journal of Fungi* MDPI, 1 ago. 2022b.
- RODRIGUES, A. M.; HAGEN, F.; DE CAMARGO, Z. P. A Spotlight on *Sporothrix* and Sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 187, n. 4, p. 407–411, 1 ago. 2022.
- RODRIGUES, M. L.; GODINHO, R. M. C.; ZAMITH-MIRANDA, D.; NIMRICHTER, L. **Traveling into Outer Space: Unanswered Questions about Fungal Extracellular Vesicles** *PLoS Pathogens* Public Library of Science, 2015.

- RODRIGUES, M. L.; NIMRICHTER, L.; OLIVEIRA, D. L.; FRASES, S.; MIRANDA, K.; ZARAGOZA, O.; ALVAREZ, M.; NAKOUZI, A.; FELDMESSER, M.; CASADEVALL, A. Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 1, p. 48–59, jan. 2007.
- ROMANI, L. **Immunity to fungal infections** *Nature Reviews Immunology* abr. 2011.
- ROMO-LOZANO, Y.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, F.; SALINAS, E. *Sporothrix schenckii* yeasts induce ERK pathway activation and secretion of IL-6 and TNF- $\alpha$  in rat mast cells, but no degranulation. **Medical Mycology**, v. 52, n. 8, p. 862–868, 27 out. 2014.
- ROSSATO, L.; DOS SANTOS, S. S.; FERREIRA, L. G.; DE ALMEIDA, S. R. R. The importance of toll-like receptor 4 during experimental *sporothrix brasiliensis* infection. **Medical Mycology**, v. 57, n. 4, p. 489–495, 1 jun. 2019.
- ROSSOW, J. A.; QUEIROZ-TELLES, F.; CACERES, D. H.; BEER, K. D.; JACKSON, B. R.; PEREIRA, J. G.; GREMIÃO, I. D. F.; PEREIRA, S. A. **A one health approach to combatting sporothrix brasiliensis: Narrative review of an emerging zoonotic fungal pathogen in south america** *Journal of Fungi* MDPI AG, 1 dez. 2020.
- ROVIRA, J.; DIEKMANN, F.; CAMPISTOL, J. M.; RAMÍREZ-BAJO, M. J. Uso terapéutico de las vesículas extracelulares en insuficiencia renal aguda y crónica. **Nefrología**, v. 37, n. 2, p. 126–137, mar. 2017.
- RUIZ-BACA, E.; ALBA-FIERRO, C. A.; PÉREZ-TORRES, A. Components and Virulence Factors of the *Sporothrix schenckii* Species Complex. *Em: Sporotrichosis: New Developments and Future Prospects*. [s.l.] Springer International Publishing, 2015. p. 37–59.
- RUIZ-BACA, E.; PÉREZ-TORRES, A.; ROMO-LOZANO, Y.; CERVANTES-GARCÍA, D.; ALBA-FIERRO, C. A.; VENTURA-JUÁREZ, J.; TORRIELLO, C. **The role of macrophages in the host's defense against sporothrix schenckii** *Pathogens* MDPI, 1 jul. 2021.
- RUIZ-BACA, E.; TORIELLO, C.; PÉREZ-TORRES, A.; SABANERO-LOPEZ, 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.
- SAWADA, Y.; SETOYAMA, A.; SAKURAGI, Y.; SAITO-SASAKI, N.; YOSHIOKA, H.; NAKAMURA, M. The role of il-17-producing cells in cutaneous fungal infections. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, 1 jun. 2021.
- SCHUBACH, T. M. P.; SCHUBACH, A.; OKAMOTO, T.; BARROS, M. B. L.; BORGES FIGUEIREDO, F.; CUZZI, T.; PEREIRA, S. A.; DOS SANTOS, I. B.; DE ALMEIDA PAES, R.; DE PAES LEME, L. R.; WANKE, B. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). **Medical Mycology**, v. 44, n. 1, p. 87–92, fev. 2006.
- SCHUBACH, T. M. P.; VALLEY, A. C. F.; GUTIERREZ-GALHARDOY, M. C.; MONTEIROZ, P. C. F.; REISZ, R. S.; ZANCOPE -OLIVEIRAZ, R. M.; MARZOCHIY, K. B. F.; SCHUBACH, A. **Isolation of Sporothrix schenckii from the nails of domestic cats (Felis catus)**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mmy/article/39/1/147/1034424>>.
- SCHURT, C.; CARDINOT, T.; BARBOSA, R. **DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF SQUAMOUS CELL CARCINOMA AND SPOROTRICHOSIS IN FELINE-CASE REPORT**. [s.l.: s.n.].
- SECCHIN, P.; TROPE, B. M.; FERNANDES, L. A.; BARREIROS, G.; RAMOS-E-SILVA, M. Cutaneous Nocardiosis Simulating Cutaneous Lymphatic Sporotrichosis. **Case Reports in Dermatology**, p. 119–129, 17 ago. 2017.
- SILVA, J. N.; PASSOS, S. R. L.; MENEZES, R. C.; GREMIÃO, I. D. F.; SCHUBACH, T. M. P.; OLIVEIRA, J. C.; FIGUEIREDO, A. B. F.; PEREIRA, S. A. Diagnostic accuracy assessment of

