

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

IMUNIDADE INATA TREINADA NA RESPOSTA PROTETORA DAS
CANDIDATAS A VACINA CONTRA PATÓGENOS INTRACELULARES

JEFFERSON BRUNO SOARES OLIVEIRA

BELO HORIZONTE – MG

EV-UFGM

2025

JEFFERSON BRUNO SOARES OLIVEIRA

IMUNIDADE INATA TREINADA NA RESPOSTA PROTETORA DAS
CANDIDATAS A VACINA CONTRA PATÓGENOS INTRACELULARES

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em
Ciência Animal da Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito para a obtenção do título de
Doutor.

Área de concentração: Patologia Animal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tatiane Alves da Paixão

Coorientador: Prof. Dr. Renato de Lima Santos

Coorientadora: Dr^a Monique Ferreira Silva Souza

BELO HORIZONTE – MG

EV-UFGM

2025

O48i Oliveira, Jefferson Bruno Soares, 1988 -
Imunidade inata treinada na resposta protetora das candidatas a vacina
contra patógenos intracelulares/ Jefferson Bruno Soares Oliveira.- 2025.
116f: il.

Orientadora: Tatiane Alves da Paixão
Coorientadores: Renato de Lima Santos

Monique Ferreira Silva Souza

Tese (Doutorado) apresentada à Escola de Medicina Veterinária da UFMG,
como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Área de Concentração: Patologia Animal.

Inclui Bibliografia.

1. Patologia veterinária - Teses - 2. Veterinária - Teses - I. Paixão,
Tatiane Alves da - II. Santos, Renato de Lima - III. Souza, Monique Ferreira
Silva - IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária -
V. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

JEFFERSON BRUNO SOARES OLIVEIRA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Programa de Pós Graduação em **CIÊNCIA ANIMAL**, como requisito para obtenção do grau de **DOUTOR(a)** em **CIÊNCIA ANIMAL**, área de concentração **Patologia Animal**. Defesa da tese intitulada: "**IMUNIDADE INATA TREINADA NA RESPOSTA PROTETORA DAS CANDIDATAS A VACINA CONTRA PATÓGENOS INTRACELULARES.**"

Aprovado(a) em 30 de junho de 2025, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Tatiane Alves da Paixão - Orientador(a)

Dr.(a). Monique Ferreira Silva Souza

Dr.(a). Renato de Lima Santos

Dr.(a). Fatima Ribeiro Dias

Dr.(a). Thaynara Parente de Carvalho

Dr.(a). Fabio Antonio Vitarelli Marinho

Dr.(a). Ana Patricia de Carvalho da Silva



Documento assinado eletronicamente por **Tatiane Alves da Paixao, Professora do Magistério Superior**, em 30/06/2025, às 13:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fábio Antônio Vitarelli Marinho, Usuário Externo**, em 30/06/2025, às 14:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thaynara Parente de Carvalho, Usuária Externa**, em 30/06/2025, às 14:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Patricia de Carvalho da Silva, Usuário Externo**, em 30/06/2025, às 16:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Monique Ferreira Silva Souza, Usuária Externa**, em 01/07/2025, às 14:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Fátima Ribeiro Dias, Usuária Externa**, em

Dedicatória

Dedico este trabalho a meus pais José (*in memoriam*) e Jacinta, por todo amor, carinho, dedicação, apoio e confiança a mim conferidos.

AGRADECIMENTOS

À Deus por toda proteção, saúde, paz, felicidades, determinação e fé que me fizeram chegar até aqui.

À minha família, especialmente a minha mãe, Jacinta e ao meu pai José (*in memoriam*) por tudo o que me ensinaram e sempre fizeram por mim, ao meu irmão Jamerson e minhas irmãs Jucielle e Julianna, e aos meus cunhados Manoel e Vinicius, por todo o apoio e momentos felizes que compartilhamos juntos e mesmo distante.

À minha esposa Brenda por todos os momentos que passamos, por ser uma pessoa tão forte que me inspira a seguir em frente, por ser companheira e amiga, sempre me apoiando e encorajando a continuar esta caminhada, aos meus filhos Gabriel e Miguel, que apesar da pouca idade são capazes de me ensinar a tornar-me uma pessoa melhor e me fortalecer diante dos novos desafios.

À professora Tatiane Paixão por ter aceitado me orientar, compartilhado tanto conhecimento, pela confiança, paciência, palavras de incentivo e por ter me guiado durante toda essa caminhada.

Ao professor Renato de Lima por tudo o que me ensinou, por todo o apoio, compreensão, confiança, por ter permitido e contribuído para meu crescimento profissional ao longo desta trajetória.

Aos colegas e amigos do laboratório de Patologia Molecular, em especial a Laice, Monique e Thaynara por compartilharem comigo vários momentos que me permitiram crescer pessoal e profissionalmente, contribuindo sobremaneira em todas as atividades que realizei durante essa jornada. Sem dúvida, sem a contribuição de vocês, a realização deste trabalho não seria possível!

Aos amigos Leonardo e Sóstenes por tantos momentos de alegria que compartilhamos, pelo apoio que sempre me deram e as palavras que me impulsionaram a conseguir chegar até aqui.

Aos amigos da academia de jiu-jitsu, onde por incrível que pareça, por mais que eu chegasse cansado e desestimulado com as coisas do cotidiano, era o local onde eu renovava as energias e a vontade de continuar com a realização de mais essa conquista. OSS!

À Escola de Veterinária da UFMG pela forma como fui acolhido, lugar onde me foi permitido crescer tanto no âmbito pessoal quanto profissional. Aprendi muito nesse lugar! À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por ter me concedido uma bolsa de estudos durante o doutorado.

RESUMO

A imunidade inata treinada tem sido objeto de amplo estudo para compreensão do desenvolvimento de memória imunológica em células imunes inatas. O desenvolvimento de melhor capacidade de proteção contra numerosas doenças, dentre elas, metabólicas, neoplásicas e infecciosas, tem demonstrado o aspecto promissor do treinamento imune inato. Algumas substâncias têm sido amplamente utilizadas com essa finalidade, em especial β -glucana e zymosan. Diante disso, este trabalho objetivou investigar a capacidade destas substâncias em contribuir para melhorar a eficiência de candidatas a vacina contra infecção por *B. ovis* e *L. monocytogenes*. Este trabalho demonstrou que β -glucana foi capaz de conduzir a redução importante da infecção bacteriana *in vitro* em macrófagos da medula óssea de camundongos estimulados, além da colonização bacteriana em órgãos alvo, comparada ao zymosan. A estimulação com β -glucana não foi capaz de melhorar a eficiência vacinal das vacinas atenuada de *B. ovis* $\Delta abcBA$ e, porém, observou-se importante redução da colonização bacteriana em animais vacinados com *B. ovis* inativada por irradiação gama. A estimulação com β -glucana também não foi capaz de melhorar a eficácia vacinal da vacina inativada *L. monocytogenes* gama-irradiada, embora metade dos camundongos estimulado e vacinado não tiveram recuperação bacteriana detectável. O número de doses é um fator que pode contribuir de maneira negativa para o controle de agentes infecciosos, prejudicando a indução da imunidade treinada. Estes resultados sugerem que a imunidade inata treinada pode ser um importante mecanismo no auxílio no controle e prevenção de doenças infecciosas causadas por bactérias intracelulares, e que seu uso pode favorecer determinados protocolos vacinais.

Palavras-chaves: imunidade treinada; *Brucella ovis*; brucelose; *Listeria monocytogenes*; listeriose; vacinação; proteção; imunização; β -glucana; zymosan.

ABSTRACT

Trained innate immunity has been the subject of extensive study to understand the development of immunological memory in innate immune cells. The development of improved protective capacity against numerous diseases, including metabolic, neoplastic and infectious diseases, has demonstrated the promising aspect of innate immune training. Some substances have been widely used for this purpose, especially β -glucan and zymosan. Therefore, this study aimed to investigate the ability of these substances to contribute to improving the efficiency of vaccine candidates against *B. ovis* and *L. monocytogenes* infection. It demonstrated that β -glucan was able to lead to a significant reduction in bacterial infection *in vitro* in bone marrow macrophages of stimulated mice, in addition to bacterial colonization in target organs, compared to zymosan. Stimulation with β -glucan was not able to improve the vaccine efficiency of the attenuated *B. ovis* $\Delta abcBA$ vaccines, but a significant reduction in bacterial colonization was observed in animals vaccinated with gamma-irradiated *B. ovis*. Stimulation with β -glucan was also not able to improve the vaccine efficacy of the gamma-irradiated inactivated *L. monocytogenes* vaccine, although half of the stimulated and vaccinated mice did not have detectable bacterial recovery. The number of doses is a factor that can negatively contribute to the control of infectious agents, impairing the induction of trained immunity. These results suggest that trained innate immunity can be an important mechanism in aiding the control and prevention of infectious diseases caused by intracellular bacteria, and that its use can favor certain vaccine protocols.

Keywords: trained immunity; *Brucella ovis*; brucellosis; *Listeria monocytogenes*; listeriosis; vaccination; protection; immunization; β -glucan; zymosan.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1: Modelo de indução da ativação metabólica de monócitos treinados por β -glucana, caracterizado por mudança para aumento da glicólise aeróbica e diminuição da fosforilação oxidativa. Adaptado de Cheng et al., 2014..... 43

Figura 2: Reprogramação epigenética com indução da imunidade treinada. A estimulação de células imunes inatas é acompanhada pela deposição de marcas de cromatina e alterações na metilação do DNA, levando ao desdobramento da cromatina e promovendo a transcrição e a expressão de fatores pró-inflamatórios. Todas essas alterações são apenas parcialmente removidas após a cessação do estímulo. Isso permite um recrutamento mais rápido e aprimorado de fatores de transcrição e expressão gênica após o desafio secundário com outro estímulo. A figura ilustra os estados de cromatina e as assinaturas epigenéticas associadas a células não estimuladas, a células após estimulação aguda, a células "treinadas" em repouso e a células treinadas após novo estímulo. Adaptado de Netea et al., 2020. 44

Capítulo II

Figure 1: The control of infection *in vitro* was assessed in bone marrow-derived macrophages (1×10^5 cells per well) from C57BL/6 mice that had been trained seven days previously with zymosan or β -glucan, or that were left untrained (mock). The cells were then challenged with either (A) *L. monocytogenes* MOI 1:10 and assessed at 0, 4 and 8 hours post-infection, or (B) *B. ovis* MOI 1:100 and assessed at 0, 24 and 48 hours post-infection. The results were log-transformed and ANOVA analysis was performed, with the mean values compared using the Tukey test. Statistical differences refer to comparisons between groups at the same time point (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). 773

Figure 2: Splenic cells from C57BL/6 mice were subjected to immunofluorescence analysis to identify acetylation at lysine of histone 3, (A–D) H3K9ac or (F–H) H3K27ac. (A and E) The data represent a total of 100 cells from three animals per group. The results

were evaluated to detect outliers using the Grubbs test ($\alpha = 0.05$), followed by the D'Agostino and Pearson normality tests. The medians of the groups were assessed using the Kruskal–Wallis test. Statistical differences are represented by asterisks (***) ($p < 0.001$). (B and F) ratio of the average fluorescence intensity obtained from the cells. This data is presented by dividing the fluorescence intensity values of the trained group by those of the untrained (mock) group. Immunofluorescence images show labelling with anti-H3K9ac or anti-H3K27ac antibodies (green) in the trained group (C and G) and the mock group (D and H)..... 79

Figure 3: Bone marrow cells from C57BL/6 mice were subjected to immunofluorescence analysis to identify acetylation at lysine of histone 3, (A–D) H3K9ac or (F–H) H3K27ac. (A and E) The data represent a total of 100 cells from three animals per group. The results were evaluated to detect outliers using the Grubbs test ($\alpha = 0.05$), followed by the D'Agostino and Pearson normality tests. The medians of the groups were assessed using the Kruskal–Wallis test. Statistical differences are represented by asterisks (***) ($p < 0.001$). (B and F) ratio of the average fluorescence intensity obtained from the cells. This data is presented by dividing the fluorescence intensity values of the trained group by those of the untrained (mock) group. Immunofluorescence images show labelling with anti-H3K9ac or anti-H3K27ac antibodies (green) in the trained group (C and G) and the mock group (D and H)..... 80

Figure 4: Bacterial recovery in the spleen (A) and liver (B) of female Balb/c mice (n=6), subjected to intraperitoneal innate immunity training with 1mg/animal of zymosan or β -glucan, immunized subcutaneously with KLM- γ -AC, trained with zymosan and subsequently vaccinated with KLM- γ -AC (Z+KLM- γ -AC), trained with β -glucan and vaccinated with KLM- γ -AC (β G+KLM- γ -AC), or an unimmunized and untrained group (infected mock). All animals were subjected to intraperitoneal challenge with *L. monocytogenes* at a dose of 1×10^5 CFU/animal. Data are expressed as individual animals (points) and mean with standard deviation. The results were Log-transformed before being submitted to ANOVA, with the mean values compared using the Tukey test. Statistical differences are represented by asterisks (****) ($p < 0.0001$)..... 81

Figure 5: Bacterial recovery in the spleen (A) and liver (B) of female C57BL/6 mice (n=6), subjected to intraperitoneal innate immunity training with 1mg/animal of zymosan or β -glucan, immunized subcutaneously with KLM- γ -AC, trained with zymosan and subsequently vaccinated with KLM- γ -AC (Z+KLM- γ -AC), trained with β -glucan and vaccinated with KLM- γ -AC (β G+KLM- γ -AC), or an unimmunized and untrained group (infected mock). All animals were subjected to intraperitoneal challenge with *L. monocytogenes* at a dose of 1×10^5 CFU/animal. Data are expressed as individual animals (points) and mean with standard deviation. The results were Log-transformed before being submitted to ANOVA, with the mean values compared using the Tukey test. Statistical differences are represented by asterisks (****p < 0.0001)..... 83

Figure 6: Images of the distribution of histopathological lesions and cell aggregates (arrow) observed in the liver of female C57BL/6 mice (n = 6) subjected to i.p. innate immunity training with 1mg/animal of β -glucan or zymosan, immunized subcutaneously (s.c.) with KLM- γ -AC (A), trained with β -glucan (B), trained with β -glucan and vaccinated with KLM- γ -AC (β G+KLM- γ -AC) (C), trained with zymosan (D), trained with zymosan and immunized (Z+KLM- γ -AC) (E) or non-immunized and non-trained group (mock infection) (F). All groups were challenged i.p. with *L. monocytogenes* at a dose of 1×10^5 CFU/animal. The results of histopathological scores of spleen (G) and liver (H) were analyzed using the nonparametric Kruskal-Wallis test. Statistical differences are represented by asterisks (*p < 0.05). H.E obj. 5x..... 85

Figure 7: Bacterial recovery from spleen (A) and liver (B) of female C57BL/6 mice (n = 6), immunized *L. monocytogenes* inactivated by gamma irradiation and encapsulated by alginate with chitosan (KLM- γ -AC), trained with two doses of β -glucan (2 β -glucan), trained with two doses of β -glucan and immunized *L. monocytogenes* inactivated by gamma irradiation and encapsulated by alginate with chitosan (2 β -G+KLM- γ -AC), untrained and unvaccinated (mock infected). All mice were challenged with *L. monocytogenes* at a dose of 1×10^5 CFU/animal. Data are expressed as individual animals (points) and mean with standard deviation. The results were log-transformed before being submitted to ANOVA, with the mean values compared using the Tukey test. Statistical differences are represented by asterisks (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001)..... 87

Figure 8: Histopathological evaluation of the spleen (A) and liver (B) of female C57BL/6 mice (n=6) immunized *L. monocytogenes* inactivated by gamma irradiation and encapsulated by alginate with chitosan (KLM- γ -AC), trained with two doses of β -glucan (2 β -glucan), trained with two doses of β -glucan and immunized *L. monocytogenes* inactivated by gamma irradiation and encapsulated by alginate with chitosan (2 β -G+KLM- γ -AC), untrained and unvaccinated (mock infected). All mice were challenged with *L. monocytogenes* at a dose of 1×10^5 CFU/animal. The score results were analyzed using the non-parametric Kruskal-Wallis test. Statistical differences are represented by asterisks (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). 87

Figure 9: Splenic cells from C57BL/6 mice, trained with two doses of β -glucan, submitted to immunofluorescence analysis to identify acetylation at lysine of histone 3, (A–D) H3K9ac or (F–H) H3K27ac. (A and E). The data represent a total of 100 cells from three animals per group. These results were evaluated for outliers using the Grubbs test ($\alpha = 0.05$) and then the D'Agostino and Pearson normality tests. The medians of the groups were evaluated using the Kruskal-Wallis test. (B and F) ratio between the average fluorescence intensity obtained from cells. This data is represented by dividing the fluorescence intensity values of the trained group by those of the untrained group (mock). Statistical differences are represented by asterisks (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$). (C-D and G-H). The immunofluorescence images show staining with anti-H3K9ac or anti-H3K27ac antibody (green) in the trained group (C and G) and the mock group (D and H). 889

Figure 10: Bone marrow cells from C57BL/6 mice, trained with two doses of β -glucan, submitted to immunofluorescence analysis to identify acetylation at lysine of histone 3, (A–D) H3K9ac or (F–H) H3K27ac. (A and E). The data represent a total of 100 cells from three animals per group. These results were evaluated for outliers using the Grubbs test ($\alpha = 0.05$) and then the D'Agostino and Pearson normality tests. The medians of the groups were evaluated using the Kruskal-Wallis test. (B and F) ratio between the average fluorescence intensity obtained from cells. This data is represented by dividing the fluorescence intensity values of the trained group by those of the untrained group (mock). Statistical differences are represented by asterisks *** $p < 0.001$. (C-D and G-H).

The immunofluorescence images show labeling with anti-H3K9ac or anti-H3K27ac antibody (green) in the trained group (C and G) and the mock group (D and H). 90

Figure 11: (A) *In vitro* control of *L. monocytogenes* infection by bone marrow-derived macrophages from C57BL/6 mice that were trained with β -glucan, vaccinated with KLM- γ -AC, stimulated and vaccinated (β G- KLM- γ -AC), or not stimulated and not vaccinated (mock). Macrophages (5×10^5 cells per well) were inoculated with *L. monocytogenes* MOI of 10, and bacterial recovery was determined at 0, 4, and 8 hours post-infection. (B) Measuring of IL-6 cytokine levels by ELISA. The data are representative of a pool of samples from six animals per group and the values are expressed in picograms per microlitre. The results were log-transformed before ANOVA was performed, and the mean values were compared using the Tukey test. Statistical differences are represented by asterisks (** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$). 92

Figure 12: Splenocytes proliferation from C57BL/6 mice trained with β -glucan and vaccinated with KLM- γ -AC. Two weeks after the last vaccination splenocytes were collected from mice in the KLM- γ -AC, β G+KLM- γ -AC, β -glucan and mock (PBS) groups and cultured 5×10^5 cells/well. Splenocytes were stimulated with RPMI (non-stimulated) or KLM- γ (1×10^9 CFU/mL) for 72 hours in duplicates. Splenocyte proliferation was assessed using the MTT assay. Data are represented as means and standard deviations. Data were subjected to one-way ANOVA, and means were compared using Tukey's test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$). 93

Figure 13: Bacterial recovery in the spleen (A) and liver (B) of female C57BL/6 mice (n=6), subjected to intraperitoneal innate immunity training with 1mg/animal of zymosan or β -glucan, immunized subcutaneously with $\Delta abcBA$ -AC, trained with zymosan and subsequently vaccinated with $\Delta abcBA$ -AC (Z+ $\Delta abcBA$ -AC), trained with β -glucan and vaccinated with $\Delta abcBA$ -AC (β G+ $\Delta abcBA$ -AC), or non-immunized and non-trained mock group (infected mock). All animals were subjected to intraperitoneal challenge with *B. ovis* at a dose of 1×10^6 CFU/animal. Data are expressed as individual animals (points) and mean with standard deviation. The results were log-transformed before being submitted to ANOVA, with the mean values compared using the Tukey test. Statistical differences are represented by asterisks (** $p < 0.01$; **** $p < 0.001$). 95

Figure 14: Bacterial recovery from the spleen (A) and liver (B) of C57BL/6 mice (n = 6), submitted to innate immunity training via i.p with 1 mg/animal of β -glucan, immunized subcutaneously (s.c) with BO- γ -AC, trained with β -glucan and vaccinated with BO- γ -AC (β G+BO- γ -AC), or non-immunized and non-trained group (infected mock). All groups were challenged with 1×10^6 CFU/animal of *B. ovis*. Data are expressed as individual animals (points) and mean with standard deviation. The results were Log-transformed before being submitted to ANOVA, with the mean values compared using the Tukey test. Statistical differences are represented by asterisks (*p < 0.05; **p < 0.01). 96

Figure 15: Images of the distribution of histopathological lesions and inflammatory cell aggregates (arrow) observed in the liver of female C57BL/6 mice (n=6) subjected to i.p. innate immunity training with 1 mg/animal of β -glucan and immunized subcutaneously (s.c.) with BO- γ -AC. Animals immunized with BO- γ -AC only (A), trained with β -glucan (B), trained with β -glucan and vaccinated with BO- γ -AC (β +BO- γ -AC) (C) and non-immunized and non-trained group (mock infection) (D). All groups were challenged i.p. with *B. ovis* at a dose of 1×10^6 CFU/animal. The results of the histopathological scores of spleen (E) and liver (F) were analyzed using the nonparametric Kruskal-Wallis test. Statistical differences are represented by asterisks (*p < 0.05). H.E obj. 5x. 98

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Table 1: Protection induced in the spleen of trained Balb/c mice, immunized s.c. with 1×10^7 of *L. monocytogenes*. gamma irradiated and experimentally challenged i.p. with 1×10^5 of *L. monocytogenes*..... 82

Table 2: Protection induced in the spleen of trained C57BL/6 mice, immunized s.c. with 1×10^7 of irradiated *L. monocytogenes* gamma and experimentally challenged i.p. with 1×10^5 of *L. monocytogenes*..... 84

Table 3: Protection induced in the spleen of C57BL/6 mice trained with β -glucan or zymosan, immunized with *B. ovis* $\Delta abcBA$ -AC and experimentally challenged with the wild strain of *B. ovis*..... 95

Table 4: Protection induced in the spleen of C57BL/6 mice trained with β -glucan, immunized with gamma-inactivated *B. ovis* and experimentally challenged with the wild strain of *B. ovis*..... 97

LISTA DE ABREVIACOES

ActA	proteína indutora de	
actina	ANOVA	análise de variância
AQ	alginate com quitosana	
BALT	tecido linfoide associado ao brônquio	
BCG	bacilo Calmette Guerin	
BHI	brain heart infusion	
BSA	soroalbumina bovina	
CaCl	cloreto de cálcio	
colesterol ruim	LDL - <i>low-density lipoprotein</i>	
CR3	receptor do complemento 3	
Cu/Zn-SOD	copper-zinc superoxide dismutase	
DAMPs	padrões moleculares associados ao perigo	
DTP	diphtheria-tetanus-pertussis	
ELISAI	ensaio imunoenzimático indireto	
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária	
FC	fixação do complemento	
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio	
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico	
H3K27Ac	acetilação na lisina 27 da histona 3	
H3K27ac	acetilação na lisina vinte e sete da histona três	
H3K4m	monometilação na lisina quatro na histona três	
H3K4m3	trimetilação na lisina quatro na histona três	
H3K4me1	monometilação na lisina 4 da histona 3	
H3K4me3	trimetilação na lisina 4 na histona 3	
HE	hematoxilina e eosina	
HIF1 α	hypoxia-inducible factor 1-alpha	
IFN- γ	interferon gama	
IgG	imunoglobulina G	
IgG1	imunoglobulina G1	
IgG2a	imunoglobulina G2a	
IgG2b	imunoglobulina G2b	
IgG3	imunoglobulina G3	
IgM	imunoglobulina M	
IL-4	interleucina 4	
Inl A	internalina A	
Inl	internalinas	
LLO	listeriolisina O	
LPS	lipopolissacarídeo	
MAC	complexo de ataque a membrana	
Met	receptor do fator de crescimento de hepatócitos	
mL	mililitro	
MMP-9	metaloprotease-9 de matriz	
MOI	multiplicidade de infecção	
MOPS	ácido 3-(N-morfolino) propanossulfônico	
MOPS	ácido 3-(N- morfolino) propanossulfônico	
mTOR	mammalian target of rapamycin	
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)	
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response 88</i>	

NaCl.....	cloreto de sódio
NF-κB.....	fator nuclear – κB
NK cells.....	células <i>natural killer</i>
OD ₆₀₀	densidade óptica a 600 nanômetros
OPD.....	dicloridrato de o- fenilenodiamina
orf.....	<i>open read frame</i>
PAMPs.....	padrões moleculares associados a patógenos
PBS.....	tampão fosfato-salino
PBST.....	solução fosfato salina com tween
Pcl.....	fosfolipases C
PCR.....	reação em cadeia da polimerase
PrfA.....	positive regulatory factor A
proteína da membrana externa.....	(OMP “outer membrane proteins”)
PTX-3.....	pentraxina 3
ROS.....	espécies reativas de oxigênio
RPMI.....	Roswell Park Memorial Institute
RPP.....	receptores de reconhecimento de padrões
SST4.....	sistema de secreção do Ttipo 4
T CD4 ⁺	linfócito T CD4 ⁺
T CD8 ⁺	linfócito T CD8 ⁺
TLR.....	toll like receptors
TNF.....	fator de necrose tumoral
TSA.....	ágar triptona de soja
UFC.....	unidades formadoras de colônias
VCB.....	vacúolo contendo <i>Brucella</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. CAPITULO I - REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1. INFECÇÃO E VACINOLOGIA DE <i>BRUCELLA</i> SPP.....	19
2.2. INFECÇÃO E VACINOLOGIA DE <i>LISTERIA</i> SPP.	25
2.3 RESPOSTA IMUNE INATA	30
2.4 MUNIDADE INATA TREINADA.	34
2.5 ZYMOZAN E O B-GLUCANA NA MODULAÇÃO DO SISTEMA IMUNE.....	37
2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	45
3. HIPÓTESE	63
4. OBJETIVOS.....	63
4.1. OBJETIVO GERAL	63
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	63
5. CAPITULO II MANUSCRITO - ARTIGO CIENTÍFICO	64
5.1. ABSTRACT	64
5.2. INTRODUCTION.....	65
5.3. MATERIAL AND METHODS	67
5.4. RESULTS	77
5.5. DISCUSSION	99
5.6. REFERENCES.....	102

1. Introdução

As doenças infecciosas representam um grande risco a vida de seres humanos e animais. Para enfrentar este tipo de ameaça o organismo hospedeiro desenvolveu mecanismos eficazes de defesa em contraponto ao aumento da capacidade de causar doença destes microrganismos (Schleimer et al., 2007). Um dos meios de defesa para a manutenção da saúde ocorre pela manutenção da homeostase de órgãos e sistemas. Essa tarefa que é desempenhada por diversos tipos celulares envolvidos na resposta imune (Gordon, 2016).

Há muito tempo acredita-se que as células do sistema imune inato não possuíam a capacidade de desenvolver memória. No entanto, há alguns anos, pesquisas têm demonstrado que células do sistema imune inato, sobretudo macrófagos, podem se tornar mais eficazes em combater agentes infecciosos após serem sensibilizados por substâncias, sem relação alguma com tais agentes. Um fato interessante é que esta resposta não ocorre apenas contra microrganismos já enfrentados por estas células, os macrófagos apresentam maior capacidade de controle mesmo contra agentes que nunca tiveram contato, durante infecções heterólogas (Quintin et al., 2012; Cheng et al., 2014). Diante dessas descobertas postulou-se denominar esta condição de imunidade inata treinada (Netea, et al., 2011).

Esta característica foi demonstrada com a vacinação contra tuberculose. A vacina BCG (bacilo Calmette-Guerin), induz a imunidade inata treinada, protegendo contra outros numerosos agentes infecciosos, mesmo que o organismo hospedeiro nunca os tivesse enfrentado antes (Quintin et al., 2012; Cheng et al., 2014). Outros microrganismos como *Candida albicans* (Rosati et al., 2024) ou mesmo, substâncias como polissacarídeos, zymosan (Ciarlo et al., 2020) e β -glucana, são capazes de induzir o treinamento imune nestas células (Moorlag et al., 2020). Estes componentes são reconhecidos por receptores que induz modificações epigenéticas e metabólicas nas células, resultando em maior capacidade de eliminação de agentes infecciosos, assim como maior indução da síntese de citocinas pró-inflamatórias. Essa ativação de células do sistema imune inato pode contribuir sobremaneira para a proteção contra numerosos agentes infecciosos, especialmente os agentes intracelulares (Netea et al., 2011; Ciarlo et al., 2020).

Dentre os agentes infecciosos que podem ser citados estão as bactérias do gênero *Brucella* spp. e *Listeria* spp. patógenos intracelulares causadores de doenças importantes tanto para saúde humana quanto animal. Bactérias do gênero *Brucella* acometem

diferentes espécies de animais domésticos causando doença crônica que envolve principalmente o sistema reprodutor com quadros de aborto ou natimortalidade, placentite, epididimite e orquite (Corbel, 2006; Pappas et al., 2006). A infecção por *L. monocytogenes* pode exibir manifestações clínicas distintas, que variam desde o desenvolvimento de inflamação do sistema nervoso central, quadros abortivos, ou quadros septicêmicos em neonatos (Engelen-Lee et al., 2018; Ogunleye et al., 2021).

Por se tratar de doenças graves, seu controle e profilaxia são de grande importância. Uma das medidas mais eficazes no controle de doenças infecciosas se dá por meio da vacinação. A vacinação desde sua descoberta até os dias atuais tem contribuído enormemente para erradicação e controle de doenças infecciosas (Piot et al., 2019). Contudo, devido a adaptação de determinados microrganismos para evadir dos mecanismos de defesa do sistema imune, a busca por protocolos vacinais com capacidades de exercer controle adequado destes agentes ainda é amplamente investigado. Isso mostra a necessidade de se compreender os mecanismos pelo qual estes microrganismos conseguem evadir da resposta imune, assim como entender de qual maneira as células do sistema imune podem ser preparadas para combater inimigos difíceis de controlar (Knight-Jones e Rushton, 2013; O'Brien e Nolan, 2019).

Uma das alternativas para aumentar a capacidade de controle de agentes infecciosos seria associar o efeito da imunidade inata treinada com vacinas. Essa associação de células com maior capacidade de eliminação de agentes infecciosos, ligadas a resposta imune adaptativa, pode maximizar o efeito vacinal, contribuindo para um controle mais eficaz das infecções causadas por agentes intracelulares.

Vacinologia em brucelose tem sido explorada há mais de 30 anos (Carvalho et al., 2016.) e há diversos estudos buscando desenvolvimento vacina contra listeriose (Rocha et al., 2021; Meng et al., 2025). Alguns estudos já avaliaram como a indução da imunidade inata treinada é capaz de controlar a infecção por *Brucella* sp. ou *Listeria* sp. *in vitro* ou *in vivo* (Ciarlo et al., 2020; Araújo et al., 2023), entretanto a avaliação da imunidade treinada como favorecedor da resposta vacinal eficaz contra estas duas infecções ainda não foram investigadas. Assim o objetivo deste estudo é avaliar o efeito da imunidade treinada em dois modelos distintos de vacina, atenuada ou inativada, contra infecção por *Brucella ovis* (Silva et al., 2015) ou *Listeria monocytogenes* (Rocha et al., 2021) em modelo murino.

2. Revisão de literatura

2.1. Infecção e vacinologia de *Brucella* spp.

As vacinas são uma das ferramentas mais poderosas quando se trata de prevenção de doenças infectocontagiosas. Graças ao desenvolvimento de vacinas, doenças importantes como a varíola foram erradicadas (Piot et al., 2019). Outras doenças de grande importância tanto para seres humanos quanto em animais, como a infecção pelo vírus da raiva (O'Brien e Nolan, 2019), bem como enfermidades que podem gerar importante déficit econômico, como é o caso da febre aftosa em animais de produção, são controladas por meio do emprego de programas de imunização (Knight-Jones e Rushton, 2013).

Contudo, ainda existem numerosos agentes infecciosos para os quais o controle da infecção por meio da vacinação é um grande desafio. A respeito disso, é possível citar a infecção por agentes infecciosos sobretudo agentes bacterianos intracelulares como *M. tuberculosis* (Zhuang, et al., 2023), *B. abortus* (Carvalho et al., 2016; Oliveira et al., 2022) e *L. monocytogenes* (Brockstedt e Dubensky Jr, 2008), que causam doenças de grande relevância tanto para saúde humana quanto animal. Ainda hoje, buscam vacinas possam conduzir a proteção eficaz e duradoura, e não representar risco a saúde, justificando numerosos estudos que abordando diversas estratégias para o desenvolvimento vacinal.

A infecção por bactérias do gênero *Brucella*, grupos de bactérias Gram-negativas e intracelular facultativas, foi descrita pela primeira vez em 1887 (Bruce, 1887). Desde então várias espécies de *Brucella* tem sido descrita, dentre estas tem-se *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae* (Corbel e Brinley-Morgan, 1984), que são mencionadas como espécies clássicas por exibirem um hospedeiro preferencial. Contudo, outras espécies de designadas como não clássicas aumentando o número de espécies que compõem este gênero: *B. pinnipedialis* (Foster et al., 2007), *B. ceti* (Foster et al., 2007), *B. microti* (Scholz et al., 2008), *B. inopinata* (Scholz et al., 2010), *B. papionis* (Whatmore et al., 2014) e *B. vulpis* (Scholz et al., 2016), assim como organismos denominados de *Bruella-Like* identificado em anfíbios (Eisenberg et al., 2016; Soler-Llorens et al., 2016).

Dentre estas espécies algumas exibem grande relevância para saúde humana e animal como *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* e *B. canis* que apresentam caráter zoonótico e são descritas como causadoras de importantes doenças em seres humanos por todo o mundo do mundo, em alguns locais ocorrendo de forma endêmica (Pappas et al., 2005;

Pappas et al., 2006). As lesões causadas por estas bactérias podem estar relacionada ao amplo tropismo celular observado em determinadas espécies (Carvalho et al., 2023). Nos seres humanos, os aspectos clínicos exibem ampla variabilidade sendo febre, dores articulares, astenia e suores noturnos os principais sinais. A doenças pode estar associada a lesões em diversos órgãos como fígado, baço, sistema nervoso central, articulações coração, mediastino e sistema reprodutor, sendo consideradas (Sabzi et al., 2017; Ebrahimpour et al., 2017; Sabzi e Faraji, 2017; Casallas et al., 2018; Bosilkovski et al., 2018; Handattu et al., 2018; Inan et al., 2019).

Nos bovinos, a infecção por *B. abortus* pode causar perdas econômicas significativas ligadas a falhas reprodutivas, assim como queda na produtividade, sendo considerada uma das principais causas de aborto em bovinos de ampla distribuição mundial (Santos et al., 2013; Carvalho et al., 2016; Gwida et al., 2016; Hernández-Mora et al., 2017; Higuera et al., 2018 Xavier et al., 2009; Poester et al., 2013).

Outras espécies de *Brucella* também causam prejuízos econômicos em criações no mundo todo. *Brucella melitensis* é o principal agente da brucelose em pequenos ruminantes, sendo também a espécie zoonótica mais patogênica ao homem (Papas et al., 2005; Blasco e Molina-Flores, 2011). *B. canis* infecta cães sendo responsável por infecções crônicas assintomáticas de diagnóstico desafiador ou associadas a falhas reprodutivas e natimortalidade (Souza et al., 2018). Infecção por *B. ovis* causa epididimite e falha reprodutiva em carneiros, e embora amplamente distribuída, é geralmente negligenciada (Carvalho Júnior et al., 2012).

Estas bactérias exibem mecanismos que implicam diretamente em sua sobrevivência, como a capacidade de permanecer e se replicar no interior de células fagocíticas como macrófagos, células trofoblásticas e células dendríticas, mais precisamente no retículo endoplasmático, sendo capaz de modular a formação do fagolisossomo, permitindo desta forma sua permanência no interior das células hospedeiras, o que dificulta sua eliminação e leva a um estado de infecção persistente (Gorvel e Moreno, 2002; Moreno, 2014).

Com base em sua característica intracelular, o controle da infecção por *Brucella* spp. é dificultado, haja vista que, este agente se abriga no interior de células hospedeiras, dificultando a ação da maioria dos antibióticos, conduzindo a dificuldades em sua eliminação (Gorvel e Moreno, 2002). Outra complicação importante para o tratamento de infecções por *Brucella* spp. é sua resistência antimicrobiana, havendo necessidade de

combinação de fármacos, especialmente doxiciclina e rifampicina, associadas a um longo período de tratamento de acordo com a apresentação clínica, estirpe envolvida e das complicações que possam surgir (Shehabi et al., 1990; Pappas et al., 2005; Pappas et al., 2006; Corbel, 2006).

Na brucelose, assim como ocorre com outros agentes infecciosos zoonóticos uma forma eficiente de prevenir a doença do homem seria controlar a infecção nos animais. Diante disso uma das principais estratégias seria por meio da vacinação, implantados por meio de programas de controle (Olsen e Stoffregen, 2005). Atualmente as vacinas em uso para prevenção da brucelose animal são oriundas de cepas vivas atenuadas, sendo as mais amplamente utilizadas comercialmente *B. melitensis* Rev-1, *B. abortus* S19 e *B. abortus* RB51 (Corbel, 2006; Dorneles et al., 2015; Carvalho et al., 2016). Entretanto, a utilização destas vacinas possui várias limitações, como risco de infecção em seres humanos, devido a inoculação acidental, risco de infecção do animal, podendo ocasionar quadros de aborto em fêmeas gestantes submetidas a vacinação, restrição de idade dos animais a serem vacinados, vacinação apenas de fêmeas, interferência em testes sorológicos, eliminação através do leite, e resistência a antibiótico (rifampicina) (Dorneles et al., 2015; Gruber et al., 2020).

Com base nestas características, a busca por vacinas capazes de conferir maior proteção sem apresentarem riscos à saúde humana e animal são frequentemente requeridas, o que tem impulsionado o desenvolvimento vacinal contra a brucelose. Contudo, segundo Carvalho et al. (2016), não há uma direção a qual seguir para melhorar o efeito protetor destas vacinas abrindo, portanto, preceito para o surgimento de novas candidatas ou de protocolos que levem ao aumento da eficiência.

Na busca por vacinas atenuadas que apresentem características consideradas ideais como, maior segurança, vias de aplicações práticas, que facilitem a imunização, efeito protetor duradouro e economicamente viável vem sendo almejados (Ficht et al., 2009).

Em estudo realizado por Hensel et al. (2020), avaliaram a capacidade de proteção contra a infecção por *B. melitensis*, pela estirpe vacinal denominada de *Brucella melitensis* 16M Δ vjbR (exibindo mutagênese de transposon que afeta a expressão de fatores de virulência), além de avaliar suas características de segurança. Neste estudo verificou-se que a estirpe vacinal quando inoculada em ovelhas gestantes pôde conduzir a quadros de aborto, assim como levar a colonização de tecidos fetais, embora em menor

quantidade quando comparado a estirpe vacinal comercial (Rev. 1), no entanto este mutante não foi capaz de conferir maior proteção durante a infecção pela estirpe selvagem de *B. melitensis*. Segundo alguns autores, o uso desta estirpe foi capaz de permitir distinguir entre animais vacinados dos animais naturalmente infectados (Wang et al., 2011).

Em experimento avaliando a capacidade de uma estirpe mutante ligada a alterações na síntese de LPS, denominado de *B. melitensis* 16M Δ wzm, foi analisada quanto sua capacidade de proteção em camundongos, assim como características de segurança e interferência em testes sorológicos tanto em camundongos quanto em ovinos (Zabalza-Baranguá et al., 2023). Um ponto importante demonstrado é sua capacidade de esta estirpe de não causar colonização de tecidos placentários e fetais, de camundongos sendo capaz ainda de conferir proteção em diante da infecção *B. melitensis* e *B. ovis*. Esta estirpe foi recuperada tanto de tecidos (linfonodos, baço e fígado) de ovinos jovens e adultos oito semanas pós-imunização, além de causar interferência em testes sorológicos. Embora não tenha sido identificado alterações gestacionais em ovelhas prenhes imunizados por esta estirpe, era possível recuperá-la por através de secreções vaginais, leite no período pós-parto (Zabalza-Baranguá et al., 2023).

Nosso grupo de pesquisa tem trabalhado há mais de uma década com o desenvolvimento vacinal de uma vacina atenuada de *B. ovis*. A candidata a vacina *B. ovis* Δ abcBA deficiente na expressão de proteínas que fazem parte de um sistema ABC transportador tem efeito protetor contra infecção por *B. ovis* demonstrado em camundongos e ovinos. Em camundongos *B. ovis* Δ abcBA tem baixa persistência no organismo, não sendo recuperada de órgãos como baço, fígado e sistema reprodutor um dia pós inoculação intraperitoneal, e não causam lesões em nenhum destes órgãos (Silva et al., 2011). Além disso reduz a colonização bacteriana em baço e fígado em camundongos vacinados e desafiados com *B. ovis* (Silva et al., 2011). No modelo murino a imunização com *B. ovis* Δ abcBA encapsulada em alginato demonstrou capacidade protetora contra infecção por *B. ovis*, *B. canis* e *B. melitensis* (Silva et al., 2015; Eckstein et al., 2020; Costa et al., 2020; Braz et al., 2022; Silva et al., 2024; Oliveira et al., 2024).

Silva et al. (2015) demonstraram que carneiros vacinados com *B. ovis* Δ abcBA encapsulada em alginato, não excretam a estirpe vacinal através do sêmen e urina. Estes animais apresentam ainda resposta imunológica tanto celular quanto humoral frente a vacina exibindo níveis significativos de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, além da

oroconversão em testes sorológicos, esses dados contribuíram para um controle eficaz da infecção, resultando na não recuperação bacteriana de animais infectados.

Este modelo vacinal também tem demonstrado eficiente proteção sobretudo quando encapsuladas por alginato e quitosana. Isso pode ser observado por Braz et al. (2022) ao avaliar os efeitos protetores desta vacina em camundongos gestantes. Nesse estudo verificou-se que a proteção induzida pela vacina era capaz de reduzir a colonização bacteriana no útero de fêmeas gestantes em, sendo importante ressaltar que esta estirpe vacinal se mostrou amplamente segura para os fetos, não sendo observado nenhum tipo de lesão que fosse atribuível a vacina. Além de proteção contra infecção em fêmeas gestantes, esta vacina se mostrou eficaz em proteger também camundongos C57BL/6 fêmeas, reduzindo a recuperação bacteriana de do baço e fígado de animais infectados, associada a redução das lesões histopatológicas nesses órgãos, e induzindo uma reposta imune humoral com altos níveis de IgG, sobretudo da subclasse IgG2b, que favorece a uma resposta imune celular importante em infecção por *B. ovis* (Oliveira et al., 2024).

As vacinas inativadas, exibem algumas características que contrastam com vacinas atenuadas, dentre elas a maior segurança, pelo fato não ter a possibilidade de tornar virulenta novamente, interferir em métodos sorológicos e representar risco tanto para animais quanto para seres humanos ser resistente a antimicrobianos (Marín et al., 1990; Blasco, 1997; Ponsart et al., 2020). Assim vacinas inativadas tornasse atrativas quanto assegura apresentada. Contudo, dependendo do método de inativação bacteriana, proteínas importantes para indução da reposta imune podem ser prejudicadas, trazendo prejuízo a proteção contra infecções (Ghattas et al., 2021). Os meios utilizados para realizar a inativação bacterina são muito variados, dentre eles a inativação por radiação gama (Rocha et al., 2021), inativação pelo calor (Motaharinia et al., 2013) pH (Durno e Tounekti, 2015) dentre outros. Desta forma a principal desvantagem destas vacinas é sua baixa capacidade imunogênica, especialmente contra patógenos intracelulares, sendo necessário, doses maiores e com maiores números de repetições, além do uso de adjuvantes na tentativa de se melhorar essa capacidade imunogênica (Montaraz e Winter, 1986; Ghattas et al., 2021). Embora a inativação pelo calor possa conferir certo grau de proteção, ela é pouco duradoura quando comparada a vacina atenuada, este fato fica ainda mais evidente devido a incapacidade de não demonstrar proteção em períodos mais longos, nesse caso, cinquenta dias pós-vacinação (Vitry et al., 2014).

Recentemente nosso grupo demonstrou que, mesmo quando associado a substâncias adjuvantes como cápsulas de alginato e quitosana, a estirpe vacinal *B. ovis* gama-irradiada não foi capaz de conferir proteção após a infecção, havendo colonização bacteriana no baço e no fígado, assim como lesões histológicas causadas por *B. ovis* em camundongos vacinados semelhantes ao observado em animais somente infectados (Silva et al., 2024). Estas informações nos permitem observar que embora sejam seguras, a baixa proteção induzida dificulta sua aplicação, impulsionando o desenvolvimento de novos métodos para obtenção de estirpe vacinais (Carvalho et al., 2016).

Outro grupo que vem ganhando destaque são as vacinas de subunidades (Carvalho et al., 2016). Estas vacinas são compostas por partículas proteicas capazes de levar a quadros de imunogenicidade contra um determinado patógeno (Lai et al., 2023). Dentre as vantagens exibidas por este grupo de vacinas tem-se sua segurança, uma vez que é composta por unidades proteicas, podendo ser utilizadas ainda em indivíduos imunossuprimidos, sem o risco de desenvolvimento de infecção (Heidary et al., 2022; Lai et al., 2023). No entanto, estas vacinas exibem desvantagens em seu uso como, menor capacidade de indução da resposta imune devido a menor antigenicidade, menos duradoura no organismo hospedeiro e por exibirem maior instabilidade, além da necessidade do uso de adjuvantes (Singha et al., 2011).

Nos últimos anos a utilização de vacinas de subunidades tem aumentado na busca por uma vacina eficaz contra a brucelose. Diversos componentes bacterianos, especialmente proteína da membrana externa (OMP) de *Brucella*, tem sido investigado quanto sua capacidade de proteção e emprego em desenvolvimento vacinal (Carvalho et al., 2016). Na tentativa de se identificar proteínas alvo com forte capacidade imunogênica, Wang et al. (2024) realizaram um estudo avaliando a capacidade de diversas proteínas, dentre elas Cu/Zn-SOD (*copper-zinc superoxide dismutase*), e diversas OMPs incluindo, OMP16, OMP19 e OMP31, BP26 e a proteína ribossomal L7/L12, como importante alvos para desenvolvimento de vacinas de múltiplas subunidades. Durante as análises verificaram-se que as proteínas Cu/Zn-SOD, OMP31 e BP26 exibiram antigenicidade considerável, assim como capacidade de ligação a TLR4.

Uma vacina de múltiplas subunidades composta por OMP25, BP26 e L7/L12 de *B. abortus* demonstrou capacidade de indução de produção de níveis significativos de anticorpos IgG específicos para cada uma das subunidades, mesmo após quarenta e dois dias após a imunização. Contudo, as subclasses de IgG observadas com maior

representatividade (IgG1 e IgG2a), direcionam um perfil de resposta para o tipo Th2 (Gupta et al., 2019). Além da indução de produção de imunoglobulinas, estas subunidades quando associadas elevaram os níveis de citocinas como IFN- γ e TNF- α , no entanto conduziram a uma redução nos níveis de IL-4 e IL-10, fato que colaborou com a redução da carga bacteriana em órgãos como o fígado e o baço (Gupta et al., 2019).

Recentemente foi demonstrado que uma vacina de subunidade composta por BP26, associada a CPG-ODN (oligonucleotídeo sintético que estimula o TLR9) (Dongye et al., 2022) como adjuvante, revelou uma resposta humoral favorecendo o estabelecimento de uma resposta do tipo Th1, por meio dos níveis altos de IgG2a produzidos, assim como maior indução de síntese de citocinas IFN- γ e TNF- α , assim como uma maior indução da polarização de macrófagos M1, que auxiliam no melhor desenvolvimento de respostas do tipo Th1 (Martinez e Gordon, 2014), assim como células TCD8 (Wen et al., 2024).

Embora vários métodos para obtenção de estirpes vacinais tenham sido avaliados, em um estudo conduzido por Carvalho et al. (2016), demonstrou que as que exibem maior representatividade na busca por uma vacina eficaz contra infecção por *Brucella* spp. são as de subunidades e as atenuadas, embora haja um discreto aumento em outros grupos como vacinas de DNA e as que utilizam estirpes mutantes. Este conjunto de dados nos mostra que apesar de vários caminhos possam ser utilizados para obtenção de candidas a vacina, o controle eficiente da infecção por estas bactérias, sobretudo as zoonóticas ainda são um desafio.

2.2. Infecção e vacinologia de *Listeria* spp.

As bactérias do gênero *Listeria* spp. são microrganismos gram-positivos, não formadores de esporos, móveis, amplamente difundidas pelo meio ambiente podendo ser isolados de amostras do solo (Liao et al., 2021), vegetais (Chen et al., 2019), água assim como em alimentos (Jaramillo-Bedoya et al., 2020). Diversas espécies de animais dentre as espécies domésticos (Dreyer et al., 2016) e selvagens (Weindl et al., 2016), além seres humanos (Engelen-Lee et al., 2018) podem ser infectados por estas bactérias.

Dentre as espécies pertencentes a este gênero, a *L. monocytogenes* é a mais importante, por ser a mais patogênica e estar relacionada a doenças graves em diversas

espécies, principalmente de mamíferos (Dreyer et al., 2016; Orsi et al., 2024; Abram et al., 2003).

Grande parte dos casos de infecção por *L. monocytogenes* em seres humanos se dá por meio do consumo de alimento contaminados, como queijo (Jaramillo-Bedoya et al., 2020), carne (Jeong et al., 2023), alimentos de origem vegetal (Chen et al., 2019), produtos industrializados (Mudadu et al., 2022). Em animais de produção como bovinos e ovinos, a infecção por este agente está ligada a silagem e pastagem contaminados (Headley et al., 2014).

Em seres humanos a infecção este microrganismo pode conduzir a quadros clínicos distintos como a ocorrência de lesões neurológicas, caracterizadas por meningite supurada, meningoencefalite supurada, rombencefalite e/ou formação de abscessos cerebrais (Engelen-Lee et al., 2018; Ogunleye et al., 2021). Outra apresentação observada em seres humanos como é a listeriose materno-fetal, caracterizados por quadros graves de inflamação placentária (Zhang et al., 2024), que podem culminar com quadros de natimortalidade, abortos, ou ainda lesões sistêmicas, assim como desenvolvimento de septicemia neonatal (Xu et al., 2022).

Em animais domésticos a listeriose pode se conduzir a alterações neurológicas ocasionadas por rombencefalite supurada, com formação de microabcesso no tronco cerebral, causando manifestações clínicas como incoordenação, desvio lateral da cabeça, depressão, cegueira unilateral (Rissi et al., 2010). Em outros casos pode resultar em aborto ou levar ao nascimento de crias fracas e natimortalidade (Clune et al., 2020). Há ainda a manifestação septicêmica, levando a lesões em diversos órgãos como fígado, coração, encéfalo e ainda inflamações intrauterinas (Rothenburger et al., 2015).

De maneira geral as infecções ocorrem por meio do consumo de alimentos contaminados sendo neste caso a via oral a principal porta de entrada para este agente (Jaramillo-Bedoya et al., 2020). Contudo, a transmissão vertical é de grande importância, uma vez que pode representar sérios riscos de vida fetal (D'Aleo et al., 2024). Após a entrada no organismo, esta bactéria, conseguem atravessar o epitélio intestinal, chegando à corrente sanguínea e linfática por onde se dissemina e chega a órgãos como linfonodos, baço e fígado, se disseminando para outras regiões do corpo e atravessando barreiras importantes como a barreira placentária e hematoencefálica (Radoshevich e Cossart, 2018).

Após a entrada no organismo hospedeiro esta bactéria é capaz de invadir células fagocíticas e não fagocíticas, isso ocorre por meio de proteínas chamadas de internalinas (Inl). Estas proteínas em especial a internalina A (Inl A), interagem com receptores de E-caderina na superfície epitelial de enterócitos, invadindo estas células (Lecuit et al., 2001). Após a invasão celular, esta bactéria fica inicialmente retida no vacúolo (fagossomo), onde então por meio da secreção de fatores de virulência como fosfolipases C (PlcA e PlcB), assim como listeriolisina O (LLO) é capaz de causar poros na membrana do fagossomo levando a sua ruptura e liberação da bactéria no citoplasma, assim como causar poros na membrana externa e permitir a saída para o meio extracelular. A partir daí esse microrganismo passa a se multiplicar e por ação da expressão de uma proteína indutora de actina (ActA) leva a um rearranjo no citoesqueleto celular por meio da polimerização de moléculas de actina o que permite que esta bactéria se movimente intracelularmente chegando até a membrana atravessando esta membrana e invadindo a célula adjacente (Pamer, 2004; Radoshevich e Cossart, 2018). Uma vez alcançando a circulação, esta bactéria consegue se disseminar para outros tecidos, como o fígado onde agora, interage por meio da Inl B com receptores celulares de hepatócitos conhecidos como Met (o receptor do fator de crescimento de hepatócitos) (Niemann et al., 2007).

Com base na capacidade de evasão do sistema imune celular métodos profiláticos são de grande importância para prevenir a infecção por este agente. Diante disso, uma estratégia a ser utilizada é o desenvolvimento vacinal. Ao longo dos anos, numerosos estudos têm buscado desenvolver vacinas eficazes contra a infecção por *L. monocytogenes*.

Candidatas a vacinas têm sido desenvolvidas a partir de estirpes mutantes de *L. monocytogenes*. A deleção de genes ligados a fatores de virulência responsáveis pela invasão celular (*prfA* - positive regulatory factor A) (Vasanthakrishnan et al., 2015); capacidade de evasão do fagossomo (*plcA*, *plcB*, *hly* e *mpl*), ou da célula (*actA*) (Yin et al., 2008) ou maior sobrevivência por amenizar a ação relacionada a respostas oxidativas intracelular (*orfX*), (Meng et al., 2020). Vacinas desenvolvidas a partir destas mutações, demonstraram ser seguras, não sendo mais recuperadas de baço e fígado de camundongos sete e nove dias após a inoculação respectivamente. Esta vacina foi capaz de evitar a morte de camundongos inoculados com dose letal em camundongos desafiados com estirpe selvagem de *L. monocytogenes*, associada a maior indução de anticorpo direcionados a LLO, assim como a indução de citocinas pró-inflamatórias voltadas para

uma resposta do tipo Th1, como TNF- α , INF- γ e IL-6, associados a ainda a uma menor síntese de IL-4 e IL-10 (Meng et al., 2020).

Um estudo realizado por Ma et al. (2020) avaliou a capacidade de quatro estirpes mutantes em desenvolver resposta protetora contra infecção por *L. monocytogenes*. Esta vacina foi projetada com base na depleção de genes associados a fatores de virulência (PrfA, ActA, Hly e InlB) importantes e que podem conferir maior proteção durante infecções em camundongos (Meng et al., 2020). Estas estirpes mutantes foram avaliadas separadamente, permitindo identificar que estas conferem proteção significativa durante a infecção por *L. monocytogenes*. Esta menor recuperação bacteriana em órgãos alvo (fígado e baço), culminou lesões anatomopatológicas mais brandas nesses órgãos. Estas características segundo os autores estavam ligadas a maior expressão de síntese de citocinas que direcionam uma resposta Th1 (Ma et al., 2020).

Meng et al. (2023) ao avaliarem o efeito protetor da vacina exibindo tripla depleção (NTSN Δ actA / plcB / orfX) demonstrou ser segura para ovinos, não sendo recuperada e nem induzindo a lesões em órgãos como fígado, baço, pulmão, cérebro e rim, 23 dias após a imunização. Além destas características, esta estirpe vacinal se mostrou eficaz na redução dos sinais clínicos em ovelhas infectadas com *L. monocytogenes*, aumentando a sobrevivência em animais submetidos a doses letais, e apresentando um fator importante que é a capacidade de diferenciar entre animais vacinados de naturalmente infectados (Meng et al., 2023).

A busca por vacinas eficazes contra infecção por *L. monocytogenes* tem sido impulsionada dado seu potencial patogênico, sobretudo em grupos de risco que exibem imunossupressão como idosos, gestantes e pacientes com doenças crônicas.

As vacinas inativadas podem ser preparadas a partir de diferentes métodos, sendo a inativação pelo calor ou por irradiação gama os mais amplamente utilizados. A avaliação de *L. monocytogenes* inativadas pelo calor, não demonstrou ser eficaz contra a infecção por *L. monocytogenes* principalmente quando associada a substâncias adjuvantes. Embora a presença de estruturas bacterianas incite uma resposta imune, a potencialização desta ação e a proteção mais eficaz só é conseguida quando se associa adjuvantes (Jazani et al., 2010). Uma vez que a resposta imune celular é necessária para o controle de agente intracelulares, o uso de adjuvantes ou associados a vacinas que possam induzir este tipo de resposta são muito interessantes (Griffiths e Khader, 2014).

Em estudos recentes, nosso grupo avaliou um protocolo vacinal com vacina inativada contra listeriose experimental (Rocha et al., 2021). Camundongos imunizados por *L. monocytogenes* inativadas irradição gama, quando revestidas por microcápsulas de alginato e quitosana forma capazes de conferir imunidade protetora em camundongos desafiados com *L. monocytogenes*. Foi observado redução da colonização bacterina em órgãos alvos (baço e fígado), aumento do número de linfócitos TCD4 e TCD8, assim como maiores índices de IFN- γ e IL-10 secretados, demonstrando que este protocolo pode levar a formação de uma resposta imune celular protetora (Rocha et al., 2021). O processo de inativação por irradição gama, permite que a célula bacteriana permanece em um estágio metabolicamente ativo, embora não consiga invadir as células e nem se replicar, no entanto é capaz de manter as proteínas superficiais altamente preservadas e assim contribuir para uma resposta imune mais ampla, quando comparados por exemplo a inativação pelo calor, onde pode ocorrer a desnaturação de proteínas imunogênicas importantes para a indução de imunidade (Magnani et al., 2009).

Um dos métodos de inativação bacteriana utilizados para obtenção de cepas vacinais se dá por meio de formalina. Embora este método tenha se mostrado prejudicial por acarretar danos a estruturas proteicas interferindo a imunogenicidade (Westcott et al., 2023). Em estudo realizado por Al-Bayati et al. (2024), comparou o desenvolvimento de estirpes vacinais inativadas por formalina e proteínas filtradas de cultura de *L. monocytogenes*. Neste trabalho os autores demonstraram que ambas as preparações imunizantes são capazes de induzir a produção de IgM e IL-1 β , porém com níveis inferiores aos animais somente infectados, além de não prevenir lesões no sistema nervoso central, baço e fígado de animais posteriormente desafiados (Al-Bayati et al., 2024).

Meng et al. (2025), utilizaram este mesmo método de inativação associado a diferentes adjuvantes com objetivo de verificar sua eficácia protetora tanto em modelo murino, quanto em ovinos. Neste estudo, os autores demonstraram que os adjuvantes hidróxido de alumínio e montanide apresentam resposta protetora semelhante, caracterizada pela redução da colonização bacterina de baço e fígado em camundongos, e maior sobrevivência em animais (camundongos e ovinos) infectados com *L. monocytogenes*. Contudo, produção de citocinas como IFN- γ , IL-6 e TNF- α é maior animais que receberam montanide como adjuvante (Meng et al., 2025).

Além da abordagem voltada para formulações vacinais contra infecção por *L. monocytogenes*, este microrganismo tem sido utilizado como vetor para desenvolvimento de novas vacinas tanto contra agentes infecciosos (Jia et al., 2022; Imhof et al., 2023) como para o controle de neoplasias (Musser et al. 2020; Hochnadel et al., 2022). Uma das características apresentada por vacinas utilizando *L. monocytogenes* é sua forte indução de uma resposta do tipo Th1, estimulando a resposta imune inata, levando a síntese de citocinas, contribuindo para o controle de agentes infecciosos intracelulares, neoplasias e vírus (Weiskirch e Paterson, 1997). Embora diversas tecnologias para a criação de novas candidatas a vacina estejam crescendo amplamente, estudos adicionais voltados a analisar e a capacidade protetoras destas vacinas em condições diversas que reflitam o quadro clínico exibido em diferentes espécies são de grande importância.

2.3. Resposta imune inata

O sistema imune inato é classicamente considerado a primeira linha de defesa do hospedeiro, onde de maneira ampla seus componentes agem de forma inespecífica contra agentes infecciosos. Este mecanismo de defesa é constituído por diferentes componentes, sendo eles a barreira epitelial, células fagocíticas como neutrófilos e macrófagos, células *natural killer* (NK cells), além de citocinas, sistema complemento e proteínas de fase aguda.

As células epiteliais desempenham papel fundamental na resposta imune inata, sendo o mecanismo intimamente relacionado na defesa do corpo, estando na interface hospedeiro-patógeno, além de contribuir para regulação e estabelecimento da resposta imune adaptativa (Medzhitov, 2007). O controle da manutenção do organismo hospedeiro é realizado a partir de diversas substâncias como lisozima, peroxidases, defensinas, fosfolipases, dentre outras (Schleimer et al., 2007), participando assim diretamente do sistema de defesa, sinalizando para chegada de células inflamatórias e adaptando-se a determinados insultos na tentativa de se tornar mais resistente.

O processo de fagocitose consiste na capacidade de células fagocíticas em capturar partículas de (0,5 µm) em uma região formada por membrana plasmática denominada de fagossomo (Rabinovitch, 1995). Este processo embora seja crucial para manutenção da imunidade inata, desempenha papéis importantes durante o desenvolvimento do

indivíduo, processos infecciosos intracelulares e extracelulares, durante a inflamação, remodelação e reparo dos tecidos após lesões (Wynn e Vannella, 2016), assim como na captação e eliminação de células necróticas, apoptóticas e senescentes, bem como diversas outras funções, sendo um importante processo na manutenção fisiológica do organismo hospedeiro (Arandjelovic e Ravichandran, 2015; Gordon, 2016).

O sistema imunológico tem células fagocíticas profissionais, em especial macrófagos e neutrófilos, cuja seu papel primordial é exercer fagocitose, além de contribuir para manutenção da integridade dos organismos hospedeiro, contribui para estabelecimento da imunidade adaptativa por meio da apresentação de antígenos (Rabinovitch, 1995; Rosales, 2018; Burn et al., 2021; Lendeckel et al., 2022). Estas células, em especial os macrófagos têm sido amplamente estudados para melhor compreensão das alterações que neles ocorrem quando são estimulados por algumas substâncias (i.e., β -glucana e zymosan) e se tornam capazes de controlar de maneira eficiente agentes infecciosos ao qual nunca tiveram contato, o que tem sido denominado de imunidade inata treinada (Netea et al., 2011; Cheng et al., 2014; Ciarlo et al., 2020; Moorlag et al., 2020).

As células NK, são uma população de linfócitos oriunda da medula óssea, mas que se encontram amplamente distribuídas por todo o organismo, sendo de grande importância para o sistema imune inato (Carrega e Ferlazzo, 2012; Artis e Spits, 2015). Os linfócitos são tipos celulares que possuem uma ampla gama de subpopulações, especialmente relacionado aos seus receptores expressos, em especial a expressão do *cluster* de diferenciação 56 (CD56) e CD16, embora outras populações de menor representatividade sejam encontradas. (Cooper et al., 2001a; Cooper et al., 2001b; Basílio-Queirós e Mischak-Weissinger, 2023). Uma das características destas células que nos permite diferenciá-las de outros linfócitos é sua capacidade de não expressar receptores de células T (Ritz et al., 1985). Células NK expressam numerosos receptores ativadores ou inibitórios, estando dentre estes receptores, dois tipos importantes ligados ao MHC de classe 1, os receptores semelhantes a lectina do tipo C e os receptores semelhantes as imunoglobulinas de células NK (Colonna et al., 1999; Kelley et al., 2005).