cytopathological examination of feline sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 53, n. 8, p. 880–884, 13 jul. 2015.

SILVA, R. R.; ANDRADE TELLES, L.; MARTINS, R. M. **ESPOROTRICOSE PULMONAR: RELATO DE CASO PULMONARY SPOROTRICHOSIS: CASE REPORT**. [s.l.: s.n.].

SILVA-VERGARA, M. L.; DE CAMARGO, Z. P.; SILVA, P. F.; ABDALLA, M. R.; SGARBIERI, R. N.; RODRIGUES, A. M.; DOS SANTOS, K. C.; BARATA, C. H.; FERREIRA-PAIM, K. Case report: Disseminated sporothrix brasiliensis infection with endocardial and ocular involvement in an HIV-infected patient. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 3, p. 477–480, mar. 2012.

SILVERMAN, J. M.; CLOS, J.; HORAKOVA, E.; WANG, A. Y.; WIESGIGL, M.; KELLY, I.; LYNN, M. A.; MCMASTER, W. R.; FOSTER, L. J.; LEVINGS, M. K.; REINER, N. E. Leishmania Exosomes Modulate Innate and Adaptive Immune Responses through Effects on Monocytes and Dendritic Cells. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 9, p. 5011–5022, 1 nov. 2010.

SPARBER, F.; LEIBUNDGUT-LANDMANN, S. **Interleukin-17 in antifungal immunity** Pathogens MDPI AG, 1 jun. 2019.

THÉRY, C.; WITWER, K. W.; AIKAWA, E.; JOSE ALCARAZ, M.; ANDERSON, J. D.; ANDRIANTSITOHAINA, R.; ANTONIOU, A.; BACH, M.; BACHURSKI, D.; BAHARVAND, H.; BALAJ, L.; BALDACCHINO, S.; BAUER, N. N.; BAXTER, A. A.; BEBAWY, M.; BECKHAM, C.; BEDINA ZAVEC, A.; BENMOUSSA, A.; BERARDI, A. C.; BERGESE, P.; BIELSKA, E.; BLENKIRON, C.; BOBIS-WOZOWICZ, S.; BOILARD, E.; BOIREAU, W.; BONGIOVANNI, A.; BORRÀS, F. E.; BOSCH, S.; BOULANGER, C. M.; BREAKFIELD, X.; BREGGIO, A. M.; Á BRENNAN, M.; BRIGSTOCK, D. R.; BRISSON, A.; BROEKMAN, M. L.; BROMBERG, J. F.; BRYL-GÓRECKA, P.; BUCH, S.; BUCK, A. H.; BURGER, D.; BUSATTO, S.; BUSCHMANN, D.; BUSSOLATI, B.; BUZÁS, E. I.; BRYAN BYRD, J.; CAMUSSI, G.; CARTER, D. R.; CARUSO, S.; CHAMLEY, L. W.; CHANG, Y.-T.; CHEN, C.; CHEN, S.; CHENG, L.; CHIN, A. R.; CLAYTON, A.; CLERICI, S. P.; COCKS, A.; COCUCCI, E.; COFFEY, R. J.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; COUCH, Y.; COUMANS, F. A.; COYLE, B.; CRESCITELLI, R.; FERREIRA CRIADO, M.; DAS, S.; DATTA CHAUDHURI, A.; DE CANDIA, P.; DE SANTANA JUNIOR, E. F.; DE WEVER, O.; DEL PORTILLO, H. A.; DEMARET, T.; DEVILLE, S.; DEVITT, A.; DHONDT, B.; DI VIZIO, D.; DIETERICH, L. C.; DOLO, V.; PAULA DOMINGUEZ RUBIO, A.; DOMINICI, M.; DOURADO, M. R.; DRIEDONKS, T. A.; DUARTE, F. v; DUNCAN, H. M.; EICHENBERGER, R. M.; EKSTRÖM, K.; ANDALOUSSI, S. el; ELIE-CAILLE, C.; ERDBRÜGGER, U.; FALCÓN-PÉREZ, J. M.; FATIMA, F.; FISH, J. E.; FLORES-BELLVER, M.; FÖRSÖNITS, A.; FRELET-BARRAND, A.; FRICKE, F.; FUHRMANN, G.; GABRIELSSON, S.; GÁMEZ-VALERO, A.; GARDINER, C.; GÄRTNER, K.; GAUDIN, R.; SONG GHO, Y.; GIEBEL, B.; GILBERT, C.; GIMONA, M.; GIUSTI, I.; GOBERDHAN, D. C.; GÖRGENS, A.; GORSKI, S. M.; GREENING, D. W.; CHRISTINA GROSS, J.; GUALERZI, A.; GUPTA, G. N.; GUSTAFSON, D.; HANDBERG, A.; HARASZTI, R. A.; HARRISON, P.; HEGYESI, H.; HENDRIX, A.; HILL, A. F.; HOCHBERG, F. H.; HOFFMANN, K. F.; HOLDER, B.; HOLTHOFER, H.; HOSSEINKHANI, B.; HU, G.; HUANG, Y.; HUBER, V.; HUNT, S.; GAMAL-ELDIN IBRAHIM, A.; IKEZU, T.; INAL, J. M.; ISIN, M.; IVANOVA, A.; JACKSON, H. K.; JACOBSEN, S.; JAY, S. M.; JAYACHANDRAN, M.; JENSTER, G.; JIANG, L.; JOHNSON, S. M.; JONES, J. C.; JONG, A.; JOVANOVIC-TALISMAN, T.; JUNG, S. Journal of Extracellular Vesicles Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of Extracellular Vesicles**, 2018. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/loi/zjev20>>.