Esta característica permite que as células NK consigam reconhecer suas células alvo, sejam elas células tumorais, infectadas por agentes infecciosos e células que exibem algum tipo de estresse, que não permitam seu reconhecimento como fazendo parte do organismo hospedeiro, além de permitir o reconhecimento de outras células NK. Desta

maneira, estas células contribuem para a homeostase imunológica eliminando diretamente células indesejáveis assim como auxiliando no recrutamento de outras células do sistema imune (Moretta et al., 1993; Bellora et al., 2010; Wolf et al., 2023). Assim como outras células do sistema imune inato, células NK tem demonstrado sofrer alterações por estimuladores da imunidade inata treinada, contribuindo em especial para imunoterapia contra neoplasias (Waldmannová et al., 2016; Wang et al., 2023).

Outro importante mecanismo utilizado pelo sistema imune inato para controlar e reconhecer células hospedeiras alteradas é o Sistema Complemento. Este Sistema é constituído por numerosas proteínas plasmáticas que são expressas na superfície celular. Estas proteínas agem de maneira a auxiliar na eliminação de células apoptóticas (Roumenina et al., 2011), identificar patógenos por meio da opsonização (Baudino et al., 2014), promover a lise celular (Menny et al., 2018). Esse mecanismo pode ter início a partir de três diferentes vias, sendo elas: a via clássica, via alternativa e via da lectina (Norise e Remuzzi, 2013; Merle et al., 2015). Embora haja diferenças durante os acontecimentos dos eventos nas três vias, todas culminam com a formação do MAC, um conjunto proteico que conduz a formação de poros na membrana plasmática permitindo a passagem de água e íons através da membrana o que resulta na morte celular por osmólise (Menny et al., 2018; Xie et al., 2020).

Para garantir o controle de infecção por microrganismos invasores um sistema de reconhecimento eficiente é sem dúvida um dos pontos principais (Carpenter e O'Neill, 2024). Para isso as células do sistema imune inato contam com presença de regiões composta por proteínas capazes de identificar tanto moléculas endógenas quanto exógenas, estas estruturas são chamadas de receptores de reconhecimento de padrões (RRP). Esses receptores têm a capacidade de reconhecer e se ligar a compostos moleculares em patógenos denominados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), além de reconhecer células hospedeiras danificadas de maneira semelhante sendo agora então denominados de padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs) (Janeway, 1989).

Embora atualmente sejam reconhecidos diversos tipos de RRP, aqui serão abordados aqueles envolvidos no reconhecimento de bactérias ou partículas de β -glucanas. O receptor dectina-1 é um membro da família de receptores conhecidos como lectinas do tipo C, um grupo de proteínas transmembrana ou secretadas capazes de reconhecer carboidratos, embora, diversos tipos de ligantes como proteínas e lipídeos possam ter seu

reconhecimento por meio deste receptor (Weis et al., 1998; Brown et al., 2018). Este receptor é expresso em diversos tipos de células incluindo, monócitos, macrófagos, neutrófilos (Taylor et al., 2002), amplamente distribuído pelo organismo, sendo apontado como um importante meio de vigilância imunológica (Brown, 2006).

O receptor dectina-1 possui a capacidade de reconhecer diversas partículas de β -glucanas, oriundos de bactérias, fungos leveduras e cereais (Brown e Gordon, 2001). Após a ligação de partículas de β -glucana ao receptor dectina-1, dá-se início a síntese de numerosas citocinas, dentre elas as envolvidas em respostas pró-inflamatórias como IL- 1β , IL-6 e TNF- α (Cheng et al., 2014; Pedro et al., 2021).

Os receptores do tipo Toll (TLRs – do inglês: *Toll like receptors*) são compostos por glicoproteínas transmembranas do tipo 1, que exibem um domínio intracitoplasmático homólogo a Toll/IL-1, responsável pela sinalização e recrutamento de proteínas sinalizadoras, que ativam fatores de transcrição regulando a expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias (Narayanan e Ho, 2015.) Atualmente são reconhecidos dez tipos de TLRs em seres humanos e treze em camundongos (Takeuchi e Akira, 2010).

Os TLR2 são capazes de reconhecer lipoproteínas, presentes em microrganismos como bactérias, fungos e vírus. Para que haja o reconhecimento destes ligantes por este receptor há necessidade da interação deste com TLR1 ou TLR6, formando heterodímeros (Takeuchi e Akira, 2010). Estudos tem demonstrado uma interação entre a TLR2 e dectina-1, na superfície celular de macrófagos relacionados ao reconhecimento de zymosan, o que induz a ativação de proteínas quinase do baço culminando com transcrição de pró-IL- 1β , levando a síntese secreção de IL- 1β (Rogers et al., 2005).

Um importante receptor capaz de identificar lipopolissacarídeos (LPS) na superfície de bactérias gram-negativas é o TLR4. No entanto para o reconhecimento desta estrutura este receptor atua simultaneamente com MD-2 (Shimazu et al., 1999), uma molécula denominada de proteína de ligação ao LPS (Tsukamoto et al., 2018). Após a ativação deste receptor por LPS, uma via de sinalização por meio do MyD88 (*Myeloid differentiation* 88), um importante sinalizador que se liga ao receptor TLR (Medzhitov, et al., 1998) e inicia a ativação do fator nuclear-kappa B (NF- κ B), um importante fator de transcrição que tem a capacidade de regular diversos genes envolvidos na resposta inflamatória sobretudo conduzido a formação de citocinas pró-inflamatórias (Oeckinghaus e Ghosh, 2009). Este processo conduz a alterações do metabolismo celular em macrófagos, deixando estas células mais ativas, por meio de alterações no

metabolismo da glicose, conduzindo a glicólise anaeróbica, o que é demonstrado pela maior síntese de IL-1 β e maior produção de ROS, permitindo um controle mais eficiente de processos infecciosos (Mills et al., 2016).

A sinalização por meio destes receptores tem importante função na indução da resposta imunológica, desencadeiam a ativação das células da imunidade inata e permitem assim por seguinte a ativação da imunidade adaptativa (Akira et al., 2006).

2.4. Imunidade inata treinada

Memória imunológica é uma característica de células do sistema imune adaptativo, embora estudos tenham demonstrado que macrófagos após serem estimulados com substâncias como por exemplos zymosan e β -glucana exibem uma capacidade de melhor controlar microrganismos heterólogos (Bowdish et al., 2007; Ciarlo et al., 2020). Esta característica é demonstrada quando após processo infecciosos ou vacinais, macrófagos são capazes de elaborar uma resposta mais rápida e de maior intensidade em uma segunda exposição, proporcionando um controle mais eficiente de microrganismos similares ou distintos ao estímulo inicial. Esta característica tem sido denominada de imunidade inata treinada (Netea et al., 2011).

A capacidade de resposta gerada na imunidade inata treinada é distinta da imunidade adaptativa. Segundo Netea e Joosten (2024) exibe uma série de características peculiares como: não ser gerada a partir de um antígeno específico, resultar em reprogramação epigenética duradouras, levando a alterações do metabolismo celular com regulação da transcrição gênica. As células do sistema imune inato, reconhecem substâncias estimuladoras (i.e., β -glucana) por meio do receptor dectina-1. Em seguida inicia-se uma cascata de sinais de transcrição através de fatores de transcrição como NF- κ B, proteína STAT (transdutor de sinal ativador de transcrição) e proteína ativadora 1 (AP-1), recrutando enzimas que levam a alterações da cromatina tornando-a mais acessível (Netea et al., 2016). Isso leva a monometilação ou trimetilação da histona três na lisina quatro (H3K4me1 e H3K4me3), acetilação da histona três na lisina 27 (H3K427ac) (Cheng et al., 2014; Saeed et al., 2014; Netea et al., 2020) e a acetilação da histona três na lisina nove (H3K9ac) (Gates et al., 2017; Igoikina et al., 2019; Qui et al., 2025). Essas alterações levam sinalização por meio da via Akt-mTOR-HIF-1 α , conduzindo a mudança no metabolismo oxidativo da glicólise, aumento da produção de

lactato, e aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF- α e IL-1 β , levando a maior proteção contra agentes infecciosos (Cheng et al., 2014; Saeed et al., 2014; Ciarlo et al., 2020).

Primeiros estudos que evidenciam experimentalmente a imunidade inata treinada demonstraram a capacidade de proteção cruzada através da imunização com a vacina BCG (bacilo Calmette-Guerin) utilizada para profilaxia da tuberculose, conferindo proteção contra a infecção subsequente por *Candida albicans*, tanto em macrófagos que foram previamente tratados com BCG, assim como camundongos que receberam a vacina e foram posteriormente infectados pelo fungo (Wout et al., 1992).

Evidências epidemiológicas mostram que diferentes vacinas induzem proteção cruzada, contra patógenos para o qual não foram formuladas, refletindo na redução da mortalidade infantil, como ocorre em vacinas como BCG, contra o sarampo e contra a poliomielite (Higgins et al., 2016; Andersen et al., 2018; Garly et al., 2003). Contudo, esta evidência não é verdade para todas as vacinas. No caso da vacina DTP (diphtheria-tetanus-pertussis), foi verificado aumento na mortalidade (Higgins et al., 2016).

Diversos estudos têm sido direcionados a compreender como de fato ocorre a reprogramação em células do sistema imune inato que as torna capazes de exibir um padrão de células treinadas. Diversas substâncias têm sido apontadas como indutoras da imunidade inata treinada, dentre elas a vacina BCG (Jeljeli et al., 2019), *Candida albicans* (Katzmarsi et al., 2021), zymosan (Ciarlo et al., 2020) e β -glucana (Moorlag et al., 2020).

A imunidade inata treinada demonstrada pela vacinação com BCG em camundongos, foi capaz de induzir em macrófagos esplênicos maior expressão de TLR2 e TLR4, além de favorecer o aumento na síntese de citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-1 β , IL-6, e maior liberação de lactato, quando estimuladas com LPS (Jeljeli et al., 2019).

A vacina BCG tem a capacidade de infectar células-tronco hematopoiéticas da medula óssea, podendo ser recuperada, por aproximadamente 7 meses pós-imunização, quando camundongos são vacinados por via intravenosa (Kaufmann et al., 2018). Este processo favorece proliferação de células-tronco hematopoiéticas, associada a maior expressão de genes relacionados ao ciclo celular, replicação de DNA e divisão celular, culminado com o maior controle da infecção por macrófagos derivados da medula óssea,

quando submetidos a infecção *in vitro* por *Mycobacterium tuberculosis* (Kaufmann et al., 2018).

Estes efeitos estão ligados a alterações epigenéticas encontradas nestas células, caracterizadas pela trimetilação da lisina quatro na histona três (H3K4m3), assim como a acetilação da lisina vinte e sete da histona três (H3K27ac) e monometilação da lisina quatro na histona três (H3K4m1). As regiões gênicas reguladoras (H3K27ac e H3K4m3), exibiram maior enriquecimento de genes, que estão relacionados ao controle da infecção por este agente, levando ao controle mais eficiente durante o desafio infeccioso, mediada pela síntese de citocinas pró-inflamatórias (Kaufmann et al., 2018; Jeljeli et al., 2019).

Candida albicans também já foi avaliado como agente indutor da imunidade treinada. Camundongos machos previamente treinados com *C. albicans* tiveram sua prole submetido a infecção por *Escherichia coli*, resultando em maior proteção destes animais, caracterizada pela menor recuperação de colônias bacterianas de órgãos como fígado, baço, rim e pulmão, e associada a maior síntese de IL-1 β e IL-6. Este mesmo efeito foi demonstrado na segunda geração dos animais, o que demonstrou a capacidade da transmissão entre gerações destas alterações epigenéticas (Katzmarski et al., 2021).

Assim como na indução da imunidade inata treinada por microrganismos, efeitos similares foram observados quando o treinamento imunológico é realizado por meio do uso do β -glucana. Alterações epigenéticas relacionadas a H3K27ac e H3K4m3, levando a alterações no metabolismo celular principalmente aumento da glicólise oxidativa, que associadas a síntese de citocinas como IL-6, favorecem o controle de infecções (Moorlag et al., 2020; Vierboom et al., 2021; Ferreira et al., 2024).

Em estudo realizado por Ciarlo et al. (2020), demonstrou a indução imunidade inata treinada por ação de zymosan contra diversos agentes infecciosos, incluindo *L. monocytogenes*, *C. albicans*, *E. coli*, *Staphilococcus aureus*, *Citrobacter rodentium* e *Pseudomonas aeruginosa*. Surpreendentemente, durante infecção por estes agentes, camundongos treinados por cinco semanas apresentam maior sobrevivência, refletindo em menor recuperação bacteriana. Estes resultados foram sustentados por uma resposta mais robusta de IL-1 β e IL-6, através da sinalização via MyD88 e alterações epigenéticas ligados a ativação da cromatina (H3K4m1 e H3K4m3) (Ciarlo et al., 2020).

A capacidade de transmitir proteção heteróloga a seus descendentes também foi observado em camundongos treinados com zymosan. Camundongos treinados

submetidos a um desafio de 10^4 UFC (unidade formadora de colônia) de *L. monocytogenes* pela via intravenosa, apresentam maior sobrevivência, menor perda de peso, bem como menor recuperação bacteriana em animais descendentes (primeira geração) (Katzmarski et al., 2021).

O entendimento a respeito dos efeitos ocasionados pela ação dos indutores da imunidade inata treinada, são de grande importância. O conhecimento de quais substâncias podem conduzir a este perfil imunológico, assim como a compreensão dos meios pelas quais estas substâncias são reconhecidas, captadas por células imunes inatas e qual o seu efeito sobre elas, permitirá traçar novas estratégias para diversas aplicações no qual este efeito é desejado, sobretudo no controle de doenças infecciosas.

2.5. Zymosan e o β -glucana na modulação do sistema imune

O zymosan é um componente da parede celular de leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, formado por uma grande quantidade de polissacarídeos, dentre estes, β -glucana e manano, sendo o β -glucan o mais representativo, correspondendo a mais de 50% da composição total (Di Carlo e Fiore, 1958). A β -glucana é um composto polissacarídeo que pode ser encontrado em diversos microrganismos como leveduras, bactérias, assim como em algas marinhas e diversos vegetais (Du et al., 2013).

Dentre as numerosas aplicações destes polissacarídeos tem-se sua capacidade de ajustar os níveis plasmáticos de glicose e insulina. Este efeito segundo alguns autores, se deve por diferentes mecanismos, como a viscosidade gerada por estes polissacarídeos, em especial os solúveis, que aumentam o tempo de passagem dos alimentos a través do trato gastrointestinal, exibindo assim a capacidade de regulação do apetite, retardo no esvaziamento gástrico e diminuição o trânsito intestinal, melhorando assim a absorção dos nutrientes (Kristensen e Jensen, 2011; Rebello et al., 2014). Segundo alguns autores, isso ocorre devido a capacidade destas substâncias formarem uma estrutura capaz de encapsular moléculas proteicas e amidos, retardando sua degradação (Zhang et al., 2017). Estas características contribuíram tanto para a uma maior secreção quanto para a diminuição da resistência à insulina (Liu et al., 2016).

Outra aplicação importante observada é a capacidade de redução dos níveis de colesterol LDL (*low-density lipoprotein*) na corrente sanguínea. O mecanismo pelo qual

o este efeito ocorre ainda é pouco compreendido, no entanto, acredita-se que isto se dá devido à absorção mais lenta e aumento da excreção dos sais biliares devido a característica de viscosidade gerada pelo uso destes polissacarídeos (Gunnness et al., 2012). Um estudo realizado por Wolever et al. (2021) demonstrou a capacidade de redução dos níveis LDL em pacientes que receberam três vezes ao dia, durante quatro semanas, uma bebida contendo 1g de β -glucana de alto peso molecular (três gramas ao dia), de maneira a contribuir para diminuição dos riscos de desenvolvimento de doenças cardiovasculares em homens e mulheres.

O controle da obesidade é outro fator observado pelo uso destas substâncias. De acordo com estudo realizado por Xin-Zhong et al. (2015), ao fornecer alimento contendo altos níveis de lipídeos e 5% de β -glucanas por um período de oito semanas, observou diminuição do peso corporal e dos níveis de tecido adiposo, no acúmulo de lipídeos intracitoplasmático em hepatócitos e melhoria nos índices de taxas glicêmicas e triglicerídeos. A β -glucana atua como fibra alimentar, contribuindo para digestão mais lenta dos alimentos, para o controle do consumo de energias (Bai et al., 2019).

A ação do β -glucana vem sendo investigada também no controle de processos neoplásicos. Camundongos portadores do tumor S180, uma linhagem celular que desencadeia o surgimento de sarcomas sólidos em camundongos, tratados por via oral com diferentes doses de β -glucana, apresentaram a uma dose de 200 mg/kg uma diminuição significativa do tamanho e do peso da neoplasia (Mo et al., (2017). Esta redução está relacionada a maior indução de apoptose, por meio de ativação de genes diretamente envolvidos na regulação da apoptose (Xu et al., 2016, Mo et al., 2017).), além do aumento na proporção de células T CD8, expressão de citocinas como IL-2, IL-6 e TNF- α (Mo et al., 2017). No estudo realizado por Taghavi et al. (2018) a inoculação de zymosan por via intraperitoneal na dose de 10 μ g/animal permitiram um melhor controle do melanoma em camundongos. Os autores associam este efeito a maior expressão TNF- α , e de TLR 2 e 4 em macrófagos peritoneais de camundongos. Além deste efeito, verificou-se ainda que os animais tratados com zymosan exibem maior proliferação de esplenócitos, associados ao aumento de sua viabilidade.

Há alguns anos, os efeitos de polissacarídeos sobre a manutenção da saúde através da modulação da resposta imune têm sido demonstrados (Tzianabos, 2000; Castro et al., 2021). De maneira geral, estes polissacarídeos são capazes de induzir uma resposta pró-inflamatória, culminando com a secreção de citocinas, permitindo maior ativação de

macrófagos, embora já se tenha sido observado este efeito em outros tipos celulares como neutrófilos (LeBlanc et al., 2006) e células NK (Richter et al., 2016). Adicionalmente, estes polissacarídeos possuem a capacidade de estimular a proliferação de células precursoras na medula óssea, levando a um aumento em especial no número de monócito e macrófagos (Hofer e Pospíšil, 2011) e melhor eficiência destas células em baço e linfonodos (Zheng et al., 2017). Esse efeito favorece melhor controle de agentes infecciosos como bactérias (Moorlag et al., 2020), fungos (Silva et al., 2021), protozoário (Santos et al., 2019) e vírus (Wang et al., 2023).

O reconhecimento destas substâncias por células do sistema imune inata, sobretudo por macrófagos ocorre por meio de receptores de reconhecimento padrão como TLRs, dectina-1 e receptor do complemento 3 (CR3) (Sato et al., 2003; McCann et al., 2005; Silva et al., 2021). As células do sistema imune inato, em especial macrófagos, reconhecem as partículas de zymosan através de TLR2, levando a ativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B), um importante mediador da resposta inflamatória, induzindo a expressão de genes pró-inflamatórios (Liu et al., 2017). Após o reconhecimento das partículas de zymosan por TLR2, há a ativação de genes que levam a uma maior expressão e secreção de TNF- α por estas células (Sato et al., 2003; Underhill, 2003). A ativação de NF- κ B e produção de TNF- α ocorre de forma dose dependente a partir de 5 μ g/mL até 100 μ g/mL (Underhill, 2003; Sato et al., 2003). A ativação pelo zymosan leva também a ativação de macrófagos, em especial relacionadas ao aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-6, assim como o aumento da capacidade fagocítica destas células (Taghavi et al., 2018).

Silva et al. (2021) observaram maior capacidade fagocítica de macrófagos tratados com zymosan, quando infectados por *Paracoccidioides brasiliensis*, assim como sua capacidade de eliminação deste agente, principalmente por meio de aumento da produção de óxido nítrico e maior acidez acidificação do fagolisossomo, além da secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-23, direcionando assim para uma resposta tanto para o tipo Th1 quanto para Th17. Neste mesmo estudo observou-se que o reconhecimento celular por meio de RRP associados ao zymosan ocorre por meio de sinergismo entre TLR2 e dectina-1. A interação entre esses RRP é importante pois tanto a via MyD88, da via da tirosina quinase, são necessárias para indução de altos níveis de citocinas, contribuindo para melhor resposta imunológica (Slack et al., 2007; Dennehy et al., 2008).

Pelo fato de zymosan possuir em sua composição diversas substâncias, mas principalmente β -glucana e manano identificar a função destas substâncias na regulação do sistema imune permite entender os efeitos ocasionados pelo uso de zymosan. No estudo realizado por Lee et al. (2021), verificou-se que *in vitro* o componente β 1-3 glucana, é o principal modulador pró-inflamatório presente em zymosan, mostrando que quando o componente β -glucana, é removido, a propriedade promotora de resposta imune Th1 é fortemente suprimida. Além disso foi demonstrado que o componente manano ocasiona o aumento da diferenciação de células T regulatórias.

O reconhecimento de β -glucana pelas células do sistema imune inato ocorre principalmente através do RRP dectina-1, embora outros receptores possam interagir de maneira sinérgica permitindo o tanto o reconhecimento e fagocitose destas substâncias quanto a ativação das vias que levam a uma resposta pró-inflamatória (Zhang et al., 2022; Brown et al., 2002; Brown e Gordon, 2001). Mesmo macrófagos murinos com CR3 deficiente ainda é capaz de reconhecer e se ligar a β -glucana, contudo macrófagos com bloqueio do receptor de dectina-1 não são capazes de tal interação (Brown et al., 2002; Adachi et al., 2004). Por outro lado, a proliferação e a mobilização de células hematopoiéticas em camundongos tratados com β -glucana está ligada ao CR3, observa-se maior quantidade de células no sangue periférico de animais que receberam uma dose subletal de irradiação gama, um fato que não foi observado quando os animais eram depletados do gene CR3 (Cramer et al., 2006).

O reconhecimento deste polissacarídeo ocorre em outros tipos celulares como neutrófilos (Baert et al., 2015), células dendríticas (Ding et al., 2018) e células *natural killer* (Vetvicka e Vetvickova, 2015). Em um estudo realizado utilizando células do sistema imune inato de suínos, diferentes β -glucanas foram testadas. Estas células eram monócitos do sangue periférico que exibiam bloqueio do receptor de dectina-1. Este bloqueio não afetou a proliferação destas células, contudo diminuiu significativamente a proliferação de linfócitos com tratamento por determinados tipos de β -glucan (escleroglucano, zymosan e curdlan) (Baert et al., 2015). Essa característica de estimular a proliferação celular, bem como conduzir a uma migração destas células progenitoras hematopoiéticas, está ligado a maior secreção de metaloprotease-9 de matriz (MMP-9) (Cramer et al., 2008), uma enzima que desempenha funções importantes durante processo inflamatórios, envolvidos no recrutamento de células inflamatórias e remodelação

tecidual, e secretada por células diversos tipos celulares dentre eles, macrófagos e neutrófilos (Steen et al., 2002).

Um fato interessante observado durante a indução da memória em células imunes inatas, é que tal fato ocorre a nível de células progenitoras, permitindo com que haja alterações de células precursoras hematopoiéticas que darão origens a células inatas, em especial macrófagos, com a capacidade de responder a microrganismos nunca vistos por estas células com maior eficiência (Quintin et al., 2012; Cheng et al., 2014).

Em um estudo realizado por Moorlag et al. (2021) monócitos oriundos do sangue periférico humano, foram estimulados com β -glucana e posteriormente submetidos a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, demonstrando uma maior capacidade de eliminação deste agente, associados a uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Um fato importante observado neste estudo é a capacidade de proliferação de células precursoras mieloides na medula óssea, associadas a sinalização pela IL-1, culminando com uma maior proteção as lesões pulmonares em animais infectados por *Mycobacterium tuberculosis* (Moorlag et al., 2020)

Um estudo recente avaliou a capacidade de β -glucana em conduzir a imunidade treinada em macrófagos oriundos de monócitos do sangue periférico de cães (Paris et al., 2020). De acordo com este estudo após o treinamento estas células eram capazes de levar a maiores índices de produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6, assim como menores índices de IL-10, além de induzir a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por estes macrófagos, o que juntos levaram a maior eliminação da infecção *in vitro* por *Escherichia coli* (Paris et al., 2020).

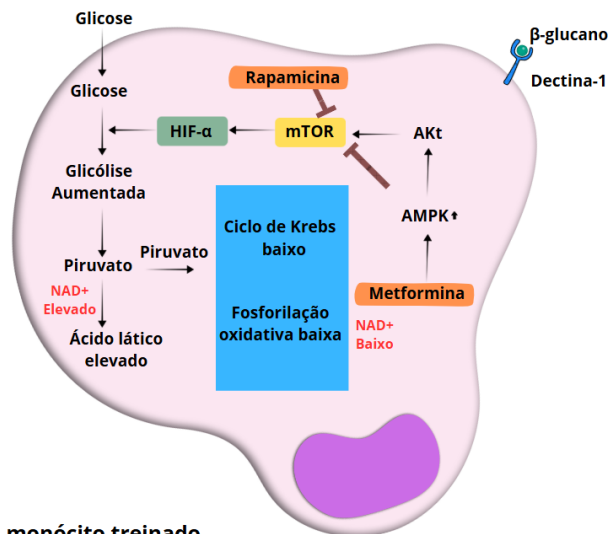
A proteção desencadeada por β -glucana também tem sido descrita contra protozoários, como *Leishmania braziliensis* (Santos et al., 2019). Este efeito de maior controle da infecção por este agente foi avaliado tanto em monócitos do sangue periférico de humanos quanto de camundongos. O treinamento induzido por β -glucana foi capaz de estimular a sínteses de citocinas pró-inflamatórias, em especial TNF- α e IL-6 (Santos et al., 2019).

Monócitos do sangue periférico de bovinos foram avaliados quanto o estímulo de treinamento induzido por β -glucana (Pedro et al., 2021). O treinamento imunológico, está relacionado ao reconhecimento do polissacarídeo via dectina-1, indução a uma maior expressão e síntese de citocinas pró-inflamatórias comumente observadas em estudos

sobre imunidade inata treinada, ou seja, maiores índices de TNF- α , IL1- β , IL-6 (Pedro et al., 2021).

Os mecanismos pelo qual as partículas de β -glucana, conduzem a formação do padrão de resposta exibido por células treinadas, tanto em monócitos circulantes quanto em células precursoras da medula óssea já foram demonstrados (Quintin et al., 2012; Cheng et al., 2014; Mitroulis et al., 2018; Moorlag et al., 2020). Estes mecanismos envolvem alterações metabólicas e epigenéticas (Cheng et al., 2014; Saeed et al., 2014; Mitroulis et al., 2018; Moorlag et al., 2020). Estas alterações metabólicas estão principalmente relacionadas a alteração do metabolismo da glicose, onde observa-se aumento da glicólise anaeróbica por meio da maior expressão de genes regulados positivamente para esta via, assim como maior expressão do gene ligado ao mTOR (*mammalian target of rapamycin*) e da maior ativação do fator de transcrição HIF1 α (*hypoxia-inducible factor 1-alpha*), levando a um maior consumo de glicose e maior produção de lactato (Cheng et al., 2014) (Figura 1). As alterações epigenéticas responsáveis por refletir alteração na expressão destes genes estão principalmente ligados a modificações em histonas como H3K4me3 (trimetilação da lisina 4 da histona 3), H3K4me1 (monometilação da lisina 4 da histona 3) e H3K27Ac (acetilação da lisina 27 da histona 3) (Cheng et al., 2014; Saeed et al., 2014) (Figura 2).

Modelo de ativação metabólica de monócito treinado



Ativação metabólica de monócito treinado

Figura 1: Modelo de indução da ativação metabólica de monócitos treinados por β -glucana, caracterizado por mudança para aumento da glicólise aeróbica e diminuição da fosforilação oxidativa. Adaptado de Cheng et al., 2014.

Embora a capacidade de β -glucana de modular as respostas imunes já tenham sido demonstradas, há grande variação entre os tipos de β -glucana disponíveis. Este efeito variável está relacionado as diferenças observadas em relação à pureza, solubilidade, peso molecular. Segundo Vetvicka e Vetvickova (2007), as formas de extração da β -glucana podem interferir, levando a baixa atividade de estimulação imunológica.

A β -glucana pode ser obtida por diferentes métodos de extração como por exemplo: extração por substâncias alcalinizantes (Kao et al., 2012), extração enzimática (Aktas-Akyildiz et al., 2018), métodos ácidos ou por meio de água quente sob pressão (Benito-Román et al., 2013). No entanto, estes processos de extração podem interferir sobremaneira tanto na qualidade quanto no rendimento obtido (Sujithra et al., 2024). Diante disso, buscar métodos de extração assim como analisar a capacidade de diferentes tipos de β -glucana em modular a resposta imune, tornam-se importantes para permitir melhor a compreensão sobre seus efeitos, de maneira a direcionar métodos mais eficientes que possam conduzir a melhorias na resposta imunológica.

Repouso (treinado, não desafiado)

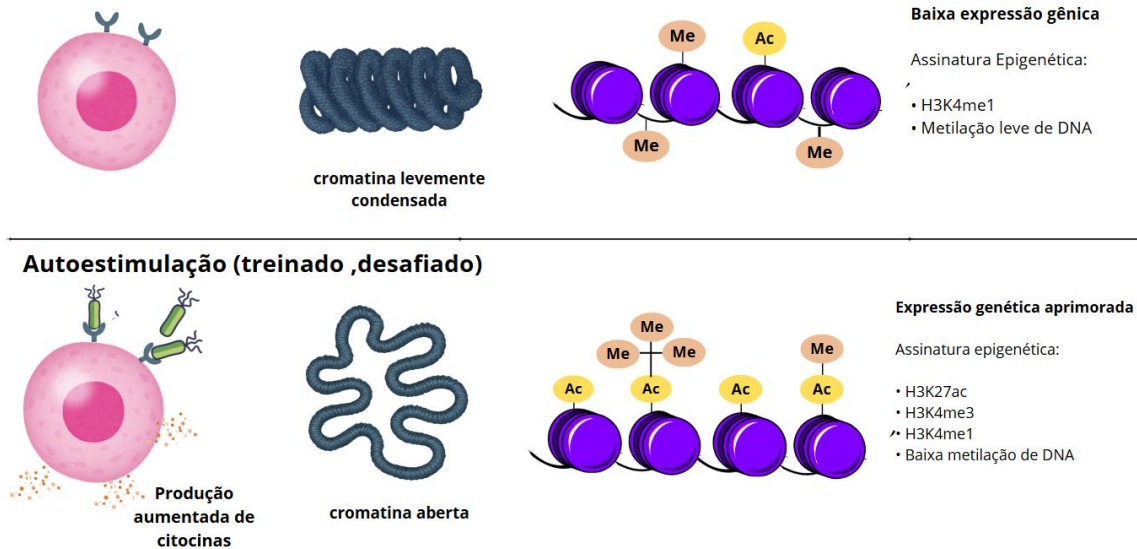


Figura 2: Reprogramação epigenética com indução da imunidade treinada. A estimulação de células imunes inatas é acompanhada pela deposição de marcas de cromatina e alterações na metilação do DNA, levando ao desdobramento da cromatina e promovendo a transcrição e a expressão de fatores pró-inflamatórios. Todas essas alterações são apenas parcialmente removidas após a cessação do estímulo. Isso permite um recrutamento mais rápido e aprimorado de fatores de transcrição e expressão gênica após o desafio secundário com outro estímulo. A figura ilustra os estados de cromatina e as assinaturas epigenéticas associadas a células não estimuladas, a células após estimulação aguda, a células "treinadas" em repouso e a células treinadas após novo estímulo. Adaptado de Netea et al., 2020.

Substâncias estimuladoras, como β -glucana, tem se tornado alvo para novas estratégias vacinais sobretudo quando estes são utilizados como adjuvantes (Paris et al., 2020; Whelan et al., 2024). De acordo com alguns estudos o uso de partículas de β -glucana como plataformas de entrega de vacinas tem demonstrado bons resultados, relacionados tanto a proteção contra desafio por agentes infecciosos, ligados a maior produção de citocinas pró-inflamatórias, o que segundo os autores torna este polissacarídeo uma substância importante para o desenvolvimento de novas tecnologias vacinais (Whelan et al., 2018; Wolf et al., 2021; Whelan et al., 2024).