- TOMOKO, M.; CARVALHO, M.; PINHEIRO DE CASTRO, A.; BABY, C.; WERNER, B.; NETO, J. F.; QUEIROZ-TELLES, F. **Disseminated cutaneous sporotrichosis in a patient with AIDS: Report of a case** *Esporotricose cutânea disseminada em paciente com AIDS: Relato de um caso* *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. [s.l.: s.n.].
- TORRES DA SILVA, D.; CALDAS MENEZES, R.; DIB FERREIRA GREMIÃO, I.; MARIA PACHECO SCHUBACH, T.; SEPÚLVEDA BOECHAT, J.; ANTONIO PEREIRA, S. *Esporotricose zoonótica: procedimentos de biossegurança* *Zoonotic Sporotrichosis: Biosafety Procedures*. v. 40, n. 4, p. 1067, 2012. Disponível em: <[www.ufrgs.br/actavet](http://www.ufrgs.br/actavet)>.
- VALLEJO, M. C.; MATSUO, A. L.; GANIKO, L.; MEDEIROS, L. C. S.; MIRANDA, K.; SILVA, L. S.; FREYMÜLLER-HAAPALAINEN, E.; SINIGAGLIA-COIMBRA, R.; ALMEIDA, I. C.; PUCCIA, R. The pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* exports extracellular vesicles containing highly immunogenic  $\alpha$ -galactosyl epitopes. *Eukaryotic Cell*, v. 10, n. 3, p. 343–351, mar. 2011.
- VERDAN, F. F.; FALEIROS, J. C.; FERREIRA, L. S.; MONNAZZI, L. G. S.; MAIA, D. C. G.; TANSINE, A.; PLACERES, M. C. P.; CARLOS, I. Z.; SANTOS-JUNIOR, R. R. Dendritic cell are able to differentially recognize *Sporothrix schenckii* antigens and promote Th1/Th17 response in vitro. *Immunobiology*, v. 217, n. 8, p. 788–794, ago. 2012.
- VIEIRA, S. M.; LEMOS, H. P.; GRESPAN, R.; NAPIMOGA, M. H.; DAL-SECCO, D.; FREITAS, A.; CUNHA, T. M.; VERRI, W. A.; SOUZA, D. A.; JAMUR, M. C.; FERNANDES, K. S.; OLIVER, C.; SILVA, J. S.; TEIXEIRA, M. M.; CUNHA, F. Q. A crucial role for TNF- $\alpha$  in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL1 and LIX/CXCL5: RESEARCH PAPER. *British Journal of Pharmacology*, v. 158, n. 3, p. 779–789, out. 2009.
- VILELA, R.; SOUZA, G. F.; FERNANDES COTA, G.; MENDOZA, L. *Esporotricosis cutânea y meníngea en un paciente con VIH*. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 24, n. 2, p. 161–163, jun. 2007.
- WALLER, S. B.; FLORES, D.; LANA, D.; QUATRIN, P. M.; ROBERTO, M.; FERREIRA, A.; ALEXANDRE, & FUENTEFRIA, M.; MEZZARI, A. Antifungal resistance on *Sporothrix* species: an overview. *CLINICAL MICROBIOLOGY-REVIEW*, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s42770-020-00307-z>>.
- WELSH, J. A. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *Journal of Extracellular Vesicles*, v. 13, n. 2, p. e12404, 1 fev. 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jev2.12404>>.
- YÁÑEZ-MÓ, M.; SILJANDER, P. R. M.; ANDREU, Z.; ZAVEC, A. B.; BORRÀS, F. E.; BUZAS, E. I.; BUZAS, K.; CASAL, E.; CAPPELLO, F.; CARVALHO, J.; COLÁS, E.; CORDEIRO-DA SILVA, A.; FAIS, S.; FALCON-PEREZ, J. M.; GHOBRIAL, I. M.; GIEBEL, B.; GIMONA, M.; GRANER, M.; GURSEL, I.; GURSEL, M.; HEEGAARD, N. H. H.; HENDRIX, A.; KIERULF, P.; KOKUBUN, K.; KOSANOVIC, M.; KRALJ-IGLIC, V.; KRÄMER-ALBERS, E. M.; LAITINEN, S.; LÄSSER, C.; LENER, T.; LIGETI, E.; LINE, A.; LIPPS, G.; LLORENTE, A.; LÖTVALL, J.; MANČEK-KEBER, M.; MARCILLA, A.; MITTELBRUNN, M.; NAZARENKO, I.; NOLTE-'T HOEN, E. N. M.; NYMAN, T. A.; O'DRISCOLL, L.; OLIVAN, M.; OLIVEIRA, C.; PÁLLINGER, É.; DEL PORTILLO, H. A.; REVENTÓS, J.; RIGAU, M.; ROHDE, E.; SAMMAR, M.; SÁNCHEZ-MADRID, F.; SANTARÉM, N.; SCHALLMOSER, K.; OSTENFELD, M. S.; STOORVOGEL, W.; STUKELJ, R.; VAN DER GREIN, S. G.; HELENA VASCONCELOS, M.; WAUBEN, M. H. M.; DE WEVER, O. **Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions** *Journal of Extracellular Vesicles* Co-Action Publishing, 2015.
- ZAMITH-MIRANDA, D.; HEYMAN, H. M.; COUVILLION, S. P.; CORDERO, R. J. B.; RODRIGUES, M. L.; NIMRICHTER, L.; CASADEVALL, A.; AMATUZZI, R. F.; ALVES, L. R.;