Diversas aplicações de β -glucana tem sido desenvolvida em medicina veterinária, sendo principalmente utilizada como um imuno modulador. Suas aplicações vão desde contribuir para melhor desempenho de animais de produção como aves (Schwartz e Vetvicka., 2021), suínos (Vetvicka, et al., 2014), ovinos (Ząbek et al., 2013), bovinos

(Gimenes, et al., 2020) e peixes (Vetvicka et al., 2013), melhorar a capacidade de resposta do sistema imune de cães (Marchi et al., 2024) e gatos (Byrne et al., 2020), sobretudo sobre a ação no ambiente intestinal e no auxílio ao tratamento de neoplasias. Embora grande parte dos estudos experimentais se dê em modelo murino, preparações prontas e de uso comercial de β -glucanas são encontradas, sendo inclusive muitas delas de uso por via oral (Marchi et al., 2024; Marchi et al., 2025). Diante dessa ampla aplicabilidade das β -glucanas, com objetivo de melhorar o sistema imunológico, seu uso na melhoria de protocolos vacinais, auxiliando o controle de agentes infecciosos e potencializando a ação de vacinas pode se tornar uma ferramenta importante na profilaxia de doenças, no entanto estudos sobre a aplicação β -glucana com esta finalidade ainda são escassos.

2.6. Referências bibliográficas

ABRAM, M.; SCHLÜTER, D.; VUCKOVIC, D. et al. Murine model of pregnancy-associated *Listeria monocytogenes* infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2003, v.35, n.3, p.177-182, 2003.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* v.124, n.4, p.783-801, 2006.

AKTAS-AKYILDIZ, E.; SIBAKOV, J.; NAPPA, M. et al. Extraction of soluble β -glucan from oat and barley fractions: Process efficiency and dispersion stability. *J. Cereal Sci.* v.81, p.60-68, 2018.

AL-BAYATI, H.H.K.; ABDULLAH, S.A.; SHIHAB, T.J. et al. Immunogenicity of culture filtrated proteins and whole-cell killed formalin of *Listeria monocytogenes* to induced cellular immune response *in vivo*. *Open Vet. J.* v.14, n.12, p.3581-3598, 2024.

ANDERSEN, A.; FISHER, A.B.; RODRIGUES, A. et al. National immunization campaigns with oral polio vaccine reduce all-cause mortality: a natural experiment within seven randomized trials. *Front. Public. Health.* v.6, n.3, 2018.

ARANDJELOVIC, S.; RAVICHANDRAN, K.S. Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nat. Immunol.* v.9, n.16, p.907-917, 2015.

ARTIS, D; SPITS, H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature.* v. 517, p.293-301, 2015.

BAERT, K.; SONCK, E.; GODDEERIS, B.M. et al. Cell type-specific differences in β -glucan recognition and signalling in porcine innate immune cells. *Dev. Comp. Immunol.* v.48, n.1, p.192-203, 2015.

- BAI, J.; REN, Y.; LI, Y. et al. Physiological functionalities and mechanisms of β -glucans. *TIFS*. v.88, p.57-66, 2019.
- BASÍLIO-QUEIRÓS, D.; MISCHAK-WEISSINGER, E. Natural killer cells- from innate cells to the discovery of adaptability. *Front. Immunol.* v.14, p.1172437, 2023.
- BAUDINO, L.; SARDINI, A.; RUSEVA, M.M. et al. C3 opsonization regulates endocytic handling of apoptotic cells resulting in enhanced T-cell responses to cargo-derived antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* v.111, n.4, p.1503-1508, 2014.
- BELLORA, F.; CASTRICONI, R.; DONDERO, A. et al. The interaction of human natural killer cells with either unpolarized or polarized macrophages results in different functional outcomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* v.107, n.50, p. 21659-21664, 2010.
- BENITO-ROMÁN, Ó.; ALONSO, E.; COCERO, M.J. Pressurized hot water extraction of β -glucans from waxy barley. *J. Supercritical Fluids.* v.73, p.120-125, 2013.
- BLASCO, J.M.; MOLINA-FLORES, B. Control and eradication of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Vet. Clin. North Am Food Anim. Pract.*, v.27, n.1, p.95-104, 2011.
- BLASCO, J.M. A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev. Vet. Med.*, v.31, p.275-283, 1997.
- BOSILKOVSKI, M.; KAMILOSKI, V.; MISKOVA, S. et al. Testicular infection in brucellosis: Report of 34 cases. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* v.51, n.1, p.82-87, 2018.
- BOWDISH, D.M.E.; LOFFREDO, M.S.; MUKHOPADHYAY, S. et al. Macrophage receptors implicated in the "adaptive" form of innate immunity. *Microbes Infect.* v.9, n.14-15, p. 1680-1687, 2007.
- BRAZ, H.M.B.; SILVA, M.F.; CARVALHO, T.P. et al. Pathogenesis of *Brucella ovis* in pregnant mice and protection induced by the candidate vaccine strain *B. ovis* $\Delta abcBA$. *Vaccine*. v.40, n.32, p.4617-4624, 2022.
- BROCKSTEDT, D.G.; DUBENSKY, T.W. Promises and challenges for the development of *Listeria monocytogenes*-based immunotherapies. *Expert Ver. Vaccines*. v.7, p. 1069-1084, 2008.
- BROWN, G.D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat. Rev. Immunol.* v.6, n.1, p.33-43, 2006.
- BROWN, G.D.; GORDON, S. A new receptor for β -glucans. *Nature*. v.413, p.36-37, 2001.
- BROWN, G.D.; TAYLOR, P.R.; REID, D.M. et al. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J. Exp. Med.* v.196, n.3, p.407-412, 2002.
- BROWN, G.D.; WILLMENT, J.A.; WHITEHEAD, L. C-type lectins in immunity and homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* v.18. n.6, p.374-389, 2018.

BRUCE, D. Note on the discovery of a microorganism in Malta Fever. *The Practitioner*. v.39, n.3, p.161-170, 1887.

BURN, G.L.; FOTI, A.; MARSMAN, G. et al. The Neutrophil. *Immunity*. v.54, n.7, p.1377-1391, 2021.

BYRNE, J.; KNOBEL, D.; MOORE, S.M. et al. The influence of β -1,3-1,6-glucans on rabies vaccination titers in cats. *Vet. Sci.* v.7, n.3, p.118, 2020.

CARPENTER, S.; O'NEILL, L.A.J. From periphery to center stage: 50 years of advancements in innate immunity. *Cell*. v.187, n.9, p.2030-2051, 2024.

CARREGA, P.; FERLAZZO, G. Natural killer cell distribution and trafficking in human tissues. *Front Immunol.* v.3, p.347, 2012.

CARVALHO, R.F.B.; SANTOS, H.P.; MATHIAS, L.A. et al. Frequência de brucelose bovina em rebanhos leiteiros e em seres humanos na região central do estado do Maranhão, Brasil. *Arq. Inst. Biol.* v.83, p.1-6, 2016.

CARVALHO, T.P.; SILVA, L.A.; CASTANHEIRA, T.L.L. et al. Cell and tissue tropism of *Brucella* spp. *Infect. Immun.* v.91, n.5, p.e0006223, 2023.

CARVALHO JÚNIOR, C.A., MOUSTACAS, V.S., XAVIER, M.N. et al. Andrological, pathologic, morphometric, and ultrasonographic findings in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *Small Rumin. Res.* v.102, p.213-222, 2012.

CASALLAS, J.C.G.; MONSALVE, W.V.; VILLATE, S.C.A. et al. Acute liver failure complication of brucellosis infection: a case report and review of the literature. *J. Med. Case Rep.* v.12, n.62, p.1-5, 2018.

CASTRO, E.M.; CALDER, P.C.; ROCHE, H.M. β -1,3/1,6-Glucans and immunity: state of the art and future directions. *Mol. Nutr. Food Res.* v.65, n.1, p.e1901071, 2021.

CHEN, M.; CHEN, Y.; WU, Q. et al. Genetic characteristics and virulence of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh vegetables in China. *BMC Microbiology*. n.119, 2019.

CHENG, S.; QUINTIN, J.; CRAMER, R.A. et al. mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science*. v.345, n.6204, p.1250684, 2014.

CIARLO, E.; HEINONEN, T.; THÉROUDE, C. et al. Trained immunity confers broad-spectrum protection against bacterial infections. *J Infect Dis.* v.222, n.11, p.1869-1881, 2020.

CLUNE, T.; BEETSON, S.; BESIÉ, S. et al. Ovine abortion and stillbirth investigations in Australia. *Aust. Vet. J.* v. 99, n.3, p.72-78, 2020.

COLONNA, M.; NAKAJIMA, H.; NAVARRO, F. et al. A novel family of Ig-like receptors for HLA class I molecules that modulate function of lymphoid and myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.* v.66, n.4, p.375-381, 1999.

COOPER, M.A.; FEHNIGER, T.A.; TURNER, S.C et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood.* v.97, n.10, p.3146-3151, 2001b.

COOPER, M.A.; FEHNIGER, T.A.; CALIGIURI, M.A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* v.22, n.11, p.633-640, 2001a.

CORBEL, M. J. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization and World Organization for Animal Health. *Brucellosis in humans and animals.*, 2006. 86p.

COSTA, L.F., CABELLO, A.L., BATISTA, D.F.A. et al. The candidate vaccine strain *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ is protective against *Brucella melitensis* infection in mice. *Microbiol. Immunol.* v.11, n.64, p.730-736, 2020.

CRAMER, D.E.; ALLENDORF, D.J.; BARAN, J.T. et al. Beta-glucan enhances complement-mediated hematopoietic recovery after bone marrow injury. *Blood.* v.107, n.2, p.835-840, 2006.

CRAMER, D.E.; WAGNER, S.; LI, B. et al. Mobilization of hematopoietic progenitor cells by yeast-derived beta-glucan requires activation of matrix metalloproteinase-9. *Stem Cells.* v.26, n.5, p.1231-1240, 2008.

CORBEL, M. J.; BRINLEY-MORGAN, W. J. Genus *Brucella*. In: Williams and Wilkins. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore, v.1, p.377-388, 1984.

D'ALEO, F.; TUSCANO, A.; SERVELLO, T. et al. Relevance of microbiological cultures of cord blood and placental swabs in the rapid diagnosis of preterm newborn infection due to *Listeria monocytogenes*: A case report. *Case Rep. Womens Health.* v.43, p.e00638, 2024.

DENNEHY, K.M.; FERWERDA, G.; FARO-TRINDADE, I. et al. Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors. *Eur J Immunol.* v.38, n.2, p.500-506, 2008.

DI CARLO, F.J.; FIORE, J.V. On the composition of zymosan. *Science.* v.127, n.3301, p.756-7, 1958.

DING, J.; NING, Y.; BAI, Y. et al. β -Glucan induces autophagy in dendritic cells and influences T-cell differentiation. *Med. Microbiol. Immunol.* v.208, n.1, p.39-48, 2019.

DONGYE, Z.; LI, J.; WU, Y. Toll-like receptor 9 agonists and combination therapies: strategies to modulate the tumour immune microenvironment for systemic anti-tumour immunity. *Br. J. Cancer.* v.127, n.9, p.1584-1594, 2022.

- DORNELES, E.M.S.; SRIRANGANATHAN, N.; LAGE, A.P. Recent advances in *Brucella abortus* vaccines. *Vet. Res.* v.46, n.1, p.76, 2015.
- DREYER, M.; AGUILAR-BULTET, L.; RUPP, S. et al. *Listeria monocytogenes* sequence type 1 is predominant in ruminant rhombencephalitis. *Sci. Rep.* v.6, p.36419, 2016.
- DU, B.; BIAN, Z.; XU, B. Skin health promotion effects of natural beta-glucan derived from cereals and microorganisms: a review. *Phytother Res.* v.28, n.2, p.159-66, 2014.
- EBRAHIMPOUR, S.; BAYANI, M.; MOULANA, Z. et al. Skeletal complications of brucellosis: A study of 464 cases in Babol, Iran. *Caspian. J. Intern. Med.*, v.8, n.1, p.44-48, 2017.
- ECKSTEIN, C.; MOL, J.P.S.; COSTA, F.B.; et al. Affiliations expand *Brucella ovis* mutant in ABC transporter protects against *Brucella canis* infection in mice and it is safe for dogs. *Plos One.* v.15, n.4, p.1-20, 2020.
- EISENBERG, T.; RIBE, K.; SCHAUERTE, N. et al. Isolation of a novel 'atypical' *Brucella* strain from a bluespotted ribbontail ray (*Taeniura lymma*). *Antonie Van Leeuwenhoek.* v.110, n.2, p.221-234, 2017.
- ENGELEN-LEE, J.; KOOPMANS, M.M.; BROUWER, M.C. et al. Histopathology of *Listeria meningitis*. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* v.77, n.10, p.950-957, 2018.
- FERREIRA, A.V.; DOMÍNGUEZ-ANDRÉS, PICH, L.M.M. et al. Metabolic regulation in the induction of trained immunity. *Semin. Immunopathol.* v.46, n.3-4, p.7, 2024.
- FICHT, T.A.; KAHL-MCDONAGH, M.M.; ARENAS-GAMBOA, A.M. et al. Brucellosis: the case for live, attenuated vaccines. *Vaccine.* v.27, Suppl 4(Suppl 4, D40-3, 2009.
- FOSTER, G.; OSTERMAN, B.S.; GODFROID, J. et al. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* v.57, p.2688-2693, 2007.
- GARLY, M.; MARTINS, C. L.; BALÉ, C. et al. BCG scar and positive tuberculin reaction associated with reduced child mortality in West Africa. A non-specific beneficial effect of BCG? *Vaccine.* v.21, n.21-22, p.2782-2790, 2003.
- GATES, L.A.; SHI, J.; ROHIRA, A.D. et al. Acetylation on histone H3 lysine 9 mediates a switch from transcription initiation to elongation. *J. Biol. Chem.* v.292, n.35, p.14456-14472, 2017.
- GHATTAS, M.; DWIVEDI, G.; LAVERTU, M. et al. Vaccine technologies and platforms for infectious diseases: current progress, challenges, and opportunities. *Vaccines (Basel).* v.9, n.12, p.1490, 2021.

GIMENES, G.C.; DIAS, E.H.; DIAS, S.H.F. et al. Efficiency of oral supplementation of 1.3-1.6 beta-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* on the control of bovine mastites. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.72, n.4, p.1441-1448, 2020.

GOODRIDGE, H.S.; REYES, C.N.; BECKER, C.A. et al. Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse'. *Nature.* v.472, n.7344, p.471-5, 2011.

GORDON, S. Phagocytosis: An immunobiologic process. *Immunity.* v.44, n.3, p.463-475, 2016.

GORVEL, J.P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet. Microbiol.* v.90, n.1-4, p.281-297, 2002.

GRIFFITHS, K.; KHADE, S. Novel vaccine approaches for protection against intracellular pathogens. *Curr. Opin. Immunol.* v.28, p.58-63, 2014.

GRUBER, J.F.; NEWMAN, A.; EGAN, C. et al. *Brucella abortus* RB51 infections associated with consumption of raw milk from Pennsylvania - 2017 and 2018. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* v.69, n.15, p.482-483, 2020.

GUNNESS, P.; FLANAGAN, B.M.; SHELAT, K. et al. Kinetic analysis of bile salt passage across a dialysis membrane in the presence of cereal soluble dietary fibre polymers. *Food Chem.* v.134, n.4, p.2007-2013. 2012.

GUPTA, S.; SINGH, D.; GUPTA, M. et al. A combined subunit vaccine comprising BP26, Omp25 and L7/L12 against brucellosis. *Pathog. Dis.* v.77, n.8, p.ftaa002, 2019.

GWIDA, M.; EL-ASHKER, M.; MELZER, F. et al. Use of serology and real time PCR to control an outbreak of bovine brucellosis at a dairy cattle farm in the Nile Delta region, Egypt. *Ir. Vet. J.* v.69, n.3, p.1-7, 2016.

HANDATTU, K.; BHASKARANAND, N.; KINI, S.B. Neuro brucellosis mimicking neuro tuberculosis. *Indian J. Pediatr.* v.85, n.7, p.574, 2018.

HEADLEY, S.A.; BODNAR, L.; FRITZEN, J.T.T. et al. Histopathological and molecular characterization of encephalitic listeriosis in small ruminants from northern Paraná, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* v.44, n.3, p.889-896, 2014.

HEIDARY, M.; DASHTBIN, S.; GHANAVATI, R. et al., Evaluation of brucellosis vaccines: a comprehensive review. *Front. Vet. Sci.* v.9, p.925773, 2022.

HENSEL, M.E.; GARCIA-GONZALEZ, D.G.; CHAKI, S.P. et al. Vaccine candidate *Brucella melitensis* 16M Δ vjbR Is safe in a pregnant sheep model and confers protection. *mSphere.* v.5, n.3, p.e00120, 2020.

HERNÁNDEZ-MORA, G.; RUIZ-VILLALOBOS, N.; BONILLA-MONTOYA, R. et al. Epidemiology of bovine brucellosis in Costa Rica: lessons learned from failures in the control of the disease. *PLoS One.* v.12, n.8, p.1-17, 2017.

HIGGINS, J.P.T.; SOARES-WEISER, K.; LÓPEZ-LÓPEZ, J.A. et al. Association of BCG, DTP, and measles containing vaccines with childhood mortality: systematic review. *BMJ*. v.13, n.355, p.i5170, 2016.

HIGUERA, L.D.T.A.; VELÁSQUEZ, S.D.C.J.; BAUTISTA, J.L.R. et al. Identification of *Brucella abortus* biovar 4 of bovine origin in Colombia. *Ver. Argent. Microbiol.*, v.51, n.3, p.221-228, 2018.

HOCHNADEL, I.; HOENICKE, L.; PETRIV, N. et al. Safety and efficacy of prophylactic and therapeutic vaccine based on live-attenuated *Listeria monocytogenes* in hepatobiliary cancers. *Oncogene*. v.41, n.14, p.2039–2053, 2022.

HOFER M.; POSPÍŠIL, M. Modulation of animal and human hematopoiesis by β -glucans: a review. *Molecules*. v.16, 7969-7979, 2011.

IGOLKINA, A.A.; ZINKEVICH, A.; KARANDASHEVA, K.O et al. H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac, H3K27me3 and H3K9me3 histone tags suggest distinct regulatory evolution of open and condensed chromatin landmarks. *Cells*. v.8, n.9, p.1034, 2019.

IMHOF, D.; POWNALL, W.; HÄNGGELI, K.P.A. et al. Immunization with a multivalent *Listeria monocytogenes* vaccine leads to a strong reduction in vertical transmission and cerebral parasite burden in pregnant and non-pregnant mice infected with *Neospora caninum*. *Vaccines (Basel)*. v.11, n.1, p.156, 2023.

INAN, A.; ERDEM, H.; ELALDI, N. et al. Brucellosis in pregnancy: results of multicenter ID-IRI study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. v.38, n.7, p.1261-1268, 2019.

JANEWAY Jr, C.A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring. Harb. Symp. Quant. Biol*. v.54, n.1, p.1-13, 1989.

JARAMILLO-BEDOYA, E.; TRUJILLO-ALZATE, Y.A.; OCAMPO-IBÁÑEZ, I.D. Surveillance of fresh artisanal cheeses revealed high levels of *Listeria monocytogenes* contamination in the Department of Quindío, Colombia. *Pathogens*. v.10, n.10, p.1341, 2020.

JAZANI, N.H.; KARIMZAD, M.; MAZLOOMI, E. Evaluation of the adjuvant activity of naloxone, an opioid receptor antagonist, in combination with heat-killed *Listeria monocytogenes* vaccine. *Microbes. Infect*. v.12, n.5, p.382-388, 2010.

JELJELI, M.; RICCIO, LG.C.; DORIDOT, L. et al. Trained immunity modulates inflammation-induced fibrosis. *Nat Commun*. v.10, n.1, p.5670, 2019.

JEONG, J.; SONG, H.; KIM, W. et al. Tracking the contamination sources of microbial population and characterizing *Listeria monocytogenes* in a chicken slaughterhouse by using culture-dependent and-independent methods. *Front. Microbiol*. v.14, p.1282961, 2023.

JIA, Q.; MASLEŠA-GALIĆ, S.; NAVA, S. et al. Listeria-vectored multi-antigenic tuberculosis vaccine protects C57BL/6 and BALB/c mice and guinea pigs against *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Commun. Biol.* v.5, p.1388, 2022.

KANKKUNEN, P.; TEIRILA, L.; RINTAHAKA, J. et al. (1,3)- β -glucanases activate both dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages. *J. immunol.* v.184, n.11, p.6335-6342, 2010.

KAO, P.; WANG, S.; HUNG, W. et al. Structural characterization and antioxidative activity of low-molecular-weights Beta-1,3-glucan from the residue of extracted *Ganoderma lucidum* fruiting bodies. *J. Biomed. Biotechnol.* v.2012. p.673764, 2012.

KATZMARSKI, N.; DOMÍNGUEZ-ANDRÉS, J.; CIROVIC, B. et al. Transmission of trained immunity and heterologous resistance to infections across generations. *Nat. Immunol.* v. 22, p.1382-1390, 2021.

KAUFMANN, E.; SANZ, J.; DUNN, J.L. et al. BCG educates hematopoietic stem cells to generate protective innate immunity against tuberculosis. *Cell.* v.172, n.1-2, p.176-190, 2018.

KELLEY, J.; WALTER, L.; TROWSDALE, J. Comparative genomics of natural killer cell receptor gene clusters. *PLoS Genet.* v.1, n.2, p. 129-139, 2005.

KNIGHT-JONES, T.J.D.; RUSHTON, J. The economic impacts of foot and mouth disease - what are they, how big are they and where do they occur? *Prev. Vet. Med.* v.112, n.3-4, p.161-73, 2013.

KRISTENSEN, M.; JENSEN, M.G. Dietary fibres in the regulation of appetite and food intake. Importance of viscosity. *Appetite.* v.56, n.1, p.65-70, 2011.

LAI, R.; OGUNSOLA, A.F.; RAKIB, T. et al. Key advances in vaccine development for tuberculosis-success and challenges. *NPJ Vaccines.* v.8, n.1, p.158, 2023.

LEBLANC, B.W.; ALBINA, J.E.; REICHNER, J.S. The effect of PGG-beta-glucan on neutrophil chemotaxis *in vivo*. *J. Leukoc. Biol.* v.79, n.4, p.667-675, 2006.

LECUIT, M.; VANDORMAEL-POURNIN, S.; LEFORT, J. et al. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science.* v.292, n.5522, p.1722-5, 2001.

LEE, C.; VERMA, R.; BYUN, S. et al. Structural specificities of cell surface β -glucan polysaccharides determine commensal yeast mediated immuno-modulatory activities. *Nat. Commun.* v.12, n.1, p.3611, 2021.

LENDECKEL, U.; VENZ, S.; WOLKE, C. Macrophages: shapes and functions. *ChemTexts.* v.8, n.2, p.12, 2022.

LIAO, J.; GUO, X.; WELLER, D.L. et al. Nationwide genomic atlas of soil-dwelling *Listeria* reveals effects of selection and population ecology on pangenome evolution. *Nat Microbiol.* v.6, n.8, p.1021-1030, 2021.

- LIU, M.; ZHANG, Y.; ZHANG, H. et al. The anti-diabetic activity of oat β -d-glucan in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic mice. *Int. J. Biol. Macromol.* v.91, p.1170-6, 2016.
- LIU, T.; ZHANG, L.; JOO, D. et al. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target Ther.* v.2, p.17023, 2017.
- MA, J.; XIE, M.; WANG, S. et al. Immunological evaluation of virulence-deficient *Listeria monocytogenes* strains in C57BL/6 mice. *Microb. Pathog.* v.148, p.104448, 2020.
- MAGNANI, D.M.; HARMS, J.S.; DURWARD, M.A. et al. Nondividing but metabolically active gamma-irradiated *Brucella melitensis* is protective against virulent *B. melitensis* challenge in mice. *Infect. Immun.* v.77, n.11, p.5181-5189, 2009.
- MARCHI, P.H.; PRÍNCIPE, L.A.; TRINDADE, F.S. et al. Serum metabolomic profiling in healthy dogs supplemented with increasing levels of purified beta-1,3/1,6-glucans. *Animals (Basel)*. v.15, n.9, p.1211, 2025.
- MARCHI, P.H.; VENDRAMINI, T.H.A.; ZAFALON, R.V.A. et al. Effects of increasing levels of purified beta-1,3/1,6-glucans on the fecal microbiome, digestibility, and immunity variables of healthy adult dogs. *Microorganisms*. v.12, n.1. p.113, 2024.
- MARIN, C.M.; BARBERAN, M.; JIMENEZ DE BAGUES, M.P. et al. Comparison of subcutaneous and conjunctival routes of Rev 1 vaccination for the prophylaxis of *Brucella ovis* infection in rams. *Res. Vet. Sci.* v.48, n.2, p.209-215, 1990.
- MARTINEZ, F.O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* v.6, n.13, p.1-13, 2014.
- MATA-MARTÍNEZ, P.; BERGÓN-GUTIÉRREZ, M.; DEL FRESNO, C. Dectin-1 signaling update: new perspectives for trained immunity. *Front. Immunol.* v.13, p.812148, 2022.
- MCCANN, F.; CARMONA, E.; PURI, V. et al. Macrophage internalization of fungal beta-glucans is not necessary for initiation of related inflammatory responses. *Infect. Immun.* v.73, n.10, p.6340-6349, 2005.
- MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. v.449, n.7164, p.819-826, 2007.
- MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; KOPP, E. et al. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell.* v.2, n.2, p.253-258, 1998.
- MENG, F.; WANG, Y.; CHEN, c et al. The inactivated and ISA 61 VG adjuvanted vaccine enhances protection against cross-serotype *Listeria monocytogenes*. *Vet. Res.* v. 56, p.60, 2025.

MENG, F.; ZHU, T.; CHEN, c. et al. A live attenuated DIVA vaccine affords protection against *Listeria monocytogenes* challenge in sheep. *Microb Pathog.* v.181, p.106204, 2023.

MENG, F.; ZHU, T.; YAO, H. et al. A cross-protective vaccine against 4b and 1/2b *Listeria monocytogenes*. *Front Microbiol.* v.11, p.569544, 2020.

MENNY, A.; SERNA, M.; BOYD, C.M. et al. CryoEM reveals how the complement membrane attack complex ruptures lipid bilayers. *Nat. Commun.* v.9, n.1, p.5316, 2018.

MERLE, N.S.; CHURCH, S.E.; FREMEAUX-BACCHI, V. et al. Complement system part I - molecular mechanisms of activation and regulation. *Front. Immunol.* v.6, p.262, 2015.

MILLS, E.L.; KELLY, B.; LOGAN, A. et al. Succinate dehydrogenase supports metabolic repurposing of mitochondria to drive inflammatory macrophages. *Cell.* v.167, n.2, p.457-470, 2016.

MITROULIS, I.; RUPPOVA, K.; WANG, B. et al. Modulation of myelopoiesis progenitors is an integral component of trained immunity. *Cell.* v.172, n.1-2, p.147-161, 2018.

MO, L.; CHEN, Y.; LI, W. et al. Anti-tumor effects of (1→3)-β-d-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* in S180 tumor-bearing mice. *Int. J. Biol. Macromol.* v.95, p.385-392, 2017.

MONTARAZ, J.A.; WINTER, A.J. Comparison of living and nonliving vaccines for *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Infect. Immun.* v.53, n.2, p.245-251, 1986.

MOORLAG, S.J.C.F.M.; RODRIGUEZ-ROSALES, Y.A.; GILLARD, J. et al. BCG vaccination induces long-term functional reprogramming of human neutrophils. *Cell Rep.* v.33, n.7, p.108387, 2020.

MORENO, E. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Front. Microbiol.* v.5, p.1-18, 2014.

MORETTA, A.; M VITALE, M.; BOTTINO, C. et al. P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J. Exp. Med.* v.178, n.2, p.597-604, 1993.

MOTAHARINIA, Y.; REZAEI, M.A.; RASHIDI, A. et al. Induction of protective immunity against brucellosis in mice by vaccination with a combination of naloxone, alum, and heat-killed *Brucella melitensis* 16 M. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* v.46, n.4, p.253-258, 2013.

MUDADU, A.G.; PIRAS, G.; MELILLO, R. et al. Survival of naturally contaminating *Listeria monocytogenes* in commercial mediterranean-style dry fermented sausages during storage. *J. Food Prot.* v.85, n.11, p.1576-1583, 2022.

- MUSSER, M.L.; BERGER, E.P.; TRIPP, C.D. et al. Safety evaluation of the canine osteosarcoma vaccine, live *Listeria* vector. *Vet. Comp. Oncol.* v.19, n.1, p.92-98, 2020.
- NARAYANAN, K.B.; PARK, H.H. Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-mediated cellular signaling pathways. *Apoptosis.* v.20, n.2, p.196-209, 2015.
- NETEA, M.G.; JOOSTEN, L.A.B. Trained innate immunity: Concept, nomenclature, and future perspectives. *J. Allergy Clin. Immunol.* v.154, n.5, p.1079-1084, 2024.
- NETEA, M.G.; QUINTIN, J.; VAN DER MEER, J.W.M. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe.* v.9, n.5, p.355-361, 2011.
- NETEA, M.G.; JOOSTEN, L. A.B.; LATZ, E. et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science.* v.352, n.6284, p. aaf1098, 2016.
- NETEA, M.G.; DOMÍNGUEZ-ANDRÉS, J.; BARREIRO, L.B. et al. Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* v.20, n.6, p.375-388, 2020.
- NIEMANN, H.H.; JÄGER, V.; BUTLE, P.J.G. et al. Structure of the human receptor tyrosine kinase met in complex with the *Listeria* invasion protein InlB. *Cell.* v.130, n.2, p.235-246, 2007.
- NORIS, M.; REMUZZI, G. Overview of complement activation and regulation. *Semin Nephrol.* v.33, n.6, p.479-492, 2013.
- O'BRIEN, K.L; NOLAN, T. The WHO position on rabies immunization - 2018 updates. *Vaccine.* v.37, Suppl 1, p.A85-A87, 2019.
- OECKINGHAUS, A.; GHOSH, S. The NF- κ B family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring. Harb. Perspect. Biol.* v.1, n.4, p.a000034, 2009.
- OGUNLEYE, O.O.; KARIMI, V.; GUJADHUR, N. *Listeria* bacteremia presenting with cerebral abscess and endocarditis in an elderly patient with chronic immune thrombocytopenia. *Cureus.* v.13, n.7, p.e16601, 2021.
- OLIVEIRA, M.M.; PEREIRA, C.R.; OLIVEIRA, I.R.C. et al. Efficacy of *Brucella abortus* S19 and RB51 vaccine strains: A systematic review and meta-analysis. *Transbound Emerg Dis.* v.69, n.4, p.e32-e51, 2022.
- OLIVEIRA, J.B.S.; COSTA, F.B.; LIMA, P.A. et al. Evaluation of polymeric adjuvants associated with candidate vaccine strain *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ in a murine model of *Brucella ovis* infection. *Vet. Ital.* v.60, n.3, p.1-14, 2024.
- OLSEN, S.C.; STOFFREGEN, W.S. Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. *Expert Rev. Vaccines.* v.4, n.6, p.915-928, 2005.

ORSI, R.H.; LIAO, J.; CARLIN, C.R. et al. Taxonomy, ecology, and relevance to food safety of the genus *Listeria* with a particular consideration of new *Listeria* species described between 2010 and 2022. *mBio*. v.15, n.2, p.e0093823, 2024.

PAMER, E.G. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat. Rev. Immunol.* v.4, n.10, p.812-23, 2004.

PAPPAS, G.; AKRITIDIS, N.; BOSILKOVSKI, M. et al. Brucellosis. *N. Engl. J. Med.*, v.352, p.2325-2336, 2005.

PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P.; AKRITIDIS, N. et al. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect. Dis.* v.6, n.2, p.91-99, 2006.

PARIS, S.; CHAPAT, L.; PASIN, M. et al. β -Glucan-induced trained immunity in dogs. *Front. Immunol.* v.11, p.566893, 2020.

PEDRO, A.R.V.; LIMA, T.; FRÓIS-MARTINS, R. et al. Dectin-1-mediated production of pro-inflammatory cytokines induced by yeast β -glucanas in bovine monocytes. *Front. Immunol.* v.12, p.689879, 2021.

PIOT, P.; LARSON, H.J.; O'BRIEN, K.L. et al. Immunization: vital progress, unfinished agenda. *Nature*. v.575, n.7781, p.119-129, 2019.

POESTER, F.P.; SAMARTINO, L.E.; SANTOS, R.L. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* v.32, n.1, p.105-115, 2013.

PONSART, C.; RIOU, M.; LOCATELLI, Y. et al. *Brucella melitensis* Rev.1 vaccination protects against *Brucella canis* infection in mice and it is safe for dogs. *PLoS One*. v.15, n.4, p.1-20, 2020.

QIU, Q.; TONG, X.; ZHU, M. et al. Changes in gene expression levels caused by H3K9me3/H3K9ac modifications are associated with BmCPV infection in *Bombyx mori*. *Virulence*. v.16, n.1, p. 2510535, 2025.

QUINTIN, J.; SAEED, S.; MARTENS, J.H.A. et al. *Candida albicans* infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes. *Cell Host. Microbe*. v.12, n.2, p.223-232, 2012.

RABINOVITCH, M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol.* v.3, p. 85-87, 1995.

RADOSHEVICH, L.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* v.16, n.1, p.32-46, 2018.

REBELLO, C.J.; CHU, Y.; JOHNSON, W.D. et al. The role of meal viscosity and oat β -glucana characteristics in human appetite control: a randomized crossover trial. *Nutr. J.* v.13, n.49, 2014.

RICHTER, J.; KRAL, V.; POHORSKA, J. et al. Effects of β -glucana on natural killer cells in patients recovering from cancer treatment: clinical trial. *IJCEM*. v.2, n.2, p. 26-30, 2016.

RISSI, D.R.; KOMMERS, G.D.; MARCOLONGO-PEREIRA, C. et al. Meningoencefalite por *Listeria monocytogenes* em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* v.30 n.1, p.51-56, 2010.

RITZ, J.; CAMPEN, T.J.; SCHMIDTA, R.E. et al. Analysis of T-Cell receptor gene rearrangement and expression in human natural killer clones. *Sci*. v.228, e.4707, p.1540-1543, 1985.

ROCHA, C.E.V.; SILVA, M.F.; GUEDES, A.C.B. et al. Alginate-chitosan microcapsules improve vaccine potential of gamma-irradiated *Listeria monocytogenes* against listeriosis in murine model. *In.t J. Biol. Macromol.* v.10, n.176, p.567-577, 2021.

ROGERS, N.C.; SLACK, E.C.; EDWARDS, A.D. et al. Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity*. v.22, v.4, p.507-517, 2005.

ROSALES, C. Neutrophil: A Cell with many roles in inflammation or several cell types? *Front. Physiol.* v.9, n.113, 2018.

ROTHENBURGER, J.; BENNETT, K.R.; BRYAN, L. et al. Septicemic listeriosis in wild hares from Saskatchewan, Canada. *J. Wildl. Dis.* v.51, n.2, p.503-508, 2015.

ROUMENINA, L.T.; SÈNE, D.; RADANOVA, M. et al. Functional complement C1q abnormality leads to impaired immune complexes and apoptotic cell clearance. *J Immunol.* v.187, n.8, p.4369-4373, 2011.

SABZI, F.; FARAJI, R. A rare case of anterior mediastinal mass caused by *Brucella* infection. *Asian Cardiovasc. Thorac. Ann.* v.25, n.3, p.222-225, 2017.

SABZI, F.; HEIDARI, A.; FARAJI, R. Right ventricular outflow tract endocarditis caused by brucellosis. *J. Infect. Public Health.* v.10, n.5, p.678-680, 2017.

SAEED, S.; QUINTIN, J.; KERSTENS, H.H.D et al. Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Sci*. v.345, n.6204, p.1251086, 2014.

SANTOS, R.L.; MARTINS, T.M.; BORGES, A.M. et al. Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* v.33, n.6, p.759-764, 2013.

SANTOS, J.C.D.; FIGUEIREDO, A.M.B.; SILVA, M.V.T. et al. β -glucana-induced trained immunity protects against *Leishmania braziliensis* infection: a crucial role for IL-32. *Cell Rep.* v.28, n.10, p.2659-2672, 2019.

SATO, M.; SANO, H.; IWAKI, D. et al. Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are

down-regulated by lung collectin surfactant protein A. *J. Immunol.* v.171, n.1, p.417-425, 2003.

SCHLEIMER, R.P.; KATO, A.; KERN, R. et al. Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* v.120, n.6, p.1279-1284, 2007

SCHOLZ, H.C.; HUBALEK, Z.; SEDLÁČEK, I. et al. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* v.58, n.2, p.375-382, 2008.

SCHOLZ, H.C.; NÖCKLER, K.; GÖLLNER, C. et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* v.60, n.4, 801-808, 2010.

SCHOLZ, H.C.; REVILLA-FERNÁNDEZ, S.; AL DAHOUK, S. et al. *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* v.66, n.5, p.2090-2098, 2016.

SCHWARTZ, B.; VETVICKA, V. Review: β -glucans as effective antibiotic alternatives in poultry. *Molecules.* v.26, n.12, p.3560, 2021.

SHEHABI, A.; SHAKIR, K.; EI-KHATEE, M. et al. Diagnosis and treatment of 106 cases of human brucellosis. *J. Infect.* v.20, p.5-10, 1990.

SHIMAZU, R.; AKASHI, S.; OGATA, H.; NAGAI, Y. et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* v.189, n.11, p.1777-1782, 1999.

SILVA, G.S.; D A SILVA, D.A.; GUILHELMELLI, F. et al. Zymosan enhances *in vitro* phagocyte function and the immune response of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* v.59, n.8, p.749-762, 2021.

SILVA T. M. A.; PAIXÃO, T. A.; COSTA, E. A. et al. Putative ATP-binding cassette transporter is essential for *Brucella ovis* pathogenesis in mice. *Infect. Immun.* v.79, p.1706-1717, 2011.

SILVA, A.P.C.; MACÊDO, A.A.; COSTA, L.F. et al. Encapsulated *Brucella ovis* lacking a putative ATP-binding cassette transporter ($\Delta abcBA$) protects against wild type *Brucella ovis* in Rams. *PLoS One.* v.10, p.1-18, 2015.

SILVA, G.S.; SILVA, D.A.; GUILHELMELLI, F. et al. Zymosan enhances *in vitro* phagocyte function and the immune response of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* v.59, n.8, p.749-762, 2021.

SILVA, L.A.; SOUZA, M.F.; CARVALHO, T.P. et al. Comparative study on alginate/chitosan microcapsules and Montanide ISA 61 as vaccine adjuvants in mice. *PLoS One.* v.19, n.4, p. e0298117, 2024.

SINGHA, H.; MALLICK, A.I.; JANA, C. et al. Co-immunization with interleukin-18 enhances the protective efficacy of liposomes encapsulated recombinant Cu-Zn

superoxide dismutase protein against *Brucella abortus*. *Vaccine*. v.29, n.29-30, p.4720-4727, 2011.

SLACK, E.C.; ROBINSON, M.J.; HERNANZ-FALCÓN, P. et al. Syk-dependent ERK activation regulates IL-2 and IL-10 production by DC stimulated with zymosan. *Eur. J. Immunol.* v.37, n.6, p.1600-12, 2007.

SOLER-LLORENS, P.F.; QUANCE, C.R.; LAWHON, S.D. et al. A *Brucella* spp. Isolate from a pac-man frog (*Ceratophrys ornata*) reveals characteristics departing from classical *Brucellae*. *Front. Cell Infect. Microbiol.* v.6, n.116, 2016.

SOUZA, T.D.; CARVALHO, T.F.; MOL, J.P.S. et al. Tissue distribution and cell tropism of *Brucella canis* in naturally infected canine fetuses and neonates. *Sci Rep.* v.8, n.1, p.7203, 2018.

STEEN, P.H.V.; DUBOIS, B.; NELISSEN, I. et al. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* v.37, n.6, p.375-536, 2002.

SUJITHRA, S.; ARTHANAREESWARAN, G.; ISMAIL, A.F. et al. Isolation, purification and characterization of β -glucana from cereals - a review. *Int. J. Biol. Macromol.* v.256, n.1, p.128255, 2024.

TAGHAVI, M.; MORTAZ, E.; KHOSRAVI, A. et al. Zymosan attenuates melanoma growth progression, increases splenocyte proliferation and induces TLR-2/4 and TNF- α expression in mice. *J. Inflamm. (Lond)*. v.15, n.5, p.1-10, 2018.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. v.140, n.6, p.805-820, 2010.

TAYLOR, P.R.; BROWN, G.D.; REID, D.M. et al. The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J. Immunol.* v.169, n.7, p.3876-3882, 2002.

TSUKAMOTO, H.; TAKEUCHI, S.; KUBOTA, K. et al. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein stimulates CD14-dependent Toll-like receptor 4 internalization and LPS-induced TBK1–IKK ϵ –IRF3 axis activation. *J. Biol. Chem.* v.293, n.26, p.10186-10201.

TZIANABOS, A.O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clin. Microbiol. Rev.* v.13, n.4, p.523-533, 2000.

UNDERHILL, D.M. Toll-like receptors: networking for success. *Eur. J. Immunol.* v.33, n.7, p.1767-75, 2003.

VASANTHAKRISHNAN, R.B.; DE LAS HERAS, A.; SCORTTI, M. et al. PrfA regulation offsets the cost of *Listeria* virulence outside the host. *Environ Microbiol.* v.17, n.11, p.4566-4579, 2015.

VETVICKA, V.; VETVICKOVA, J. Physiological effects of different types of beta-glucan. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech Repub.* v.151, n.2, p.225-231, 2007.

VETVICKA, V.; VETVICKOVA, J. Glucan Supplementation Has Strong Anti-melanoma Effects: Role of NK Cells. *Anticancer Res.* v.35, n.10, p.5287-5292, 2015

VETVICKA, V.; VANNUCCI, L.; SIMA, P. The effects of β -glucan on fish immunity. *N. Am. J. Med. Sci.* v.5, n.10, p.580-588, 2013.

VETVICKA, V.; VANNUCCI, L.; SIMA, P. The Effects of β -Glucan on pig growth and immunity. *Open Biochem. J.* v.8, p.89-93, 2014.

VIERBOOM, M.P.M; DIJKMAN, K.; SOMBROEK, C.S. et al. Stronger induction of trained immunity by mucosal BCG or MTBVAC vaccination compared to standard intradermal vaccination. *Cell Rep. Med.* v.2, n.1, p.100185, 2021.

VITRY, M.; MAMBRES, D.H.; TREZ, C. et al. Humoral immunity and CD4+ Th1 cells are both necessary for a fully protective immune response upon secondary infection with *Brucella melitensis*. *J. Immunol.* v.192, n.8, p.3740-3752, 2014.

WALDMANNOVÁ, E.; CAISOVÁ, V.; FÁBEROVÁ, J. et al. The use of zymosan A and bacteria anchored to tumor cells for effective cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *Int. Immunopharmacol.* v.39, p.295-306, 2016.

WANG, Y.; WU, A.; XU, Z. et al. A multi-epitope subunit vaccine based on CU/ZN-SOD, OMP31 and BP26 against *Brucella melitensis* infection in BALB/C mice. *Int. Immunopharmacol.* n.127, p.111351, 2024.

WANG, Y.; BAI, Y.; QU, Q. et al. The 16M Δ vjbR as an ideal live attenuated vaccine candidate for differentiation between *Brucella* vaccination and infection. *Vet. Microbiol.* v.151, n.3-4, p.354-362, 2011.

WANG, T.; ZHANG, J.; WANG, Y. et al. Influenza-trained mucosal-resident alveolar macrophages confer long-term antitumor immunity in the lungs. *Nat. Immunol.* v.24, n.3, p.423-438, 2023.

WEINDL, L.; FRANK, E.; ULLRICH, U. et al. *Listeria monocytogenes* in different specimens from healthy red deer and wild boars. *Foodborne Pathog. Dis.* v.13, n.7, p.391-397, 2016.

WEIS, W.I.; TAYLOR, M.E.; DRICKAMER, K. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol. Rev.* v.163, p.19-34, 1998.

WEISKIRCH, L.M.; PATERSON, Y. *Listeria monocytogenes*: a potent vaccine vector for neoplastic and infectious disease. *Immunol. Rev.* v.158, p.159-169, 1997.

WEN, J.; LI, Z.; LV, Y. et al. A subunit vaccine based on *Brucella* rBP26 induces Th1 immune responses and M1 macrophage activation. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* v.56, n.6, p.879-891, 2024.

WESTCOTT, M.M.; BLEVINS, M.; WIERZBA, T.F. et al. The Immunogenicity and Properties of a whole-cell ETEC vaccine Inactivated with Psoralen and UVA light in comparison to formalin. *Microorganisms*. v. 11, n.8, p.2040, 2023.

WHATMORE, A.M.; DAVISON, N.; CLOECKAER, A. et al. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.64, p.4120-4128, 2014.

WHELAN, A.O.; FLICK-SMITH, H.C.; HOMAN, J. et al. Protection induced by a *Francisella tularensis* subunit vaccine delivered by glucan particles. *PLoS One*. v.13, n.10, p.e0200213, 2008.

WHELAN, A.O.; FLICK-SMITH, H.C.; WALKER, N.J. et al. A glucan-particle based tularemia subunit vaccine induces T-cell immunity and affords partial protection in an inhalation rat infection model. *PLoS One*. v.19, n.5, p.e0294998, 2024.

WOLEVER, T.M.S.; RAHN, M.; DIOUM, E. et al. An Oat β -glucana beverage reduces ldl cholesterol and cardiovascular disease risk in men and women with borderline high cholesterol: a double-blind, randomized, controlled clinical trial. *J. Nutr.* v.151, n.9, p.2655-2666, 2021.

WOLF, M.A.; BOEHM, D.T.; DEJONG, M.A. et al. intranasal immunization with acellular pertussis vaccines results in long-term immunity to *Bordetella pertussis* in mice. *Infect. Immun.* v.89, n.3, p.e00607-20, 2021.

WOLF, N.K.; KISSIOV, D.U.; RAULET, D.H. Roles of natural killer cells in immunity to cancer, and applications to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* v.23, n.2, p.90-105, 2023.

WOUT, J.W.V.T.; POELL, R.; FURTH, R.V. The role of BCG/PPD-activated macrophages in resistance against systemic candidiasis in mice. *Scand. J. Immunol.* v.36, n.5, p.713-719, 1992.

WYNN, T.A.; VANNELLA, K.M. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity*. v.44, n.3, p.450-462, 2016.

XAVIER, M.N.; COSTA, E.A.; PAIXÃO, T.A. et al. The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. *Ciênc. Rural*. v.39, n.7, p.2252-2260, 2009.

XIE, C.B.; JANE-WIT, D.; POBER, J.S. Complement membrane attack complex: new roles, mechanisms of action, and therapeutic targets. *Am. J. Pathol.* v.190, n.6, p.1138-1150, 2020.

XIN-ZHONG, H.; XIA-LU, S.; XIAO-PING, L. et al. Effect of dietary oat β -glucan on high-fat diet induced obesity in HFA mice. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. v.5, n.1, p.79-85, 2015.

XU, H.; ZOU, S.; XU, X. Anti-tumor effect of β -glucana from *Lentinus edodes* and the underlying mechanism. *Sci Rep*. v.6, p.28802, 2016.

XU, L.; DU, Y.; WU, Y. Neglected listeria infection in pregnancy in China: 93 cases. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* v.35, n.25, p.9549-9557, 2022.

ZABALZA-BARANGUÁ, A.; POVEDA-URKIXO, I.; MENA-BUENO, S. et al. Vaccine properties of *Brucella melitensis* 16M Δ wzm and reactivation of placental infection in pregnant sheep. *Vaccine.* v.41, n.9, p.1554-1566, 2023.

ZĄBEK, K.; MILEWSKI, S.; WÓJCIK, R. et al. Effect of β -1,3/1,6-D-glucan in diet on productivity and humoral and cellular defense mechanisms in sheep. *Acta Vet. Brno.* v.82, p.141-146, 2013.

ZHANG, J.; LUO, K.; ZHANG, G. Impact of native form oat β -glucan on starch digestion and postprandial glycemia. *J. Cereal Sci.* v.73, p.84-90, 2017.

ZHANG, Y.; LIU, X.; ZHAO, J. et al. The phagocytic receptors of β -glucan. *Int. J. Biol. Macromol.* v.205, p.430-441, 2022.

ZHANG, J.; LIU, Z.; LI, Z. et al. Clinical and genomic characteristics of a clinical *Listeria monocytogenes* st120 isolate recovered from a pregnant Woman. *Infect. Drug Resist.* v.17, p.229-237, 2024.

ZHENG, X.; ZHOU, F.; XU, X. et al. Uptake of intraperitoneally administrated triple helical β -glucana for antitumor activity in murine tumor models. *J. Mater. Chem. B.* v.5, n.47, p.9337-9345, 2017.

ZHUANG, L.; YE, Z.; LI, L. et al. Next-Generation TB vaccines: progress, challenges, and prospects. *Vaccines (Basel).* v.11, n.8, p.1304, 2023.

3. Hipótese

O uso de substâncias estimuladoras da imunidade inata treina macrófagos por meio de alterações epigenéticas em células precursoras da medula óssea, auxiliando na resposta vacinal, permitindo assim, um controle mais eficiente da infecção por *L. monocytogenes* ou *B. ovis* em modelo murino.

4. Objetivos

4.1. Objetivo geral

Avaliar o papel da imunidade inata treinada no favorecimento de uma melhor resposta vacinal das candidatas a vacina *B. ovis* $\Delta abcBA$, *B. ovis* e *L. monocytogenes* inativadas por irradiação gama encapsuladas em alginato e quitosana, em camundongos desafiados com suas respectivas estirpes selvagens.

4.2. Objetivos específicos

- i. Analisar *in vitro* a capacidade de macrófagos oriundo da medula óssea de camundongos estimulados com substâncias indutoras de imunidade inata treinada em eliminar *B. ovis* e *L. monocytogenes*.
- ii. Selecionar as substâncias que melhor induzam a resposta imune inata treinada protetora com treinamento *in vivo* de camundongos e controle da infecção *in vitro* em macrófagos.
- iii. Verificar, por meio de imunofluorescência, a ocorrência de treinamento das células da medula óssea e esplenócitos de camundongos.
- iv. Avaliar a capacidade dos estimuladores da imunidade inata treinada em melhorar a eficácia vacinal de *B. ovis* $\Delta abcBA$, *B. ovis* gama-irradiada e *L. monocytogenes* gama-irradiada, encapsuladas por alginato e quitosana.
- v. Verificar a influência de maior número de doses sobre o treinamento.
- vi. Avaliar as lesões histológicas em baço e fígado de camundongos estimulados ou não com indutores da resposta imune treinada e posteriormente vacinados ou não com *B. ovis* $\Delta abcBA$, *B. ovis* gama-irradiada e *L. monocytogenes* gama-irradiada encapsuladas por alginato e quitosana e submetidos a posterior desafio infeccioso.

5. Capítulo II: Manuscrito - artigo científico

INNATE IMMUNITY TRAINED IN THE PROTECTIVE RESPONSE OF VACCINE CANDIDATES AGAINST INTRACELLULAR PATHOGENS

Jefferson B.S. Oliveira¹, Laice A. Silva¹, Monique F.S. Sousa², Aldcejam M.F. Junior³, Marcella P. Milazzotto³, Humberto M. Brandão⁴, Renato L. Santos¹, Tatiane A. Paixão².

¹Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

²Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

³Laboratório de Metabolismo Embrionário e Epigenética, Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Santo André, São Paulo, Brasil.

⁴Laboratório de Inovação e Nanobiotecnologia e Materiais Avançados para Pecuária, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

*Author for correspondence: Tatiane Alves da Paixão. Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. CEP: 31270-901. E-mail: tatipaixao.ufmg@gmail.com

5.1 Abstract

Trained innate immunity is the ability of innate immune cells, especially macrophages, to become more effective at fighting infectious agents they have never encountered before when these cells came in contact with training substances, such as polysaccharides, β -glucan, or zymosan. Researchers have widely explored this characteristic to better understand immune responses to pathogens and develop better infection control methods. Therefore, this study aimed to investigate the ability of some of those training substances to improve the efficiency of vaccine models against *B. ovis* and *L. monocytogenes*

infection. β -glucan was able to significantly reduce bacterial burden *in vitro* in bone marrow macrophages and *in vivo* in target organs from stimulated mice compared to zymosan. Stimulation with β -glucan was not able to improve the vaccine efficiency of the attenuated *B. ovis* $\Delta abcBA$ vaccines, but a significant reduction in bacterial colonization was observed in animals vaccinated with gamma-irradiated *B. ovis*. Stimulation with β -glucan was also improved vaccine efficacy of the a gamma-irradiated inactivated *L. monocytogenes* experimental vaccine, while half of the stimulated and vaccinated mice did not have detectable bacterial recovery. The increase in number of doses was a factor that can negatively contribute to the control of infectious agents, impairing the induction of trained immunity. Our results suggest that trained innate immunity can be an important mechanism to favors the control and prevention of infectious diseases caused by intracellular bacteria, and that its use can favor certain vaccine protocols, especially for inactivated vaccines.

Keywords: trained immunity, brucellosis, listeriosis, vaccine, protection, immunization, β -glucan, zymosan.

5.2. Introduction

Infectious diseases pose a significant threat to human and animal life. To combat this threat, host organisms have developed effective defense mechanisms to counteract the increased disease-causing capacity of these microorganisms (Schleimer et al., 2007). Various cell types involved in the immune response carry out this task (Gordon, 2016). For a long time, it was believed that cells of the innate immune system were unable to develop memory. However, recent researches have shown that these cells, especially macrophages, can become more effective at fighting infectious agents after being sensitized by substances unrelated to the agents themselves. Interestingly, this response occurs not only against microorganisms that these cells have encountered, but also against those they have not. Macrophages demonstrate an increased ability to control heterologous infections (Quintin et al., 2012; Cheng et al., 2014). This phenomenon is called trained innate immunity (Netea et al., 2011).

Trained innate immunity has been demonstrated through vaccination against tuberculosis. *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) vaccine induces trained innate immunity,

which protects against numerous infectious agents, even those the host organism has never encountered before (Quintin et al., 2012; Cheng et al., 2014). Other microorganisms, such as *Candida albicans* (Rosati et al., 2024), and substances, such as polysaccharides, zymosan (Ciarlo et al., 2020), and β -glucan (Moorlag et al., 2020), can induce immune training in these cells. These components are recognized by receptors that induce epigenetic and metabolic modifications in cells. This results in greater capacity to eliminate infectious agents and greater induction of pro-inflammatory cytokine synthesis. Activation of innate immune cells can greatly contribute to protection against numerous infectious agents, especially intracellular pathogens (Netea et al., 2011; Ciarlo et al., 2020).

Infectious agents include bacteria of the genera *Brucella* and *Listeria*, which are intracellular pathogens that cause significant diseases in humans and animals. *Brucella* sp. affects various species of domestic animals, causing a chronic disease primarily affecting the reproductive system, resulting in abortion, stillbirth, placentitis, epididymitis, and orchitis (Corbel, 2006; Pappas et al., 2006). Infection with *L. monocytogenes* has various clinical manifestations in various, including inflammation of the central nervous system, abortion, and septicemia in neonates (Engelen-Lee et al., 2018; Ogunleye et al., 2021).

One of the most effective ways to control and eradicate infectious diseases is through vaccination (Piot et al., 2019) and research into vaccine protocols capable of adequately controlling these agents is ongoing. Vaccinology in brucellosis has been explored for more than 30 years (Carvalho et al., 2016.) and there are several studies seeking to develop a vaccine against listeriosis (Rocha et al., 2021; Meng et al., 2025).

It is importance to investigate the mechanisms by which these microorganisms evade the immune system, as well as how immune cells can be trained to combat challenging pathogens (Knight-Jones and Rushton, 2013; O'Brien and Nolan, 2019). One of the alternatives for increasing the ability to control infectious agents would be to associate the effect of trained innate immunity with vaccines. This association of cells with a greater capacity to eliminate infectious agents, linked to the adaptive immune response, can maximize the vaccine effect, contributing to a more effective control of infections caused by intracellular agents.

Although some studies have evaluated the ability of trained innate immunity to control *Brucella* or *Listeria* infection *in vitro* or *in vivo* (Ciarlo et al., 2020; Araújo et al., 2023), the role of trained immunity in favoring an effective vaccine response against these infections remains unexplored. In this study, we examined the impact of trained immunity on two distinct vaccine models (attenuated or inactivated) against *Brucella ovis* (Silva et al., 2015) and *Listeria monocytogenes* (Rocha et al., 2021) infections in a murine model.

5.3. Material and methods

5.3.1. Ethical statements

The experimental procedures with mice followed the laws and regulations, and the experimental procedures were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Minas Gerais, under protocols CEUA/UFMG n° 63/2021 and CEUA/UFMG n° 90/2021.

5.3.2. Animals

BALB/c and C57BL/6 female mice, aged six to eight weeks, were obtained from the UFMG Central Animal Facility. The mice were housed in a suitable animal experimentation facility with a controlled environment throughout the experiment. The facility had alternating 12-hour light/dark cycles, 70% humidity, and a temperature of 25 °C. The mice were fed sterilized commercial feed and given water *ad libitum*.

All procedures involving cell cultures and bacterial recovery were carried out in a laminar flow hood in the Biosafety Level 2 Molecular Pathology Laboratory at the UFMG Veterinary School.

5.3.3. *In vitro* evaluation of the training on the microbicidal activity of bone marrow-derived macrophages

An *in vitro* experiment was conducted to assess the effects of stimulators on the training of innate immune cells. The experiment used bone marrow macrophages from mice that had been treated with zymosan or β -glucan, intraperitoneally (i.p.). Twelve animals were used and divided into three groups (n=4): the zymosan group, the β -glucan

group, and the PBS (untreated) group. Cultured macrophages were inoculated, and intracellular survival curves of *B. ovis* and *L. monocytogenes* were determined.

5.3.4. *In vitro* infection of bone marrow macrophages

Macrophages were inoculated with *B. ovis* (multiplicity of infection [MOI] of 100) and *L. monocytogenes* (MOI of 10). Intracellular bacterial recovery from *B. ovis*-inoculated macrophages was carried out at 0, 24 and 48 hours post-infection (hpi). For *L. monocytogenes*, intracellular bacterial recovery was performed at 0, 4 and 8 hpi. Bacteria were added to the wells containing macrophages, and centrifuged at 500 x g for 5 minutes at 15°C. Plates were then incubated at 37°C and 5% CO₂ for 30 minutes. After this time, the wells were washed with sterile 1 x PBS and RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum and containing 50 µg/mL of gentamicin was added for one hour at 37°C to kill any extracellular bacteria. Culture media in the subsequent time points were changed to RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum and containing 25µg/mL gentamicin. At each time point, plates were washed three times thoroughly with 1x PBS, and cells were lysed with sterile distilled H₂O. The lysates were then serially diluted and intracellular bacteria was counted by plating on TSA plates containing 1% hemoglobin for *B. ovis* and BHI agar plates for *L. monocytogenes*. It should be noted that experiments using this methodology involved four or six mice, all in triplicate. The supernatant from uninfected or infected macrophages at each time point was collected and stored at -20°C.

5.3.5. *In vivo* evaluation of the training on vaccine protection

Several experiments were carried out to evaluate the effect of training on vaccine response. All experiments used six female mice between six and eight weeks of age per group (n = 6). In one experiment Balb/c mice was used to assess protection against *L. monocytogenes* infection, whereas in the other experiments C57BL/6 mice were used. Mice were divided into four groups: those stimulated only with training substances (zymosan or β-glucan); those that received only the vaccine strain (KLM-γ-AC, BO-γ-AC or Δ*abcBA*-AC, according to the infectious agent with which they would be challenged); those that were previously trained and then immunized with the vaccine strain; and those that did not receive any treatment (mock infected). All groups were

subsequently challenged with their respective virulent strains, i.e. *L. monocytogenes* or *B. ovis*.

Mice from the stimulated groups received zymosan or β -glucan i.p. at a dose of 1 mg/100 μ L, and non-stimulated mice received sterile PBS on day -7 (seven days before vaccination). After seven days (day zero), the mice from the non-immunized group were inoculated with sterile PBS, while those from the vaccinated groups were immunized subcutaneously. Animals immunized with KLM- γ -AC or BO- γ -AC received two vaccine doses, one on day zero and the other 15 days after the first dose, at a concentration of 1×10^7 colony forming units (CFU)/animal subcutaneously (s.c.). Mice immunized with *B. ovis* $\Delta abcBA$ -AC received a single 1×10^8 CFU/animal dose, s.c.

5.3.6. *Ex vivo* evaluation of training on vaccine protection

To evaluate the immune response induced by training and vaccination in mice, the animals were trained with β -glucan seven days prior to being vaccinated with KLM- γ -AC. Female C57BL/6 mice aged six to eight weeks were divided into four groups of six animals ($n = 6$): The groups were as follows: group stimulated with β -glucan and immunized with KLM- γ -AC; group stimulated with β -glucan; group immunized with KLM- γ -AC; and group stimulated with PBS (mock). Fifteen days after the final vaccination, the mice were euthanized, and cells were collected from their spleens for *in vitro* analysis of cell proliferation and from their bone marrow for differentiation into macrophages and *in vitro* assessment of intracellular survival.

5.3.7. Bacterial strains and culture conditions

This study used the wild-type bacterial strains *B. ovis* ATCC 25840, *L. monocytogenes* serotype 4b ATCC 19115 and *B. ovis* $\Delta abcBA$, a mutant strain generated from the deletion of the *open reading frame* (orf) *abcA* and orf *abcB* of the *abcEDCBA* locus located on chromosome II of *B. ovis* which encode an ABC-type transporter system (Silva et al., 2011).

These *B. ovis* strains were grown on tryptone soy agar (TSA, Invitrogen, USA) containing 1% hemoglobin (Becton-Dickinson, USA) for three days at a constant

temperature of 37°C in a humidified incubator with a 5% CO₂ atmosphere, and 100 µg/mL kanamycin (Gibco, Brazil) was added to the plates of the mutant strains.

The bacterial colonies were resuspended in a sterile solution of phosphate-buffered saline (PBS/ pH 7.4, Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA) and the bacterial concentration in the suspension was measured the optical density at 600 nm (OD₆₀₀) in a spectrophotometer (Bio-Rad, Hercules, CA). It was assumed that at OD₆₀₀ of 0.250 the estimated concentration of bacteria is approximately 3 x 10⁹ and 1 x 10⁹ CFU/mL for the wild-type and mutant strains respectively. Based on this data, the inoculums were prepared at the desired working concentration. To confirm the concentration of the inoculum, serial dilution and plating were carried out in culture media containing TSA with 1% hemoglobin plus 100 µg/mL kanamycin for the mutant strain.

For *L. monocytogenes* culture, a pre-inoculum was prepared and grown in BHI broth (Brain Heart Infusion, Kasv, USA) maintained under agitation at 200 RPM and at 37°C. for 15 hours. After this period, the concentration of this pre-inoculum was adjusted using a spectrophotometer (Bio-Rad, Hercules, CA) considering that at OD₆₀₀ of 1 - and 1 x 10⁹ CFU/mL, and aliquots of 500 µL containing 1 x 10⁸ CFU/mL were prepared and stored in a freezer at -80°C in a solution containing 60% glycerol. To prepare the inoculum, 500 µL aliquots containing 1 x 10⁸ CFU/mL were added to Falcon tubes containing 10 mL BHI broth, shaken at 200 RPM and at a temperature of 37°C for approximately 4 hours until this bacterial suspension reached a concentration of 1 x 10⁹ CFU/mL. The concentration of the inoculum was confirmed after serial dilution in sterile PBS and plating on BHI agar (Brain Heart Infusion, Kasv, USA).

5.3.8. Preparation of *L. monocytogenes* and *B. ovis* by gamma irradiation

A volume of 100 mL of sterile PBS containing *L. monocytogenes* or *B. ovis* at a concentration of 1 x 10⁹ CFU/mL was subjected to gamma radiation at a dose of 5 kiLogray (KGy) at the Nuclear Technology Development Center (CDTN - UFMG, Belo Horizonte). After this process, an aliquot of this suspension was plated on BHI agar (*L. monocytogenes*) or TSA with 1% hemoglobin (*B. ovis*), where no colony growth was observed, thus confirming bacterial inactivation.