NAKAYASU, E. S.; NOSANCHUK, J. D. Comparative Molecular and Immunoregulatory Analysis of Extracellular Vesicles from *Candida albicans* and *Candida auris*. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/mSystems>>.

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.

ZITVOGEL, L.; REGNAULT, A.; LOZIER, A.; WOLFERS, J.; FLAMENT, C.; TENZA, D.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; RAPOSO, G.; AMIGORENA, S. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. **Nature Publishing Group**, v. 4, n. 5, p. 594–600, maio 1998.

## ANEXO



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
 Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

CEUA/FCF 021.2022 – P 638

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Estudo da ativação e modulação da resposta imune contra a esporotricose experimental, a partir de vesículas extracelulares purificadas de células dendríticas**” registrada com o nº **638**, sob a responsabilidade do pesquisadora Jenniffer Lacerda da Silva, Orientador Prof. Sandro Rogério de Almeida – que envolve produção ou manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto Federal nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e das normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), em reunião de **12 de maio de 2022**.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	11/06/2022 a 11/07/2023
Espécie/linhagem/raça	Camundongo - <i>Mus musculus</i> Balb/c
Número de animais	123
Sexo	Macho
Peso/Idade	26 a 32 gr / 8 a 12 semanas
Origem	Rede USP de biotérios
Total	123

Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento do projeto de pesquisa, o respectivo **relatório final**.

**Ressaltamos que após o período de término do projeto de pesquisa, nenhum ensaio poderá ser realizado.**



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

São Paulo, 12 de maio de 2022

A handwritten signature in black ink, which appears to read "Irene Satiko Kikuchi".

**Profa. Dra. Irene Satiko Kikuchi**

Coordenadora CEUA/FCF/USP