5.3.9. Preparation of vaccines encapsulated in alginate and chitosan

The vaccine strains were encapsulated with alginate (Sigma-Aldrich, USA) and chitosan (Sigma-Aldrich, USA), based on a bacterial suspension containing a concentration of 1×10^9 CFU/mL of *B. ovis* $\Delta abcBA$ (Silva et al., 2015), 1×10^9 CFU/mL of gamma-irradiated *B. ovis* (BO- γ -AC) (Silva et al., 2024) and 1×10^8 CFU/mL of gamma-irradiated *L. monocytogenes* (KLM- γ -AC) (Rocha et al., 2021). For this procedure, the bacterial suspension was prepared in sterile PBS, centrifuged at $200 \times g$ for 10 minutes at 4°C , then the supernatant was discarded, and the bacterial pellet was resuspended in 1% alginate solution. Using an insulin syringe (1 mL) attached to a 33G needle, this solution was dripped into a polymerizing solution (CaCl 0.5 mM) and left to slowly homogenize for 15 minutes. After the capsules were formed, they were washed twice, under slow homogenization for 5 minutes, with a solution of MOPS (10 mM, Sigma-Aldrich, USA) with 0.85% NaCl at pH 7.4. After washing, the alginate capsules were immersed in a solution composed of chitosan containing 1% acetic acid and sodium acetate at pH 5.0, for 30 minutes under homogenization.

5.3.10. Preparation of the substances used to train innate immunity

The β -glucan used in this study was obtained from *Saccharomyces cerevisiae* and characterized as a β -1,3/1,6 glucan with a purity level of over 75%. The methodology used to prepare this β -glucan suspension was similar to that described by Cheng et al. (2014). A volume of 50 mL of sterile PBS containing a concentration of 1 mg of β -glucan per 100 μL (for *in vivo* use) was autoclaved and checked for sterility.

The zymosan suspension was prepared similarly to the method described by Ciarlo et al. (2020). Zymosan (Z4250, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Germany) was diluted in sterile PBS to a final concentration of 0.1 mg/mL (for *in vivo* use). After dilution, the suspension was left for 30 minutes in a laminar flow hood under ultraviolet light (Monroe et al., 2016) and then checked for sterility.

5.3.11. Obtaining macrophages from mouse bone marrow

To obtain macrophage precursor cells from the bone marrow, the methodology used was similar to that described by Zhang et al. (2008). During the necropsy, the pelvic

limbs were aseptically disarticulated, followed by dissection of as much of the muscle in this region as possible. After this procedure, the limbs were submerged in 70% alcohol, where they remained for a maximum of 15 minutes, and then the bone marrow from the femur and tibia was removed.

The epiphyses of both bones were removed and with a 26 G needle coupled to a syringe containing sterile PBS solution with 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ streptomycin/penicillin (10,000 U penicillin, 10 mg streptomycin/mL) (Thermo Fisher Scientific, USA), the marrow cavity was washed and the contents dispensed into a 50 mL Falcon tube. After the bone marrow had been completely removed, the contents were centrifuged at 500 x g for 10 minutes at 4°C. After this stage, the supernatant was discarded and the cell sediment was resuspended in 10 mL of RPMI medium containing 10% fetal bovine serum, 20% supernatant from the L929 cell culture and 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ streptomycin/penicillin (10,000 U penicillin, 10 mg streptomycin/mL). Then 1 mL of this cell suspension was added to Petri dishes and a volume of 9 mL of complete RPMI medium with 20% supernatant from L929 was added to each one. These plates were then left in an incubator at 37°C for a period of 7 days, and on the third day 10 mL of complete RPMI medium with 20% L929 supernatant was added.

After 7 days, the macrophages were removed from the culture plates so that the cell concentration could be checked and the *in vitro* infection stage could begin. To remove the macrophages, the supernatant was discarded and a volume of 3 mL of Trypsin 1X (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA) was added to each plate, which was left for 10 minutes in an incubator at 37°C. After all the cells were detached, the cell suspension was removed and added to a 50 mL Falcon tube. After this stage, the plate was washed a second time with 10 mL of sterile 1X PBS to recover as many cells as possible. After this procedure, the contents were centrifuged at 300 x g for 10 minutes at a temperature of 4°C. The supernatant content was then discarded and the cells resuspended in 1 mL of RPMI medium containing 10% fetal bovine serum. A 10 μL aliquot was taken from this cell suspension to count the number of cells in a Neubauer chamber using the trypan blue exclusion method at a concentration of 0.3%, and at a ratio of 1:1, i.e. for each volume of cell suspension an equal volume of 0.3% trypan blue. After determining the cell concentration, the cells were transferred to 96-well culture plates at 1×10^5 cells per well, where they remained for a period of 24 hours before being subjected to infection.

5.3.12. *In vivo* protection assay

Four weeks after the first immunization, the mice were challenged. Animals immunized with KLM- γ -AC were inoculated i.p. with 1×10^5 CFU/animal of the wild type of strain of *L. monocytogenes* in a volume of 100 μ L and euthanized four days post-infection. The animals immunized with *B. ovis* $\Delta abcBA$ or BO- γ -AC were inoculated i.p. with a dose of 1×10^6 CFU/animal of the wild type of strain of *B. ovis* in a volume of 100 μ L and then euthanized two weeks post-infection. All mice were challenged, except the animals from the uninfected mock group.

For euthanasia, an anesthetic overdose of xylazine hydrochloride (2%, 30 mg/Kg, Syntec, Brazil) and ketamine hydrochloride (1%, 210 mg/Kg, Syntec, Brazil), were injected intraperitoneally in a volume of 100 μ L. During necropsy, liver and spleen were collected to assess bacterial recovery and determine the protection index of each vaccine in the spleen. The protection index is determined by the difference in CFU in the spleen of non-immunized and immunized animals.

5.3.13. Tissue bacteriology

To determine the bacterial recovery of both *L. monocytogenes* and *B. ovis* in the target organs (spleen and liver) of infected mice, fragments of these organs were collected aseptically in 15 mL Falcon tubes containing 2 mL of sterile PBS, weighed and macerated using a tissue homogenizer (Ultra Stirrer, Biotech, USA). The tissue macerates were serially diluted and plated on TSA with 1% hemoglobin for bacterial recovery of *B. ovis* and on BHI agar for bacterial recovery of *L. monocytogenes*. The seeded plates were kept in a humidity-controlled incubator at a temperature of 37°C and at a constant atmosphere 5% CO₂ and the colonies were counted after a period of 18 hours for *L. monocytogenes* and 3 to 5 days for *B. ovis*.

5.3.14. *In vitro* stimulation of murine splenocytes

After the training and vaccination protocol described above, the mice were euthanized four weeks after the first dose of the vaccine. At necropsy, the spleen was removed aseptically to isolate the splenocytes. The spleens were macerated using a syringe plunger in a sterile Petri dish with 3 mL of RPMI medium enriched with 10%

SFB at a temperature of approximately 4°C. The cell suspensions were centrifuged at 500 x g for 10 minutes at 4°C. After this procedure, the supernatant was discarded, and the cell pellet resuspended in 5 mL of red blood cell lysis buffer (Tris-ammonium chloride, Sigma-Aldrich) for 5 min. The cell suspension was centrifuged again at 500 x g, for a period of 10 minutes at 4°C, and after discarding the supernatant, the sediment was washed three times with 10 mL of PBS 1X at 4°C. The cells were then resuspended in 1 mL of RPMI medium with 10% SFB and cell concentration was measured by excluding 0.3% Trypan blue in a hemocytometer chamber.

The cells were then added to 96-well plates (Corning, USA) at 5×10^5 cells/well in 100 μ L, all in triplicate. The cells were then stimulated with 100 μ L of RPMI (negative control), LPS from *E. coli* 2 μ g/mL, concanavalin A 5 μ g/mL or 1×10^6 CFU/mL *L. monocytogenes* gamma irradiated. The plates were then incubated at 37°C with a 5% CO₂ atmosphere for 72 hours. After this stage, the plates were centrifuged at 500 x g for 10 minutes at room temperature, the culture supernatant was collected and stored in microtubes at -20°C for verification of cytokine levels and the cells were treated for cell proliferation assay.

After removing the supernatant, 20 μ L of 5 mg/mL MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl) -2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (Invitrogen, USA) was added to each well with the cell suspensions. The plates were protected from light and incubated at 5% CO₂ at 37°C for 2 hours, with 95% humidity. Next, 30 μ L of SDS (sodium dodecyl sulfate) was added to the wells, followed by *overnight* incubation in a 5% CO₂ at 37°C. So, the plates were read at a wavelength of 595 nm on an ELISA MR-96A apparatus (Thermo Fisher Scientific, USA).

5.3.15. Measurement of cytokines from the culture of splenocytes and macrophages

The supernatant acquired during the cultivation of macrophages was evaluated for cytokine levels. IL-6 concentrations were measured in supernatants from macrophage cultures infected with *B. ovis* and *L. monocytogenes* in 96-well plates using ELISA kits (DuoSet, R&D Systems, USA) according to the manufacturer's instructions. Reading was carried out at a wavelength of 490 nm using the ELISA MR-96A apparatus (Thermo Fisher Scientific, USA). Cytokine concentrations (pg/mL) were determined by comparison with an assay standard curve.

5.3.16. Histopathology

Fragments of the liver and spleen were collected during necropsy of the mice and fixed in 10% buffered formalin solution for 24 hours. Tissue fragments were then dehydrated with alcohol in increasing concentrations (70%, 80%, 90%, and 100%) and then diaphanized in xylene. Subsequently, the fragments were immersed in paraffin to make microtome-sectioned blocks (3 μm thick) adhered to glass slides and stained with hematoxylin and eosin (HE). Histopathological evaluation was carried out for the inflammation and necrosis lesions observed in the spleen and liver and a score was assigned, classified according to the intensity of the inflammatory lesions: 0 (zero) absence, 1 (one) mild, 2 (two) moderate and 3 (three) intense lesion and for the absence 0 (zero) or the presence of necrosis 1 (one), making a maximum total value of 4 (four) (Oliveira et al., 2024). All slides were assessed blindly by two veterinary pathologists.

5.3.17. Immunofluorescence for acetylated histones

The training of innate immunity was checked in spleen and bone marrow cells using immunofluorescence of acetylated histones in order to identify the marking for acetylation of lysine 9 on histone 3 (H3K9ac) and for acetylation of lysine 27 on histone 3 (H3K27ac). The increased acetylation of these histones is related to the training of innate immunity.

For this purpose, female C57BL/ mice were distributed into three groups containing three animals ($n = 3$), as follows: β -glucan 1 dose (1 mg/100 μL i.p); β -glucan, 2 doses (1 mg/100 μL i.p) one dose every 7 days and mock (100 μL of PBS i.p). Seven days after the last stimulus in each group, the mice were euthanized to obtain spleen and bone marrow cells. After euthanasia and cell collection, the cells were added to 50 mL Falcon tubes, washed with 5 mL of 1X PBS and centrifuged at 500 x g for 5 minutes. The supernatant was then discarded and 5 mL of lysis solution was added for 5 minutes, with the samples placed on ice. The samples were centrifuged again at 500 x g for 5 minutes, then the supernatant was discarded and fixation was carried out, adding 2 mL of 4% paraformaldehyde solution for 20 minutes. After this time, the cells were centrifuged again and the supernatant was discarded, followed by the addition of 70% alcohol and kept at -20°C until immunofluorescence was performed.

Briefly, the cells were rehydrated and approximately 200 μ L of the cell suspension was added to the glass coverslip in culture plates and permeabilized with a 0.2% solution of TritonX -100 for 1 hour in a humid chamber. Then, the coverslips were washed in 1X PBS with 1% polyvinylpyrrolidone (PVP), followed by the addition of 1 mL of blocking solution (0.05% TritonX-100 and 2% BSA diluted in PBS with 1% PVP) in a humid chamber under agitation for 2 hours. This was followed by the addition of the primary antibody for H3K9ac (rabbit anti-H3K9ac, GeneTex, California - USA) and H3K27ac (rabbit anti-H3K27ac GeneTex, California - USA), both are polyclonal antibodies, produced in rabbits, and have cross reactivity to several species including mice, humans, and cattle, both at a concentration of 1:1000, in a volume of 1 mL per coverslip, left to incubate *overnight* under agitation in a humid chamber. After this period, the primary antibody was removed and the secondary antibody, at a concentration of 1:500 (Donkey anti-rabbit 488, Thermo Scientific, Massachusetts, USA), a polyclonal antibody, produced in a donkey showing reactivity to rabbit (anti-rabbit), was added for a period of 2 hours in a humid chamber under agitation. Then, the coverslips were washed in PBST (1 mL per plate) and mounted together with ordinary glass slides. The images were taken on a Leica DMI6000 fluorescence microscope located at the UFABC Multiuser Experimental Center. Least 20 images were taken at different magnifications: 5 images under a 10X objective, 5 images under a 20X objective and 10 images under a 40X objective from each sample.

The images generated with 40X objective were used for analysis. Fluorescence intensity was assessed using ImageJ 1.54g. A total of 100 cells were assessed per animal, with the fluorescence intensity value obtained from each area clearly identified as a nucleus (excluding overlapping areas or that did not appear completely in the image), followed by subtraction of the fluorescence intensity of the background of the same image (Ispada et al., 2020; Ispada and Milazzotto, 2021).

5.3.18. Statistical analysis

Statistical analysis of the CFU count data was normalized by logarithmic transformation and submitted to analysis of variance (ANOVA). The means were then compared using the Tukey test. The non-parametric Kruskal-Wallis test was used to assess the histopathologic score. The immunofluorescence results were assessed for outliers using the Grubbs test ($\alpha = 0.05$) and then the D'Agostino and Pearson

normality tests. The means of the groups were evaluated using the non-parametric Kruskal-Wallis test. All these analyses were carried out using GraphPad Prism software version 8.0.1 (GraphPad Prism software 8.0.1, Inc, USA). Values were considered statistically different when $p < 0.05$.

5.4. Results

5.4.1. *In vivo* stimulation of trained immunity with zymosan and β -glucan conferred greater *in vitro* control of *B. ovis* and *L. monocytogenes* in murine bone marrow-derived macrophages

Mice stimulated with zymosan or β -glucan, known to act as “trainers” of the innate immune cells, had an enhanced ability to control intracellular growth of *L. monocytogenes* (Figure 1A) and *B. ovis* (Figure 1B) in cultured macrophages. Macrophages from these mice had lower bacterial recovery of *L. monocytogenes* at 4 and 8 hours hpi than macrophages from unstimulated mice (mock-inoculated with PBS). Reductions of 0.84 log (zymosan) and 1.15 log (β -glucan) were observed at 8 hpi.

In the case of *B. ovis* infection, only the macrophages of mice that had been trained with β -glucan showed a significant 2 log reduction in bacterial count compared to the mock group at 48 hpi. Although both training agents enhanced the innate immune response, animals that had been trained with β -glucan were evidently more effective at controlling the infection, especially when challenged with *B. ovis*.

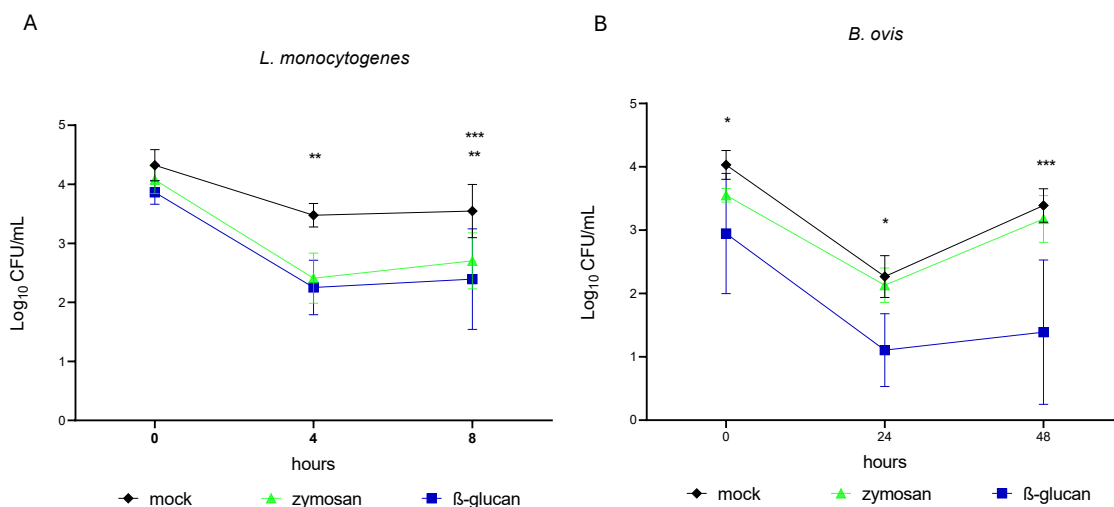


Figure 1: Kinetics of infection and intracellular growth of *L. monocytogenes* and *B. ovis* in bone marrow-derived macrophages (1×10^5 cells per well) from C57BL/6 mice that had been trained seven days previously with zymosan or β -glucan, or that were left untrained

(mock). Macrophages were challenged with either (A) *L. monocytogenes* MOI 1:10 and assessed at 0, 4 and 8 hours post-infection, or (B) *B. ovis* MOI 1:100 and assessed at 0, 24 and 48 hours post-infection. The results were log-transformed and ANOVA analysis was performed, with the mean values compared using the Tukey test. Statistical differences refer to comparisons between groups at the same time point (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

These results demonstrated the ability of zymosan and β -glucan to improve the ability of macrophages derived from myeloid cells to eliminate infectious agents, even without prior contact with the agent, suggesting the induction of trained immunity in these stimulated macrophages.

5.4.2. Mice stimulated with β -glucan show induction of trained immunity evidenced by high acetylation in histone 3 in splenic cells and myeloid cells

To identify whether the cells of the innate immune system present in the spleen and bone marrow of mice had been trained with the use of β -glucan, the histone 3 acetylation profile was evaluated using immunofluorescence. Epigenetic alterations are important characteristics in recognizing the transition from the naïve to the trained state. The acetylation of lysines in histone 3 is a phenomenon observed in cells of the innate immune system that were trained with different training substances, such as β -glucan (Moorlag et al., 2020).

Higher fluorescence intensity was identified in splenocytes from mice trained with β -glucan, and this was visible for both H3K9ac (Figure 2A - D) and H3K27ac (Figure 2E and H). Fluorescence intensity was 6.67 and 2.49 times higher in spleen cells for H3K9ac (Figure 2B) and H3K27ac (Figure 2F) from mice trained with β -glucan compared to untrained mice, respectively. A similar profile was observed in bone marrow cells from the trained mice, where both histones, H3K9ac (Figure 3 A-D) and H3K27ac (Figure 3 E-H) exhibited higher levels of fluorescence intensity, with a 7.00-fold increase for H3K9ac (Figure 3B) and a 1.66-fold increase for H3K27ac (Figure 3F). Based on these findings, we were able to confirm that training of the cells of the innate immune system was indeed taking place in mice stimulated with a dose of β -glucan.

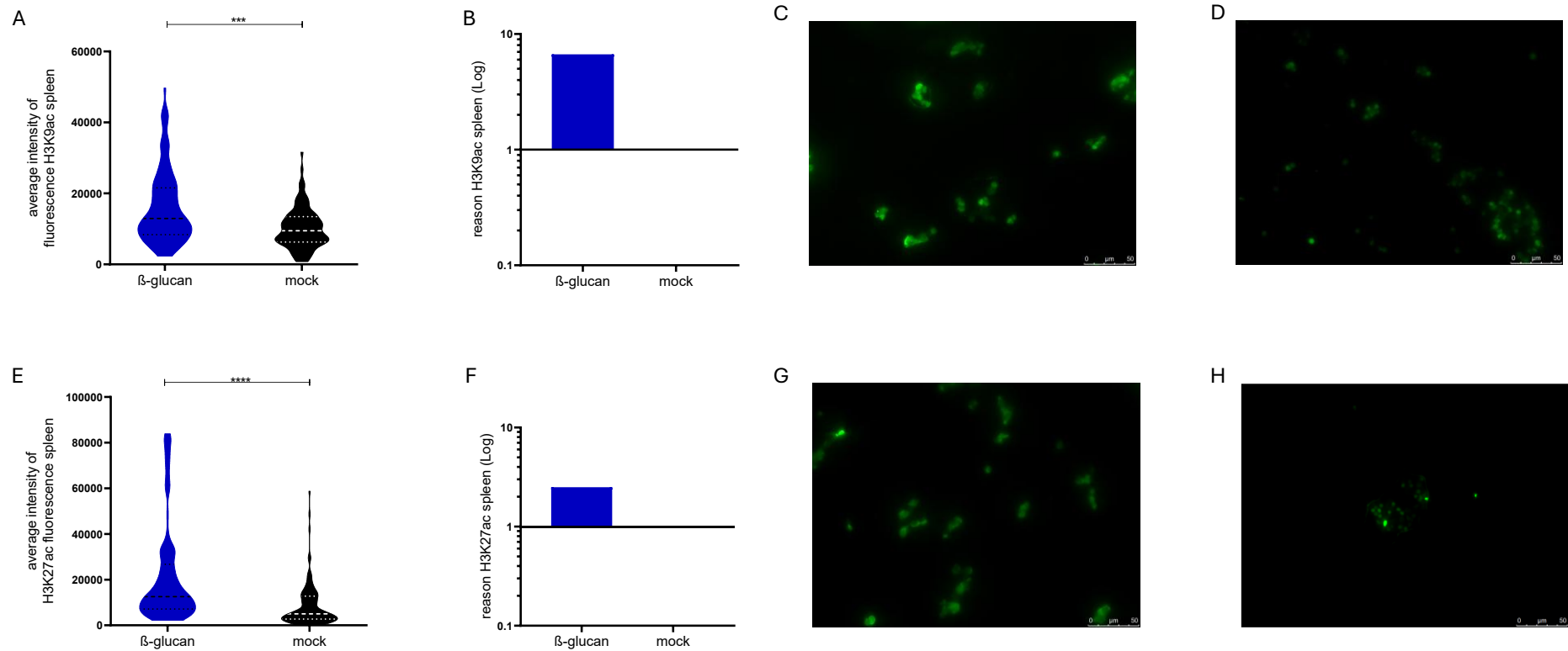


Figure 2: Splenic cells from C57BL/6 mice were subjected to immunofluorescence analysis to identify acetylation at lysine of histone 3, (A–D) H3K9ac or (F–H) H3K27ac. (A and E) The data represent a total of 100 cells from three animals per group. The results were evaluated to detect outliers using the Grubbs test ($\alpha = 0.05$), followed by the D'Agostino and Pearson normality tests. The medians of the groups were assessed using the Kruskal–Wallis test. Statistical differences are represented by asterisks (***) $p < 0.001$. (B and F) ratio of the average fluorescence intensity obtained from the cells. This data is presented by dividing the fluorescence intensity values of the trained group by those of the untrained (mock) group. Immunofluorescence images show labeling with anti-H3K9ac or anti-H3K27ac antibodies (green) in the trained group (C and G) and the mock group (D and H).

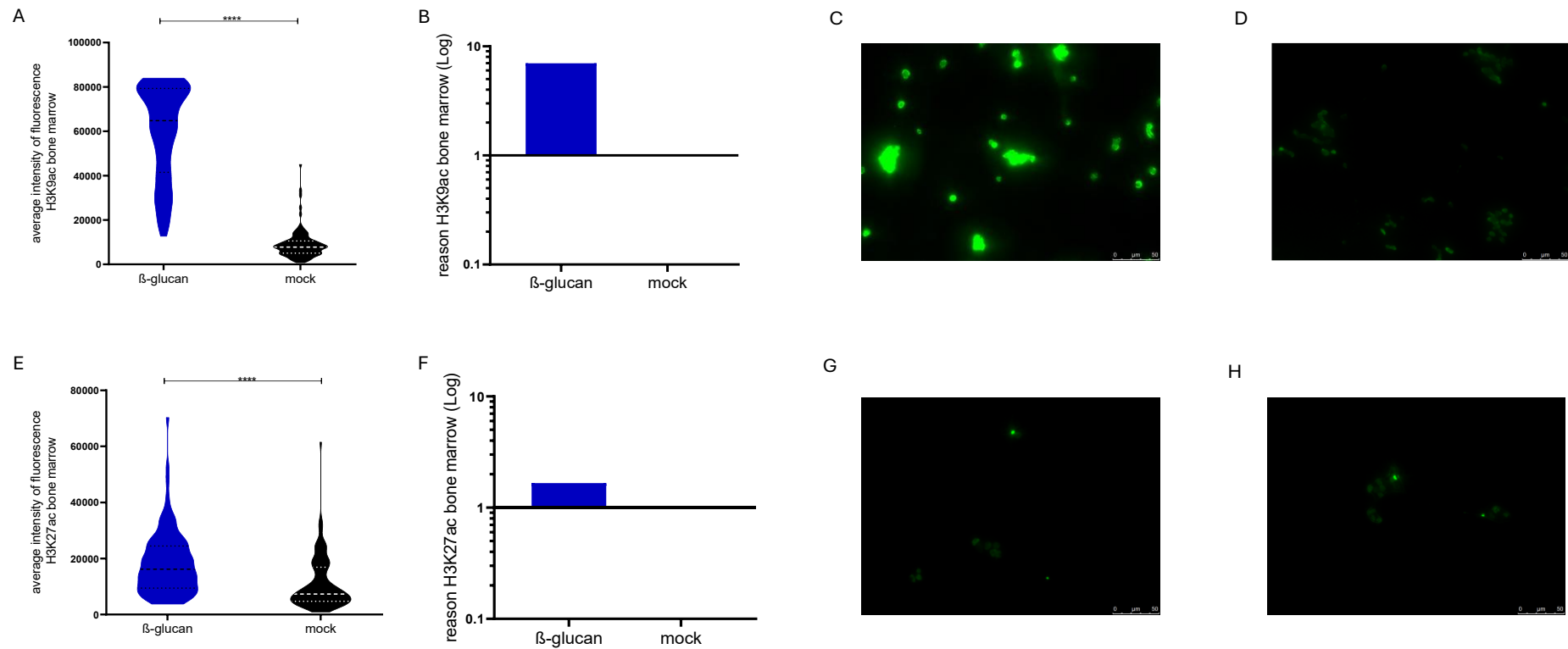


Figure 3: Bone marrow cells from C57BL/6 mice were subjected to immunofluorescence analysis to identify acetylation at lysine of histone 3, (A–D) H3K9ac or (F–H) H3K27ac. (A and E) The data represent a total of 100 cells from three animals per group. The results were evaluated to detect outliers using the Grubbs test ($\alpha = 0.05$), followed by the D'Agostino and Pearson normality tests. The medians of the groups were assessed using the Kruskal–Wallis test. Statistical differences are represented by asterisks (*** $p < 0.001$). (B and F) ratio of the average fluorescence intensity obtained from the cells. This data is presented by dividing the fluorescence intensity values of the trained group by those of the untrained (mock) group. Immunofluorescence images show labeling with anti-H3K9ac or anti-H3K27ac antibodies (green) in the trained group (C and G) and the mock group (D and H).

5.4.3. Trained innate immunity contributed to a partial control of *L. monocytogenes* infection in mice vaccinated with the inactivated, gamma-irradiated *L. monocytogenes* vaccine (KLM- γ -AC)

Considering the results of the *in vitro* experiments with *L. monocytogenes*, we investigated whether the stimulus provided by these substances could facilitate infection control in the *in vivo* model and enhance the vaccine response. We carried out experiments using a vaccine model established by our research group in BALB/c mice. Previously, our group demonstrated that *L. monocytogenes* inactivated by gamma-irradiated when encapsulated by alginate and chitosan (KLM- γ -AC), induced significant protection in mice following challenge with *L. monocytogenes* (Rocha et al., 2021).

The innate immunity training of did not influence the ability to control infection by *L. monocytogenes* in BALB/c mice, since previously trained mice exhibited similar levels of bacterial recovery post-challenge to those in the infected mock group (non-stimulated and non-vaccinated) (Figures 4A and B). Although training did not statistically improve vaccine efficacy in the trained and vaccinated groups compared to the vaccinated-only group, half of mice in the trained groups exhibited bacterial recovery levels below the detection limit in spleen and liver (Figures 4A and B).

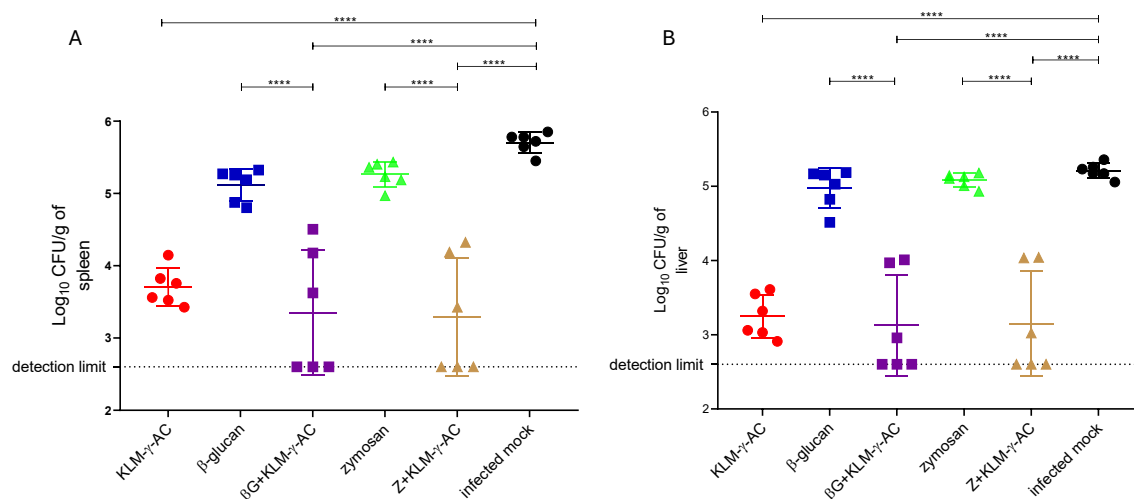


Figure 4: Bacterial recovery in the spleen (A) and liver (B) of female Balb/c mice (n=6), subjected to intraperitoneal innate immunity training with 1mg/animal of zymosan or β -glucan, immunized subcutaneously with KLM- γ -AC, trained with zymosan and subsequently vaccinated with KLM- γ -AC (Z+KLM- γ -AC), trained with β -glucan and vaccinated with KLM- γ -AC (β G+KLM- γ -AC), or an unimmunized and untrained group (infected mock). All animals were subjected to intraperitoneal challenge with *L. monocytogenes* at a dose of 1×10^5 CFU/animal. Data are expressed as individual animals (points) and mean with standard deviation. The results were log-transformed before being

submitted to ANOVA, with the mean values compared using the Tukey test. Statistical differences are represented by asterisks (**** $p < 0.0001$).

Interestingly, even though there was no statistical difference in bacterial recovery between the trained and immunized and only immunized groups, the mice that received training before the vaccine showed a better rate of protection index, with a reduction of more than 3.5 log of CFU, while in vaccinated mice, the reduction was only 2 log (Table 1).

Table 1: Protection induced in the spleen of trained Balb/c mice, immunized s.c. with 1×10^7 of *L. monocytogenes*. gamma irradiated and experimentally challenged i.p. with 1×10^5 of *L. monocytogenes*.

Groups	Log ₁₀ CFU/g	Protection index
KLM- γ	3,70	1,99
Z+KLM- γ	1,98	3,72
β G+KLM- γ	2,05	3,65
β -glucan	5,11	0,59
zymosan	5,26	0,44
infected mock	5,70	

In view of this result, we wondered whether the strain of mouse could influence this effect, so we decided to evaluate the same experimental protocol in C57BL/6 mice. This strain of mouse is considered to be more resistant to *L. monocytogenes* infection (Czuprynski et al., 2003). Interestingly, when C57BL/6 mice were only trained, they exhibited a greater ability to control the infection, which was not observed in the Balb/c strain. (Figure 5). This demonstrates that training alone is capable of conferring protection in C57BL/6 mice. Furthermore, this control occurred even after an extended time interval of more than 30 days, in contrast to *in vitro* training where the interval between training and infection was one week. These results reaffirm that training with these substances improves the innate immune response's ability to control pathogens non-specifically.

Although training did not improve the efficacy of the vaccine in the trained and vaccinated groups compared to the vaccinated-only group, at least half of the mice in the trained groups exhibited bacterial recovery levels below the detection limit in the spleen

and liver (Figure 5A and 5B). These results confirm the dichotomous effect of training in conjunction with vaccination, providing effective protection for half of the animals in these groups. Furthermore, mice that received training, primarily with β -glucan, prior to vaccination exhibited a higher vaccine protection rate, with a reduction of over 4.5 log CFU. In contrast, mice that were solely vaccinated demonstrated a reduction of 3 log CFU (Table 2).

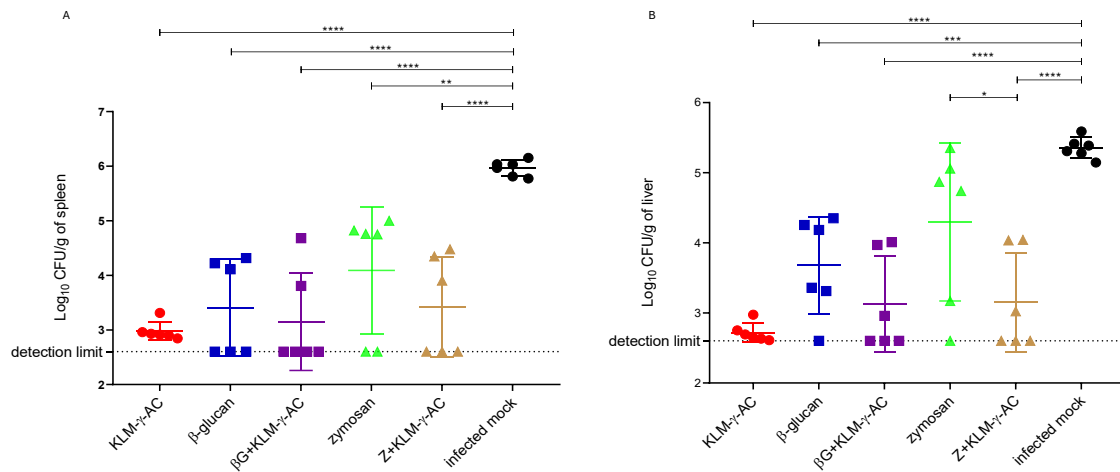


Figure 5: Bacterial recovery in the spleen (A) and liver (B) of female C57BL/6 mice (n=6), subjected to intraperitoneal innate immunity training with 1mg/animal of zymosan or β -glucan, immunized subcutaneously with KLM- γ -AC, trained with zymosan and subsequently vaccinated with KLM- γ -AC (Z+KLM- γ -AC), trained with β -glucan and vaccinated with KLM- γ -AC (β G+KLM- γ -AC), or an unimmunized and untrained group (infected mock). All animals were subjected to intraperitoneal challenge with *L. monocytogenes* at a dose of 1×10^5 CFU/animal. Data are expressed as individual animals (points) and mean with standard deviation. The results were log-transformed before being submitted to ANOVA, with the mean values compared using the Tukey test. Statistical differences are represented by asterisks (****p < 0.0001).

Evaluation of the histopathological lesions in the spleen (Figure 6G) and liver (Figure 6H) showed a greater reduction in the intensity of the lesions in the mice in the KLM- γ -AC and β G + KLM- γ -AC groups compared to the infected mock, but no difference was observed in the lesion score between these two groups. The other groups did not differ from the infected mock group.

Table 2: Protection induced in the spleen of trained C57BL/6 mice, immunized s.c. with 1×10^7 of irradiated *L. monocytogenes* gamma and experimentally challenged i.p. with 1×10^5 of *L. monocytogenes*.

Groups	Log₁₀CFU/g	Protection index
KLM- γ -AC	2,97	2,98
Z+KLM- γ -AC	2,12	3,84
β G + KLM- γ -AC	1,41	4,55
β -glucan	2,10	3,85
zymosan	3,22	2,74
infected mock	5,96	

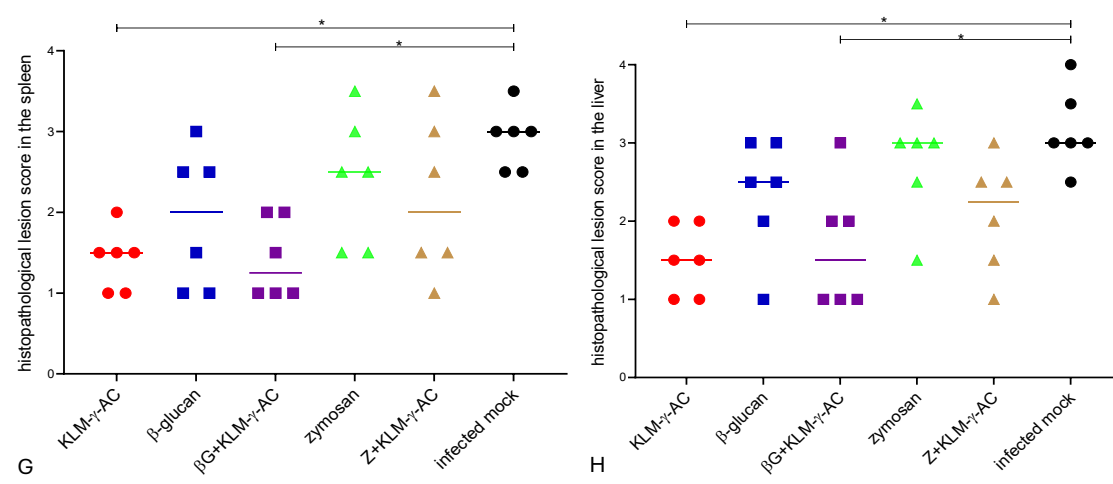
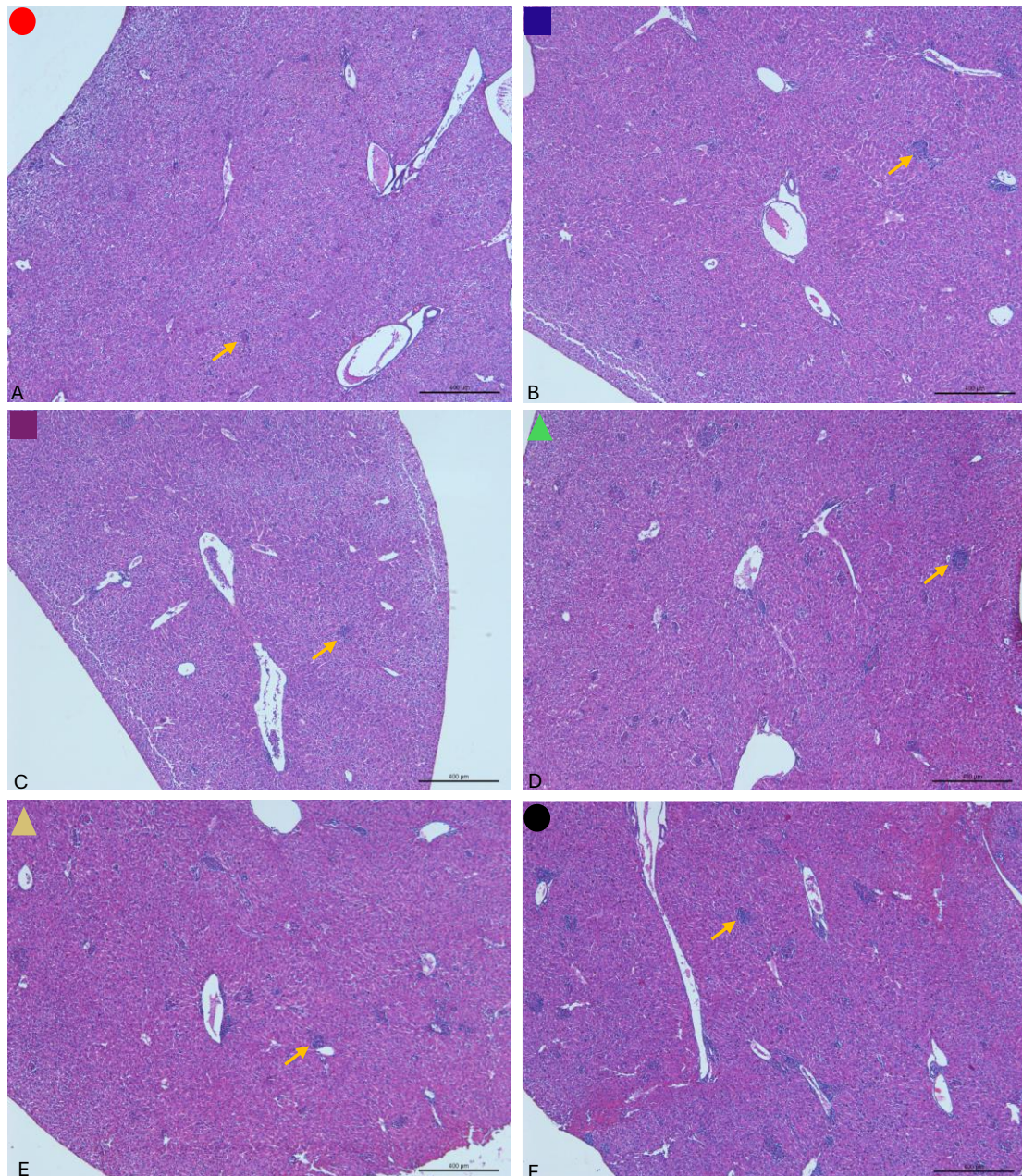


Figure 6: Images of the distribution of histopathological lesions and cell aggregates

(arrow) observed in the liver of female C57BL/6 mice (n = 6) subjected to i.p. innate immunity training with 1mg/animal of β -glucan or zymosan, immunized subcutaneously (s.c.) with KLM- γ -AC (A), trained with β -glucan (B), trained with β -glucan and vaccinated with KLM- γ -AC (β G+KLM- γ -AC) (C), trained with zymosan (D), trained with zymosan and immunized (Z+KLM- γ -AC) (E) or non-immunized and non-trained group (mock infection) (F). All groups were challenged i.p. with *L. monocytogenes* at a dose of 1×10^5 CFU/animal. The results of histopathological scores of spleen (G) and liver (H) were analyzed using the nonparametric Kruskal-Wallis test. Statistical differences are represented by asterisks (* $p < 0.05$). H.E obj. 5x.

5.4.4. Stimulation with two doses of β -glucan did not trained innate immune cells and negatively interfered with the vaccine response induced by inactivated, gamma-irradiated *L. monocytogenes* vaccine (KLM- γ -AC)

It was demonstrated that using trainers of innate immune substances, especially β -glucan, alongside the vaccine can contribute to a better protective response, particularly by showing a higher index of protection. However, bacterial recovery in the liver and spleen exhibited a dichotomous pattern, with half of the mice showing no bacterial recovery and the remainder exhibiting high CFU counts, comparable to those observed in animals infected solely with *L. monocytogenes*. This suggests that the training protocol only worked in some of the mice. Based on this finding, we hypothesized that the innate immunity training protocol could be improved by multiple doses. To test this, we assessed whether stimulating mice with two doses of β -glucan, seven days apart, would lead to an enhanced immune response and superior protection to that provided by the vaccine. Mice that were trained with two doses of β -glucan and then challenged with *L. monocytogenes* had lower bacterial recovery in the liver than the infected mock group. However, bacterial recovery in the spleen was similar in the two groups (Figure 7).

On the contrary, stimulation with two doses of β -glucan impaired the protective performance associated with the vaccine, as bacterial recovery was similar between the animals vaccinated and trained with two doses of β -glucan, and the group of animals that were only infected (Figure 7). Histopathological lesions were observed in the spleen (Figure 8A) and liver (Figure 8B) of these animals. It was found that animals that had undergone two training doses had lesions of a similar intensity to those in the challenged-only group.

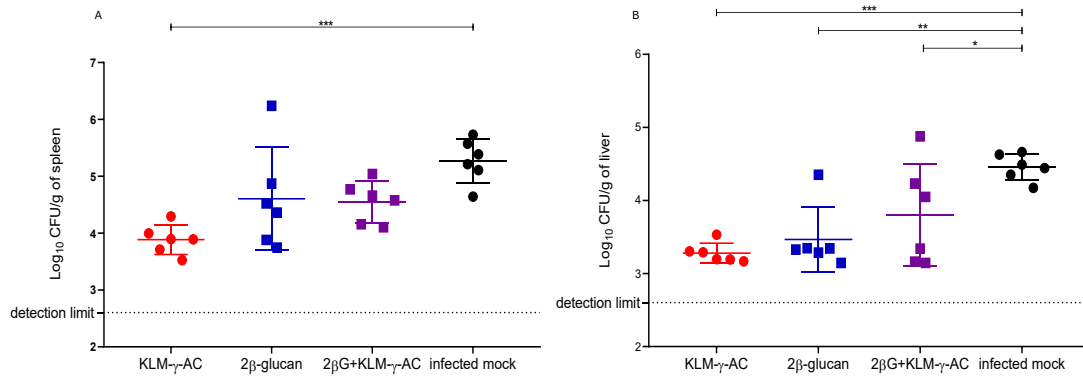


Figure 7: Bacterial recovery from spleen (A) and liver (B) of female C57BL/6 mice (n = 6), immunized *L. monocytogenes* inactivated by gamma irradiation and encapsulated by alginate with chitosan (KLM- γ -AC), trained with two doses of β -glucan (2 β -glucan), trained with two doses of β -glucan and immunized *L. monocytogenes* inactivated by gamma irradiation and encapsulated by alginate with chitosan (2 β -G+KLM- γ -AC), untrained and unvaccinated (mock infected). All mice were challenged with *L. monocytogenes* at a dose of 1×10^5 CFU/animal. Data are expressed as individual animals (points) and mean with standard deviation. The results were log-transformed before being submitted to ANOVA, with the mean values compared using the Tukey test. Statistical differences are represented by asterisks (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

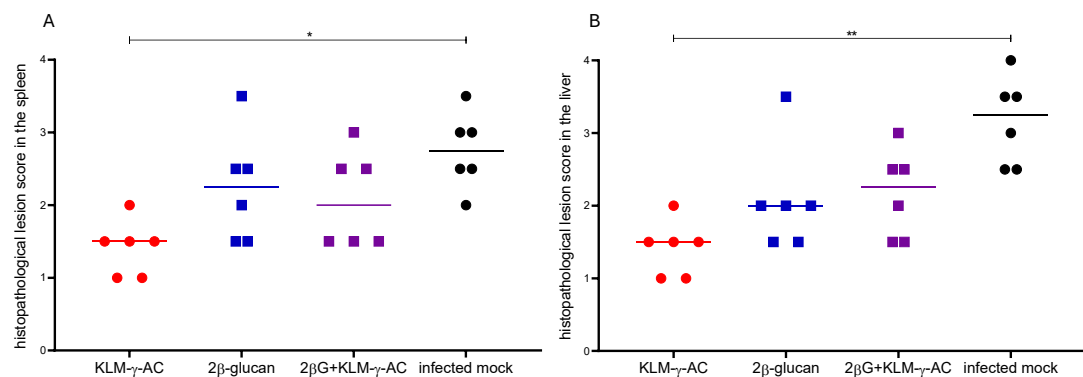


Figure 8: Histopathological evaluation of the spleen (A) and liver (B) of female C57BL/6 mice (n=6) immunized *L. monocytogenes* inactivated by gamma irradiation and encapsulated by alginate with chitosan (KLM- γ -AC), trained with two doses of β -glucan (2 β -glucan), trained with two doses of β -glucan and immunized *L. monocytogenes* inactivated by gamma irradiation and encapsulated by alginate with chitosan (2 β -G+KLM- γ -AC), untrained and unvaccinated (mock infected). All mice were challenged with *L. monocytogenes* at a dose of 1×10^5 CFU/animal. The score results were analyzed using the non-parametric Kruskal-Wallis test. Statistical differences are represented by asterisks (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

It was then decided to examine the impact of two β -glucan training doses on histone acetylation profiles related to trained immunity using immunofluorescence. It was

observed that two doses of β -glucan training induced lower histone H3K9ac and H3K27ac acetylation in spleen cells than in non-trained animals (Figure 9). When analysing H3K9ac, the fluorescence intensity in the two-dose training group was 0.86 times lower than in the untreated group (Figure 9B). For H3K27ac, we observed a 0.64-fold decrease in fluorescence intensity compared to the untreated group (Figure 9F).

When we evaluated the bone marrow cells, the fluorescence intensity after training with two doses of β -glucan was slightly higher than the untrained group, both for H3K9ac and for H3K27ac (Figure 10), leading to a 2.00 and 1.31 times increase respectively, when compared to the untrained mice.

Based on these findings, we can infer that training innate immunity with two doses of β -glucan is less effective than training with just one dose. Two doses of β -glucan are insufficient to adequately train innate immunity, which explains the loss of control over *L. monocytogenes* infection and the failure to promote the vaccine response (Figure 7).

These results help us to understand the difficulty of mounting a protective immune response against these infectious agents and suggest that there are better conditions for inducing efficient trained immunity that may control intracellular pathogens and also promote the protective response of vaccines.

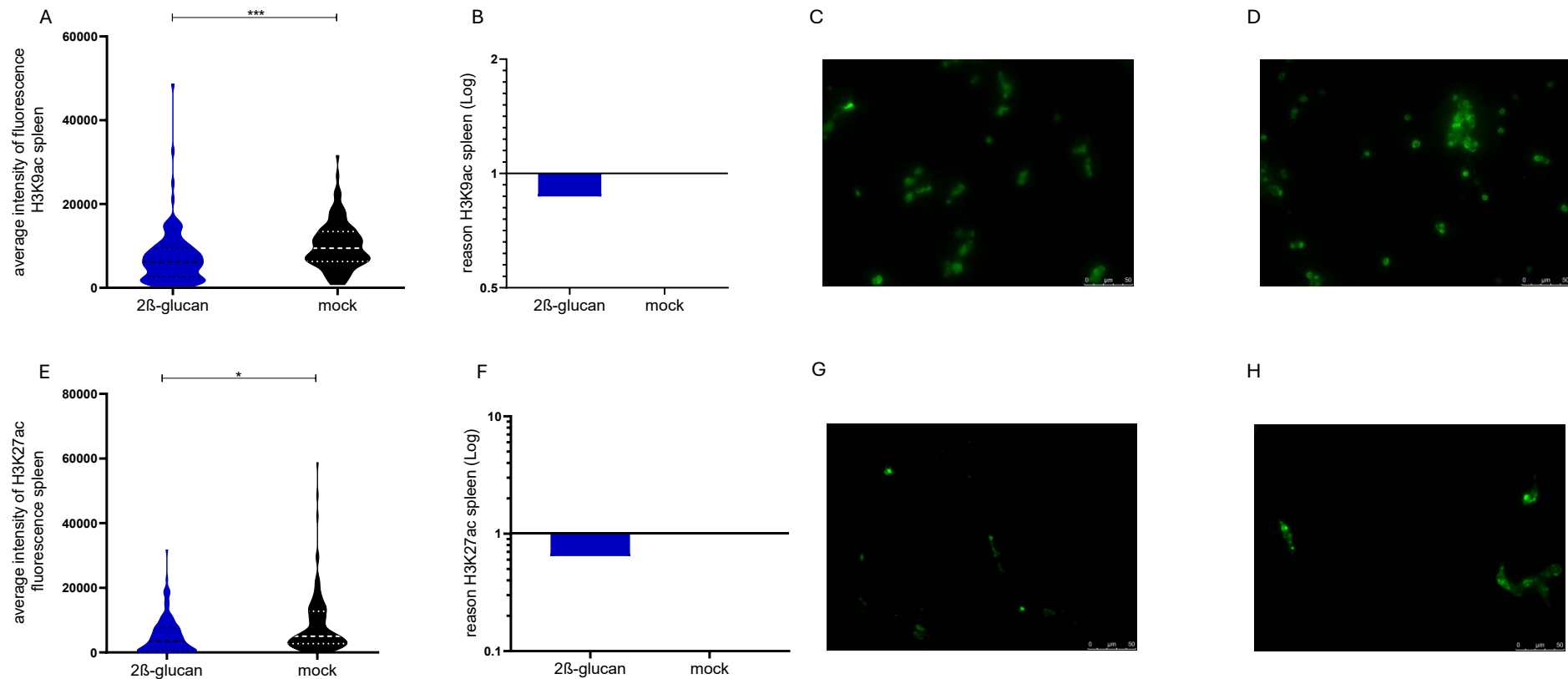


Figure 9: Splenic cells from C57BL/6 mice, trained with two doses of β -glucan, submitted to immunofluorescence analysis to identify acetylation at lysine of histone 3, (A–D) H3K9ac or (F–H) H3K27ac. (A and E). The data represent a total of 100 cells from three animals per group. These results were evaluated for outliers using the Grubbs test ($\alpha = 0.05$) and then the D'Agostino and Pearson normality tests. The medians of the groups were evaluated using the Kruskal-Wallis test. (B and F) ratio between the average fluorescence intensity obtained from cells. This data is represented by dividing the fluorescence intensity values of the trained group by those of the untrained group (mock). Statistical differences are represented by asterisks (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$). (C–D and G–H). The immunofluorescence images show staining with anti-H3K9ac or anti-H3K27ac antibody (green) in the trained group (C and G) and the mock group (D and H).

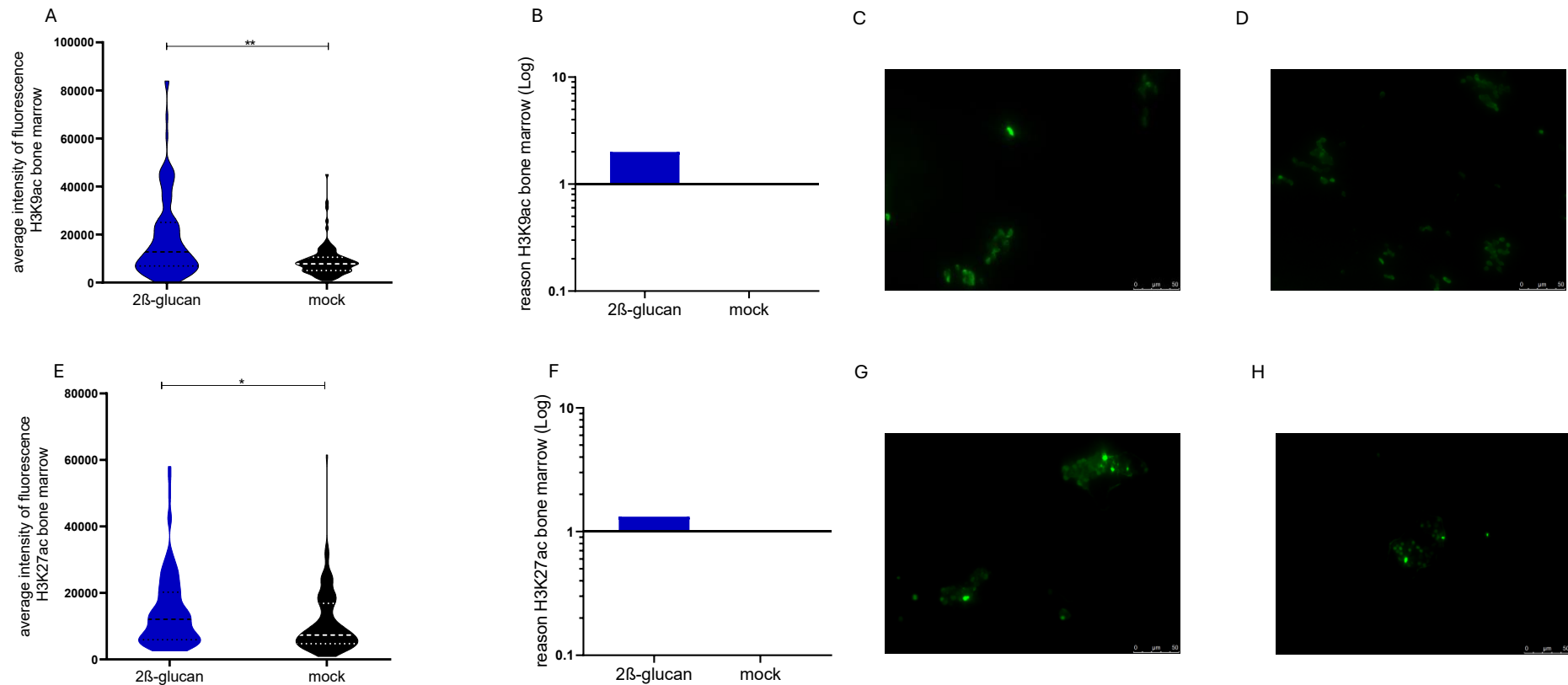


Figure 10: Bone marrow cells from C57BL/6 mice, trained with two doses of β -glucan, submitted to immunofluorescence analysis to identify acetylation at lysine of histone 3, (A–D) H3K9ac or (F–H) H3K27ac. (A and E). The data represent a total of 100 cells from three animals per group. These results were evaluated for *outliers* using the Grubbs test ($\alpha = 0.05$) and then the D'Agostino and Pearson normality tests. The medians of the groups were evaluated using the Kruskal-Wallis test. (B and F) ratio between the average fluorescence intensity obtained from cells. This data is represented by dividing the fluorescence intensity values of the trained group by those of the untrained group (mock). Statistical differences are represented by asterisks *** $p < 0.001$. (C–D and G–H). The immunofluorescence images show labeling with anti-H3K9ac or anti-H3K27ac antibody (green) in the trained group (C and G) and the mock group (D and H).

5.4.5. Stimulation of trained immunity with one dose of β -glucan confer similar *in vitro* control of *L. monocytogenes* in bone marrow-derived macrophages from mice vaccinated with KLM- γ -AC

Initially, we demonstrated that β -glucan-trained immunity improves the ability of bone marrow-derived macrophages to control *L. monocytogenes* infection *in vitro* (Figure 1A). We therefore decided to assess whether the microbicidal ability of these cells was improved by vaccination or vaccine-associated training.

C57BL/6 mice were assigned to the KLM- γ -AC, β G+ KLM- γ -AC, β -glucan, or mock groups. At the end of the immunization period (two weeks after the second dose), the mice were euthanized. At necropsy, bone marrow was collected for macrophage differentiation. The ability to control *L. monocytogenes* infection *in vitro* was assessed in these macrophages (Figure 11A), and the level of the cytokine IL-6 in the culture supernatant was measured (Figure 11B). This cytokine is considered to be a marker of trained immunity in mice stimulated with β -glucan (Taghavi et al., 2018; Silva et al., 2021).

We observed that infection with *L. monocytogenes* in macrophages from mice that had undergone training or vaccination, or both, were able to significantly reduce the intracellular survival of the bacteria at 4 and 8 hpi compared to naïve (mock) macrophages. However, training did not result in a greater reduction in bacterial load in trained-vaccinated mice compared to those that were only vaccinated (Figure 11A). These results suggest that combining training with vaccination does not improve the microbicidal capacity of bone marrow-derived macrophages *in vitro*.

We demonstrated that these macrophages had been trained by measuring the level of IL-6 in the *in vitro* culture supernatant. Compared to the control group, macrophages from mice trained with β -glucan produced 200 times more IL-6, those from vaccinated mice produced 100 times more, and those from trained and vaccinated mice produced 500 times more (Figure 11B). These results confirm the induction of trained immunity by both β -glucan and vaccination. Furthermore, induction of trained immunity in these cultured macrophages was greater when training and vaccination were combined. However, when evaluating IL-6 production by *L. monocytogenes* 8 hpi, the three groups exhibited comparable cytokine levels, exhibiting a 2.5-fold increase compared to the IL-6 present in the supernatant of uninfected macrophages (Figure 16B). In other words, although the cultured macrophages were trained, as demonstrated by their high IL-6 production, the

level of this cytokine increased similarly in all three groups after infection, reaching approximately 700 pg/mL. Interestingly, these three groups exhibited similar control of infection (Figure 11A).

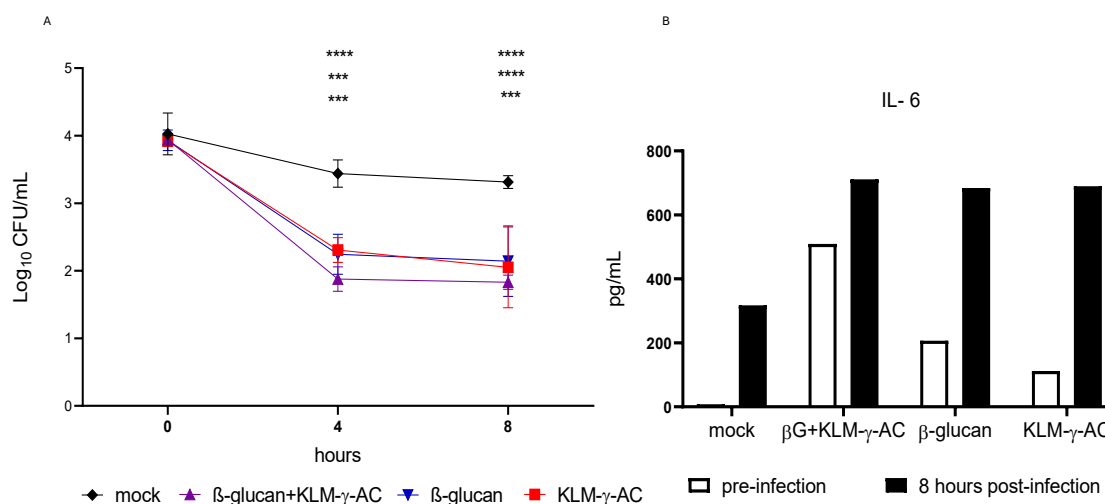


Figure 11: (A) *In vitro* control of *L. monocytogenes* infection by bone marrow-derived macrophages from C57BL/6 mice that were trained with β -glucan, vaccinated with KLM- γ -AC, stimulated and vaccinated (β G- KLM- γ -AC), or not stimulated and not vaccinated (mock). Macrophages (5×10^5 cells per well) were inoculated with *L. monocytogenes* MOI of 10, and bacterial recovery was determined at 0, 4, and 8 hours post-infection. (B) Measuring of IL-6 cytokine levels by ELISA. The data are representative of a pool of samples from six animals per group and the values are expressed in pg/ μ L. The results were log-transformed before ANOVA was performed, and the mean values were compared using the Tukey test. Statistical differences are represented by asterisks (** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$).

5.4.6. Training innate immunity with β -glucan did not alter the profile of the immune response induced by the KLM- γ -AC vaccine

Recent studies have demonstrated the protective effect and immune response profile of the KLM- γ -AC vaccine candidate, as evidenced by splenocyte proliferation after *in vitro* stimulation (Rocha et al., 2021). We therefore evaluated the immune response profile of splenocytes from mice that were first given a dose of β -glucan and then immunized with KLM- γ -AC. C57BL/6 mice were assigned to KLM- γ -AC, β G+ KLM- γ -AC, β -glucan, or mock groups. At the end of the immunization period (two weeks after the second dose), the mice were euthanized. At necropsy, cells were collected from the spleen (splenocytes) for the cell proliferation assay.

Stimulation with KLM- γ revealed that only splenocytes from the vaccinated groups (KLM- γ -AC or β G+KLM- γ -AC) exhibited greater proliferation compared to their non-stimulated counterparts. Additionally, splenocytes proliferation was significantly higher in the vaccinated groups than in the mock group, confirming that vaccination induces splenocytes proliferation. However, there was no difference in proliferation rates between the KLM- γ -AC and β G+KLM- γ -AC groups, suggesting that β -glucan training did not improve vaccine response (Figure 12).

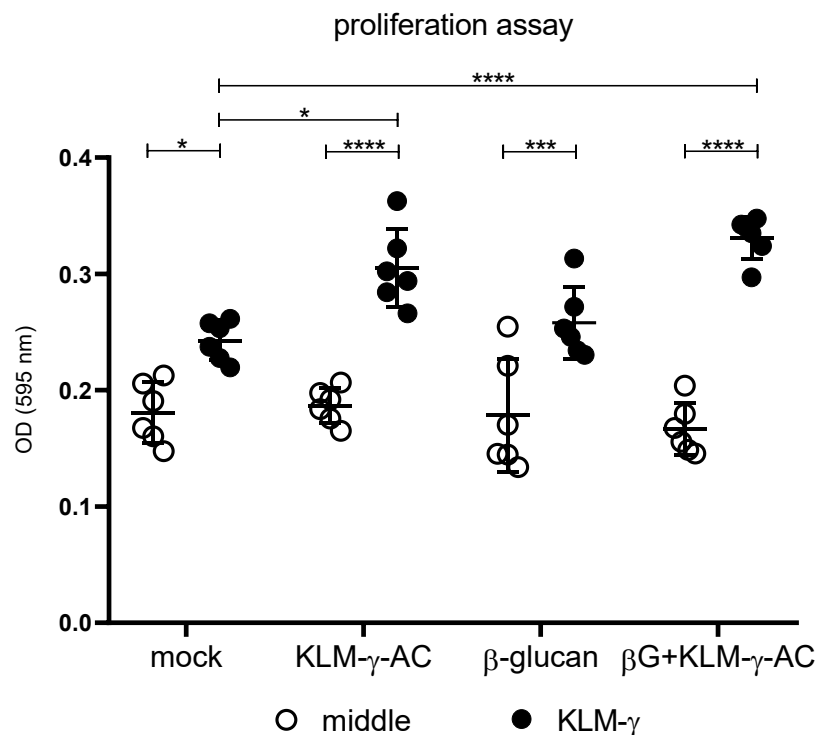


Figure 12: Splenocyte proliferation from C57BL/6 mice trained with β -glucan and vaccinated with KLM- γ -AC. Two weeks after the last vaccination splenocytes were collected from mice in the KLM- γ -AC, β G+KLM- γ -AC, β -glucan and mock (PBS) groups and cultured 5×10^5 cells/well. Splenocytes were stimulated with RPMI (non-stimulated) or KLM- γ (1×10^9 CFU/mL) for 72 hours in duplicates. Splenocyte proliferation was assessed using the MTT assay. Data are represented as means and standard deviations. Data were subjected to one-way ANOVA, and means were compared using Tukey's test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$).

5.4.7. Training innate immunity did not improve control of *B. ovis* infection in mice vaccinated with the attenuated *B. ovis* $\Delta abcBA$ -AC

It was demonstrated that bone marrow-derived macrophages from mice that had been trained with zymosan and β -glucan were capable of controlling *B. ovis* infection (Figure 1B). Considering that trained immunity could partially enhance the protective effects of the inactivated *L. monocytogenes* vaccine (Figures 4 and 5), its impact was investigated on an attenuated vaccine model (*B. ovis* $\Delta abcBA$ -AC) (Silva et al., 2015; Carvalho et al., 2020; Braz et al., 2022; Oliveira et al., 2024).

In this experiment, a significant reduction in bacterial recovery was observed in the spleen (Figure 13A) and liver (Figure 13B) of the group vaccinated without training compared to the infected mock group. This indicates the efficacy of the vaccine, which has been demonstrated in previous studies (Silva et al., 2015; Carvalho et al., 2020; Braz et al., 2022; Oliveira et al., 2024).

In groups that underwent training with β -glucan or zymosan, no difference was observed in bacterial loads in the spleen or liver compared to the infected mock group. This suggests that *in vivo* training with these substances does not favor control of *B. ovis* infection. In groups that were vaccinated after training, a reduction in bacterial load was observed in the spleen and liver only in the group stimulated with β -glucan, with bacterial recovery like that observed in the only vaccinated group. Furthermore, the reduction in bacterial load was not observed in the group that was vaccinated and trained with zymosan. These results suggest that stimulation with β -glucan does not affect the efficacy of the vaccine, whereas stimulation with zymosan impairs the performance of the attenuated *B. ovis* vaccine. When checking the protection index obtained in this experiment, it was clear that only the groups that received the vaccine, whether trained or not, had a protection index greater than 0.5 log (Table 3).

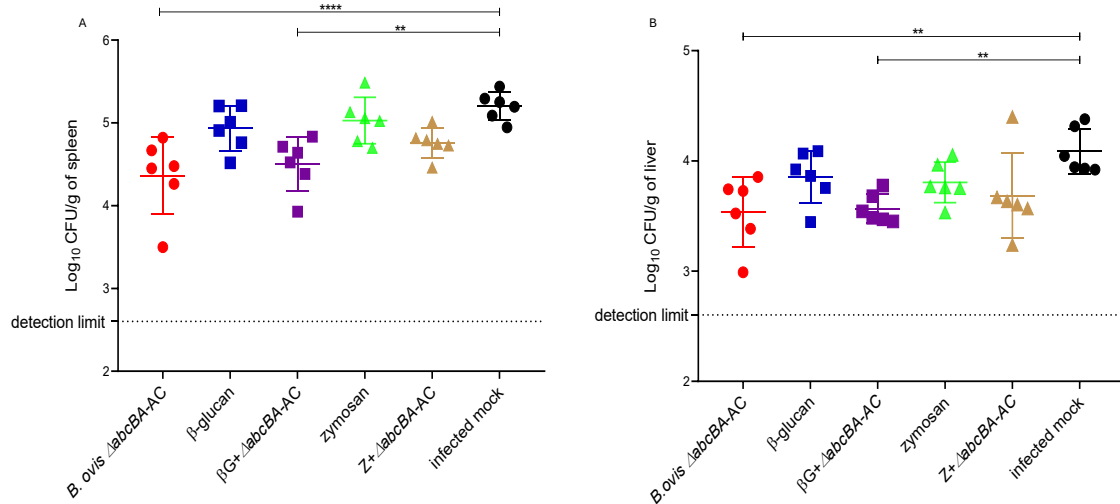


Figure 13: Bacterial recovery in the spleen (A) and liver (B) of female C57BL/6 mice (n=6), subjected to intraperitoneal innate immunity training with 1mg/animal of zymosan or β -glucan, immunized subcutaneously with $\Delta abcBA-AC$, trained with zymosan and subsequently vaccinated with $\Delta abcBA-AC$ (Z+ $\Delta abcBA-AC$), trained with β -glucan and vaccinated with $\Delta abcBA-AC$ ($\beta G+\Delta abcBA-AC$), or non-immunized and non-trained mock group (infected mock). All animals were subjected to intraperitoneal challenge with *B. ovis* at a dose of 1×10^6 CFU/animal. Data are expressed as individual animals (points) and mean with standard deviation. The results were log-transformed before being submitted to ANOVA, with the mean values compared using the Tukey test. Statistical differences are represented by asterisks (**p < 0.01; ****p < 0.001).

Table 3: Protection induced in the spleen of C57BL/6 mice trained with β -glucan or zymosan, immunized with *B. ovis* $\Delta abcBA-AC$ and experimentally challenged with the wild strain of *B. ovis*.

Groups	Log ₁₀ CFU/g	Protection index
<i>B. ovis</i> $\Delta abcBA-AC$	4,36	0,83
β -glucan	4,93	0,26
$\beta G+\Delta abcBA-AC$	4,50	0,69
zymosan	5,02	0,17
Z+ $\Delta abcBA-AC$	4,75	0,44
mock infected (<i>B. ovis</i>)	4,08	

5.4.8 Training with β -glucan induced protection against *B. ovis* infection when associated with immunization with *B. ovis* inactivated by gamma irradiation (BO- γ -AC)

Since induction of trained immunity impairs the protective effects of vaccination with the attenuated *B. ovis* $\Delta abcBA$ strain, we hypothesized that a trained innate immune system could more efficiently eliminate the vaccine strain more quickly, thereby preventing a vaccine-induced response. We therefore investigated whether vaccination with inactivated *B. ovis*, which is not protective in the absence of trained innate immunity (Silva et al., 2024) could favor a *B. ovis* inactivated vaccine response.

Vaccination with inactivated *B. ovis* (BO- γ -AC) did not reduce bacterial loads in the spleen and liver, confirming that it does not protect against *B. ovis* infection in a murine model, as previously demonstrated by Silva et al. (2024). Interestingly, mice trained with β -glucan and vaccinated with BO- γ -AC had significantly lower bacterial loads in their spleens than infected mock animals and mice that were only vaccinated (Figure 14).

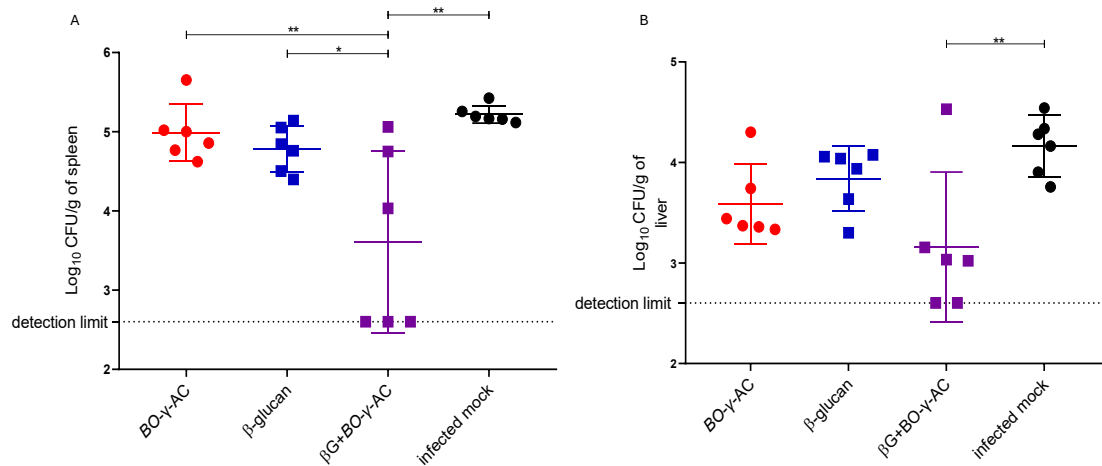


Figure 14: Bacterial counts in the spleen (A) and liver (B) of C57BL/6 mice ($n = 6$), submitted to innate immunity training via i.p with 1 mg/mice of β -glucan, immunized subcutaneously (s.c) with BO- γ -AC, trained with β -glucan and vaccinated with BO- γ -AC (β G+BO- γ -AC), or non-immunized and non-trained group (infected mock). All groups were challenged with 1×10^6 CFU/animal of *B. ovis*. Data are expressed as individual animals (points) and mean with standard deviation. The results were log-transformed before being submitted to ANOVA, with the mean values compared using the Tukey test. Statistical differences are represented by asterisks (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Importantly, the dichotomous profile of bacterial recovery in the spleen of mice that were trained with β -glucan and vaccinated was similar to the experiment with the inactivated KLM- γ -AC vaccine (Figure 5), which half of the mice showing bacterial recovery below the detection limit. This result also represented better protection in mice trained and vaccinated with BO- γ -AC, with an index of almost 3 log CFU (Table 4).

Table 4: Protection induced in the spleen of C57BL/6 mice trained with β -glucan, immunized with gamma-inactivated *B. ovis* and experimentally challenged with the wild strain of *B. ovis*.

Groups	Log₁₀CFU/g	Protection index
BO- γ -AC	4.99	0.22
β G+BO- γ -AC	2.30	2.91
β -glucan	4.78	0.43
<i>B. ovis</i>	5.21	

Grossly, mice from all the groups had splenomegaly and hepatomegaly, ranging from mild to moderate. Microscopically, spleen from mock infected mice had multifocal areas of intense neutrophilic inflammatory infiltrate associated with multifocal areas of necrosis (Figure 15A). Liver from the mock infected mice had multifocal areas of intense inflammatory infiltrate composed of lymphocytes, macrophages and neutrophils (microgranulomas), associated with random multifocal distribution necrosis (Figure 15A-D). Mice from β -glucan, BO- γ -AC groups had similar spleen and liver lesions to infected mock group. Only mice in the β G+BO- γ -AC group, there was a significant reduction in the intensity of the lesions present in the spleen (Figure 15 E) and liver (Figure 15 F) ($p < 0.05$).

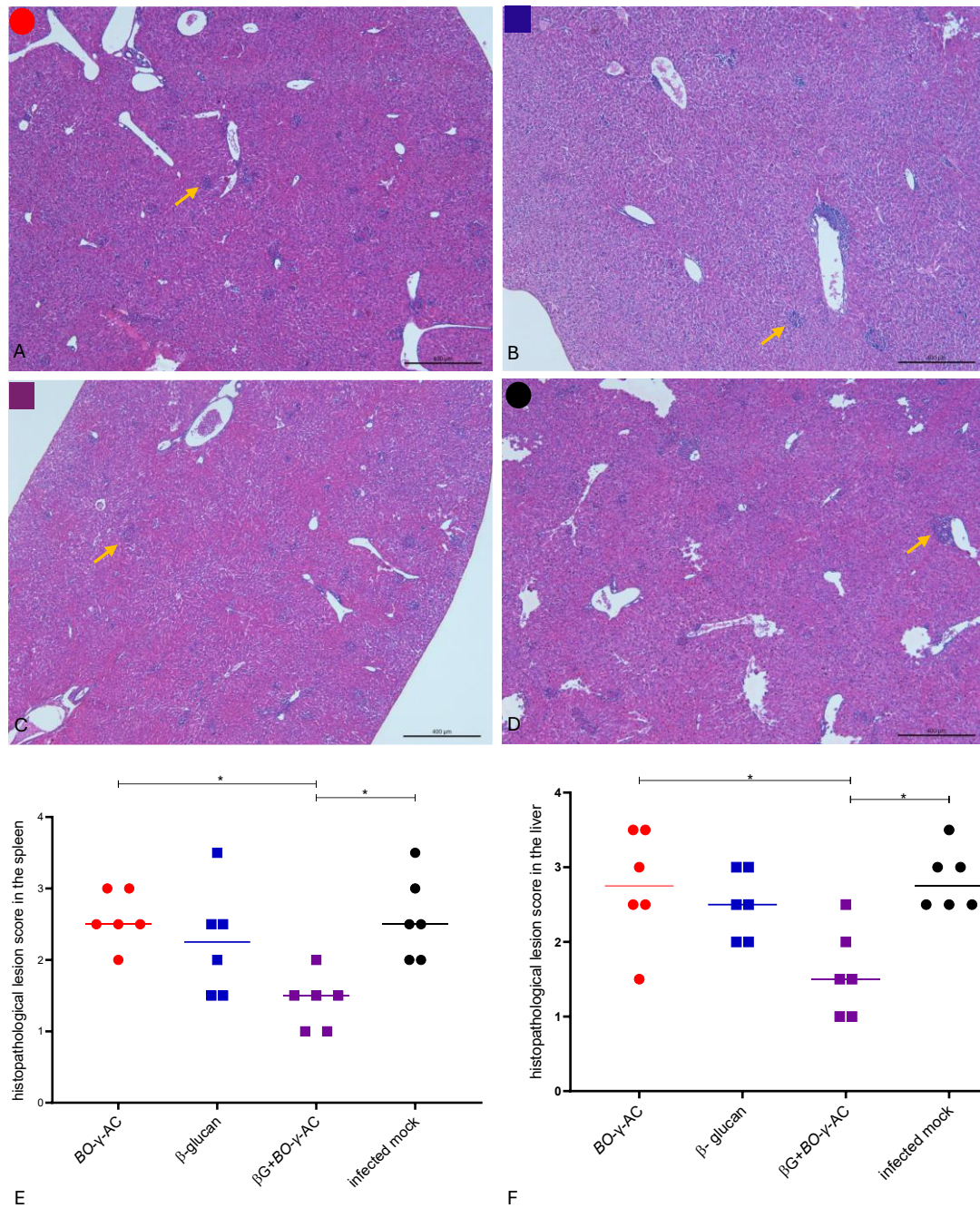


Figure 15: Images of the distribution of histopathological lesions and inflammatory cell aggregates (arrow) observed in the liver of female C57BL/6 mice (n=6) subjected to i.p. innate immunity training with 1 mg/animal of β -glucan and immunized subcutaneously (s.c.) with BO- γ -AC. Animals immunized with BO- γ -AC only (A), trained with β -glucan (B), trained with β -glucan and vaccinated with BO- γ -AC (β +BO- γ -AC) (C) and non-immunized and non-trained group (mock infection) (D). All groups were challenged i.p. with *B. ovis* at a dose of 1×10^6 CFU/animal. The results of the histopathological scores of spleen (E) and liver (F) were analyzed using the nonparametric Kruskal-Wallis test. Statistical differences are represented by asterisks (* $p < 0.05$). H.E obj. 5x.

5.5. Discussion

This work has shown for the first time that the use of innate immunity trainers, especially β -glucan, when associated with inactivated vaccines, but not an attenuated experimental vaccine, has a positive effect on post-infection protection against *L. monocytogenes* or *B. ovis* in a murine model. It was clear that some factors may contribute to the induction of trained immunity and its role in vaccine efficacy in the control of intracellular pathogens in a murine model. The immune response of the host, i.e. the strain of mice used; the training protocol, i.e. the type of substance and the number of doses used to induce training; the vaccine model to be associated, i.e. whether it is a live attenuated or inactivated vaccine, all these factors interfere with the effect of trained immunity on the vaccine response.

Several studies have demonstrated the induction of trained innate immunity in different host species (Moerings et al., 2021; Verwoolde et al., 2021), and its role in controlling the infection of different pathogens, such as *L. monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *M. tuberculosis*, and *Leishmania braziliensis* (Ciarlo et al. 2019; Santos et al., 2019; Katzmarski et al., 2021; Vierboom et al., 2021). This protective effect has been verified both *in vitro* and *in vivo* and has been linked to epigenetic changes (Quintin et al., 2012; Cheng et al., 2014; Ciarlo et al., 2020; Johnston et al., 2024) and in cell metabolism alterations, such as increased anaerobic glycolysis, as well as, the production of reactive oxygen species and the synthesis of pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-1 β , and TNF- α that favor infection control (Paris et al., 2020; Pedro et al., 2021).

We demonstrated in this study that treatment with one dose of β -glucan induced trained innate immunity confirmed by epigenetic changes represented by the acetylation of lysines on histone 3 (3K9ac and 3K27ac) and the production of Il-6 by bone marrow-derived macrophages. The assessment of epigenetic changes in bone marrow cells are considered important markers of trained immunity (Cheng et al., 2014; Saeed et al., 2014). These changes have mainly been demonstrated from the acetylation of lysines in histone 3, being a recurring phenomenon and demonstrated from different training substances, such as β -glucan (Moorlag et al., 2020) zymosan (Ciarlo et al., 2020), *C. albicans* (Rosati et al., 2024) and the BCG vaccine (Araújo et al., 2023). Although in the literature these epigenetic marks have traditionally been investigated in bone marrow cells (Kaufmann et al., 2018; Ciarlo et al., 2020; Jeljeli et al., 2019), we observed that this

alteration is also marked in splenic cells, an important site of infection for the agents investigated here (Gorvel and Moreno, 2002; Radoshevich and Cossart, 2017).

Although we used zymosan and β -glucan as training agents, a better performance of β -glucan was expected, considering that it is part of the composition of zymosan (Di Carlo and Fiore, 1958), and is recognized as the component of zymosan inducer of trained immunity. The effects related to the activation of innate immune cells are mostly related to β -glucan, due to its binding to dectin-1 receptors, leading to signaling and activation of cellular pathways (Cheng et al., 2014; Johnston et al., 2024). In addition, it is known that the immunological effect of these polysaccharides can be variable depending on their origin and extraction method (Noss et al., 2013).

According to the results obtained, higher numbers of doses for training can result in a loss of protective capacity. This aspect depended on the type and dose of β -glucan. Byrne et al. (2021) described that the training β -glucan was not able to generate trained immunity in pig peripheral blood monocytes, inducing a picture of immunological tolerance. However, studies carried out using different concentrations of zymosan training *in vitro* have not reported this effect (Sonck et al., 2010; Ciarlo et al., 2020). So, more studies are needed to understand and to select better types of trainers of trained immunity.

These results also demonstrated the ability of these substances to efficiently improve bone marrow macrophages in eliminating infectious agents, even without prior contact, thus not mediating adaptive immunity, and this characteristic was transmitted to new generations of cells. In addition, this training may be transmitted through generations of animals, as demonstrated in some studies (Katzmarski et al., 2021). Interestingly, male and female mice trained with zymosan exhibited in their offspring a greater ability to control infection by both *L. monocytogenes* and *E. coli*, which according to the authors is a transgenerational transmission of the effect of trained innate immunity (Katzmarski et al., 2021).

In this study, mice of the C57BL/6 strain, when trained with both zymosan and β -glucan, had a greater ability to control the infection. This corroborates what has been shown in the literature, in which the protective capacity developed through epigenetic reprogramming enabled infection control (Ciarlo et al., 2020). Similar data was demonstrated by Th roude et al. (2021), when they investigated the effect of training innate immunity by zymosan on protection against *L. monocytogenes* infection in

C57BL/6 mice, associated with the effect of greater stimulation of hematopoietic cell proliferation and increased levels of cytokines, especially IL-1 β .

We found that training induced by β -glucan did not favor greater cell proliferation and was therefore a response directly linked to the vaccine, which is a characteristic of the adaptive immune system (Adams et al., 2020). In a study carried out with zymosan, it is found that it can have an effect on the proliferation and viability of splenocytes, however, this effect was limited to 1 μ g/mL, where after this effect was detrimental (Taghavi et al., 2018).

Protection induced by inactivated strains of *Brucella* spp. is questionable (Lee et al. 2001; Silva et al., 2024), because even though there is induction of a humoral response that can direct the immune response towards the Th1 type, the effectiveness in protecting against infection was not achieved (Lee et al., 2001). However, when innate immune training associated with inactivated vaccine preparations was used to control *B. ovis* infection, significant protection was established in mice model. The training of innate immunity by β -glucan associated with the inactive *B. ovis* vaccine showed significant post-infection protection, which opens possibilities for the use of similar protocols associated with other inactivated vaccines. This set of data opens new opportunities for the use of this substance, with the intention of increasing the efficacy of vaccines, especially in the natural host of these microorganisms.

Based on the data obtained, it is possible to propose that the positive immunomodulatory effect exerted by substances that train innate immunity may contribute to improving the adaptive immune response of inactivated vaccines, but not in live vaccines, which may be due to the fact that, at the time of vaccination, macrophages are better able to fight microorganisms and eliminate the vaccine strain more quickly.

In conclusion, the effect of trained innate immunity may be influenced by various factors. However, its use alongside inactivated vaccines to control infections caused by *B. ovis* and *L. monocytogenes* can be beneficial, as it enhances our ability to control these pathogens.

5.6. References.

ADAMS, N. M.; GRASSMANN, S.; SUN, J.C. Clonal expansion of innate and adaptive lymphocytes. *Nat Rev Immunol.* n.20, v.11, p.694-707, 2020.

ADACHI, Y.; ISHII, T.; IKEDA, Y. et al. Characterization of beta-glucan recognition site on C-type lectin, dectin 1. *Infect Immun.* v.72, n.7, p.4159-4171, 2004.

ARAÚJO, A.C.V.S.C.; QUEIROZ, N.M.G.P.; MARINHO, F.V. et al. Bacillus Calmette-Guérin - Trained macrophages elicit a protective inflammatory response against the pathogenic bacteria *Brucella abortus*. *J. Immunol.* n.211, v.5, p.791-803, 2023.

BRAZ, H.M.B.; SILVA, M.F.; CARVALHO, T.P. et al. Pathogenesis of *Brucella ovis* in pregnant mice and protection induced by the candidate vaccine strain *B. ovis* $\Delta abcBA$. *Vaccine.* v.40, n.32, p.4617-4624, 2022.

BYRNE, K.A.; TUGGLE, C.K.; LOVING, C.L. et al. Differential induction of innate memory in porcine monocytes by β -glucan or bacillus Calmette-Guerin. *Innate Immun.* v.27, n.6, p.448-460, 2021.

CARVALHO, T.F.; HADDAD, J.P.A.; PAIXÃO, T.A. et al. Meta-analysis and advancement of brucellosis vaccinology. *PLoS One.* v.11, n.11, p.e0166582.

CARVALHO, P.T.; RIBEIRO, N.Q.; MOL, J.P.S. et al. Pathogenic potential of *Brucella ovis* field isolates with different genotypic profile and protection provided by the vaccine strain *B. ovis* $\Delta abcBA$ against *B. ovis* field isolates in mice. *Pesq. Vet. Bras.* v.40, n.2, p.88-96, 2020.

CHENG, S.; QUINTIN, J.; CRAMER, R.A. et al. mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science.* v.345, n.6204, p.1250684, 2014.

CIARLO, E.; HEINONEN, T.; THÉROUDE, C. et al. Trained immunity confers broad-spectrum protection against bacterial infections. *J Infect Dis.* v.222, n.11, p.1869-1881, 2020.

CZUPRYNSKI, C.J.; FAITH, N.G.; STEINBERG, H. A/J mice are susceptible and C57BL/6 mice are resistant to *Listeria monocytogenes* infection by intragastric inoculation. *Infect Immun.* v.71, n.2, p.682-689, 2003.

DI CARLO, F.J.; FIORE, J.V. On the composition of zymosan. *Science.* v.127, n.3301, p.756-757, 1958.

GORVEL, J.P.; MORENO, E. Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet. Microbiol.* v.90, n.1-4, p.281-297, 2002.

ISPADA, J.; MILAZZOTTO, M.P. Silencing mark H3K27me3 is differently reprogrammed in bovine embryos with distinct kinetics of development. *Reprod. Domest. Anim.* v.57, n.3, p.333-336, 2022.

ISPADA, J.; JUNIOR, A.M.F.; LIMA, C.B. et al. Tricarboxylic acid cycle metabolites as mediators of DNA methylation reprogramming in bovine preimplantation embryos. *Int J Mol. Sci.* v.21, n.18, p.6868, 2020.

JELJELI, M.; RICCIO, LG.C.; DORIDOT, L. et al. Trained immunity modulates inflammation-induced fibrosis. *Nat Commun.* v.10, n.1, p.5670, 2019.

JOHNSTON, C.J.H.H; LEDWITH, A.E.; LUNDAHL, M.L.E. et al. Recognition of yeast β -glucan particles triggers immunometabolic signaling required for trained immunity. *iScience.* v.27, n.3, p.109030, 2024.

KATZMARSKI, N.; DOMÍNGUEZ-ANDRÉS, J.; CIROVIC, B. et al. Transmission of trained immunity and heterologous resistance to infections across generations. *Nat. Immunol.* v. 22, p.1382-1390, 2021.

KAUFMANN, E.; SANZ, J.; DUNN, J.L. et al. BCG educates hematopoietic stem cells to generate protective innate immunity against tuberculosis. *Cell.* v.172, n.1-2, p.176-190, 2018.

LEE, I.K.; OLSEN, S.C.; BOLIN, C.A. Effects of exogenous recombinant interleukin-12 on immune responses and protection against *Brucella abortus* in a murine model. *Can. J. Vet. Res.* v.65, n.4, p.223-228, 2001.

MENG, F.; WANG, Y.; CHEN, C. et al. The inactivated and ISA 61 VG adjuvanted vaccine enhances protection against cross-serotype *Listeria monocytogenes*. *Vet. Res.* v.56, n.1, p.60, 2025.

MOERINGS, B.G.J.; GRAAFF, P.; FURBER, M. et al. Continuous exposure to non-soluble β -glucans induces trained immunity in m-csf-differentiated macrophages. *Front Immunol.* v.12, p.672796, 2021.

MONROE, L. L. ARMSTRONG, M.G.; ZHANG, X. et al. Zymosan-induced peritonitis: effects on cardiac function, temperature regulation, translocation of bacteria, and role of dectin-1. *Shock.* v.46, n.6, p.723-730, 2016.

MOORLAG, S.J.C.F.M.; RODRIGUEZ-ROSALES, Y.A.; GILLARD, J. et al. BCG vaccination induces long-term functional reprogramming of human neutrophils. *Cell Rep.* v.33, n.7, p.108387, 2020.

NOSS, I.; DOEKES, G.; THORNE, P.S. et al. Comparison of the potency of a variety of β -glucans to induce cytokine production in human whole blood. *Innate Immun.* v.19, n.1, p.10-9, 2013.

OLIVEIRA, J.B.S.; COSTA, F.B.; LIMA, P.A. et al. Evaluation of polymeric adjuvants associated with candidate vaccine strain *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ in a murine model of *Brucella ovis* infection. *Vet. Ital.* v.60, n.3, p.1-14, 2024.

PARIS, S.; CHAPAT, L.; PASIN, M. et al. β -glucan-induced trained immunity in dogs. *Front. Immunol.* v.11, p. 566893, 2020.

PEDRO, A.R.V.; LIMA, T.; FRÓIS-MARTINS, R. et al. Dectin-1-mediated production of pro-inflammatory cytokines induced by yeast β -glucans in bovine monocytes. *Front. Immunol.* v.12, p.689879, 2021.

QUINTIN, J.; SAEED, S.; MARTENS, J.H.A. et al. *Candida albicans* infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes. *Cell Host. Microbe.* v.12, n.2, p.223-232, 2012.

RADOSHEVICH, L.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* v.16, n.1, p.32-46, 2018.

ROCHA, C.E.V.; SILVA, M.F.; GUEDES, A.C.B. et al. Alginate-chitosan microcapsules improve vaccine potential of gamma-irradiated *Listeria monocytogenes* against listeriosis in murine model. *In.t J. Biol. Macromol.*, v.10, n.176, p.567-577, 2021.

ROSATI, D.; PRADHAN, A.; VAN HECK, J.I.P. et al. *Candida albicans* n-linked mannans potentiate the induction of trained immunity via dectin-2. *J. Infect. Dis.* v.230, n.3, p.768-777, 2024.

SANTOS, J.C.D.; FIGUEIREDO, A.M.B.; SILVA, M.V.T. et al. β -glucan-induced trained immunity protects against *Leishmania braziliensis* infection: a crucial role for IL-32. *Cell Rep.* v.28, n.10, p.2659-2672, 2019.

SILVA, A.P.C.; MACÊDO, A.A.; SILVA, T.M. et al. Protection provided by an encapsulated live attenuated $\Delta abcBA$ strain of *Brucella ovis* against experimental challenge in a murine model. *Clin. Vaccine Immunol.* v.22, p.789-797, 2015.

SILVA, T.M.A.; PAIXÃO, T.A.; COSTA, E.A. et al. Putative ATP-binding cassette transporter is essential for *Brucella ovis* pathogenesis in mice. *Infect. Immun.* v.79, n.4, p.1706-1717, 2011.

SILVA, G.S.; SILVA, D.A.; F. GUILHELMELLI, F. et al. Zymosan enhances *in vitro* phagocyte function and the immune response of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* v.59, n.8, p.749-762, 2021.

SILVA, L.A.; SOUZA, M.F.; CARVALHO, T.P. et al. Comparative study on alginate/chitosan microcapsules and Montanide ISA 61 as vaccine adjuvants in mice. *PLos One.* v.19, n.4, p. e0298117, 2024.

SONCK, E.; STUYVEN, E.; GODDEERIS, B. et al. The effect of beta-glucans on porcine leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* v.135, n.3-4, p.199-207, 2010.

TAGHAVI, M.; MORTAZ, E.; KHOSRAVI, A. et al. Zymosan attenuates melanoma growth progression, increases splenocyte proliferation and induces TLR-2/4 and TNF- α expression in mice. *J. Inflamm. (Lond).* v.15, n.5, p.1-10, 2018.

THÉROUDE, C.; REVERTE, M.; HEINONEN, T. et al. Trained immunity confers prolonged protection from listeriosis. *Front. Immunol.* v.12, p.723393, 2021.

VERWOOLDE, M.B.; VAN DEN BIGGELAAR, R.H.G.A.; REILINGH, G.V. et al. Innate immune training and metabolic reprogramming in primary monocytes of broiler and laying hens. *Dev. Comp. Immunol.* v.114, p.103811, 2021.

VIERBOOM, M.P.M.; DIJKMAN, K.; SOMBROEK, C.C. et al. Stronger induction of trained immunity by mucosal BCG or MTBVAC vaccination compared to standard intradermal vaccination. *Cell Rep. Med.* v.2, n.1, p.100185, 2021.

ZHANG, X.; GONÇALVES, R.; MOSSER, D.M. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr. Protoc. Immunol.* v.83, p.14.1.1-14.1.14, 2008.