



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE MEDICINA

CAMPUS DE BOTUCATU

**PAPEL DE PROSTAGLANDINAS E LEUCOTRIENOS SOBRE AS  
FUNÇÕES DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EM RESPOSTA AO  
*Paracoccidioides brasiliensis***

**REGINALDO KELLER FERNANDES**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Patologia da Faculdade  
de Medicina de Botucatu, Universidade  
Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do  
título de Mestre em Patologia.

**Botucatu – SP**

**2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

**FACULDADE DE MEDICINA**

**CAMPUS DE BOTUCATU**

**PAPEL DE PROSTAGLANDINAS E LEUCOTRIENOS SOBRE AS  
FUNÇÕES DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EM RESPOSTA AO  
*Paracoccidioides brasiliensis***

**Mestrando: Reginaldo Keller Fernandes**

**Orientador(a): Prof<sup>a</sup> Titular Ângela Maria V. Campos Soares**

**Co-orientador(a): Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciane Alarcão Dias-Melicio**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

**Botucatu – SP**

**2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Fernandes, Reginaldo Keller.

Papel de prostaglandinas e leucotrienos sobre as funções das células dendríticas em resposta ao *Paracoccidioides brasiliensis* / Reginaldo Keller Fernandes. – Botucatu : [s.n.], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Ângela Maria Victoriano de Campos Soares

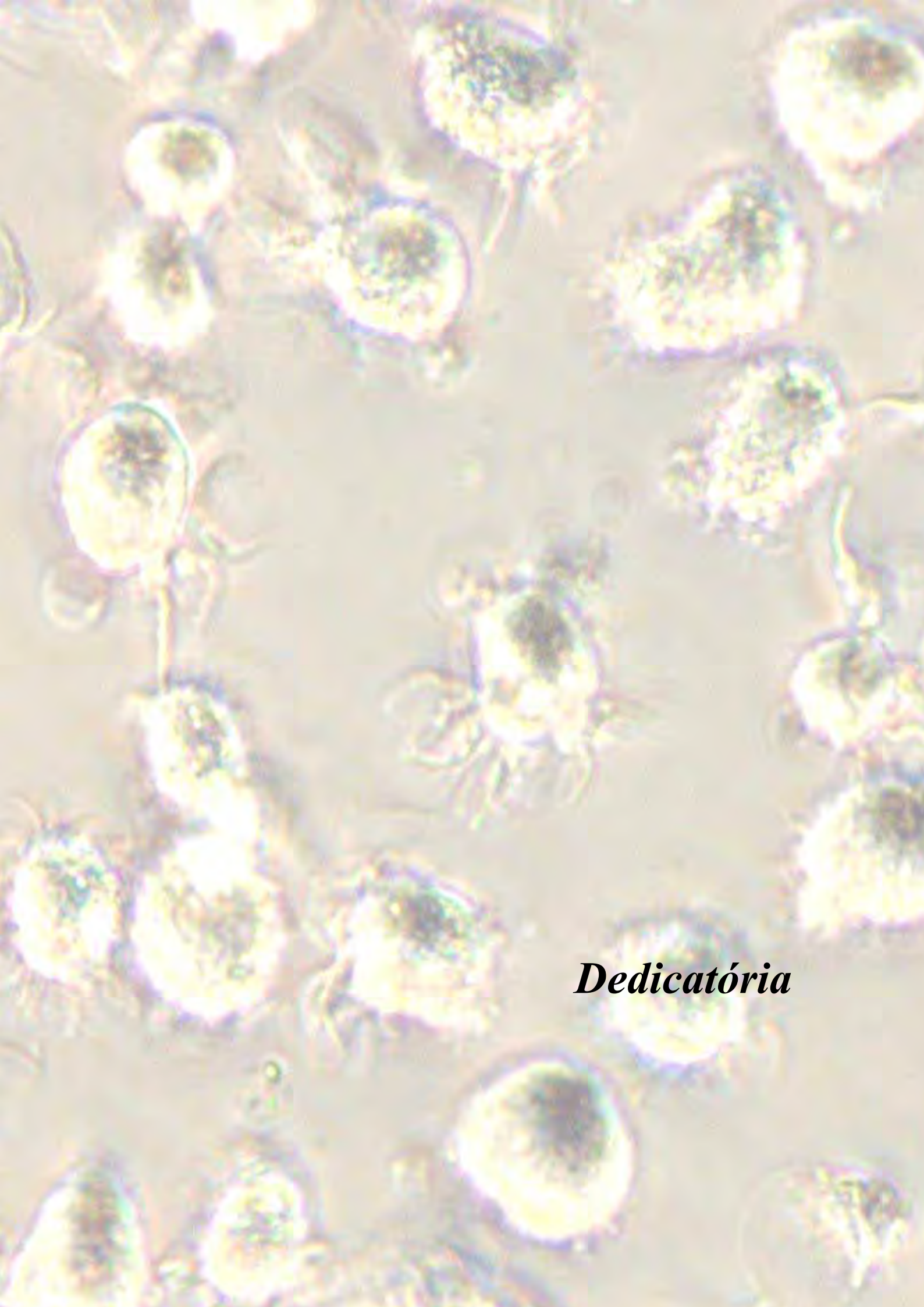
Coorientador: Luciane Alarcão Dias-Melicio

Capes: 21104000

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. Citocinas. 3. Leucotrienos.  
4. Prostaglandina. 5. Resposta imune.

Palavras-chave: Eicosanóides; Célula dendrítica; Citocinas; Leucotrieno; *Paracoccidioides brasiliensis*; Prostaglandina.

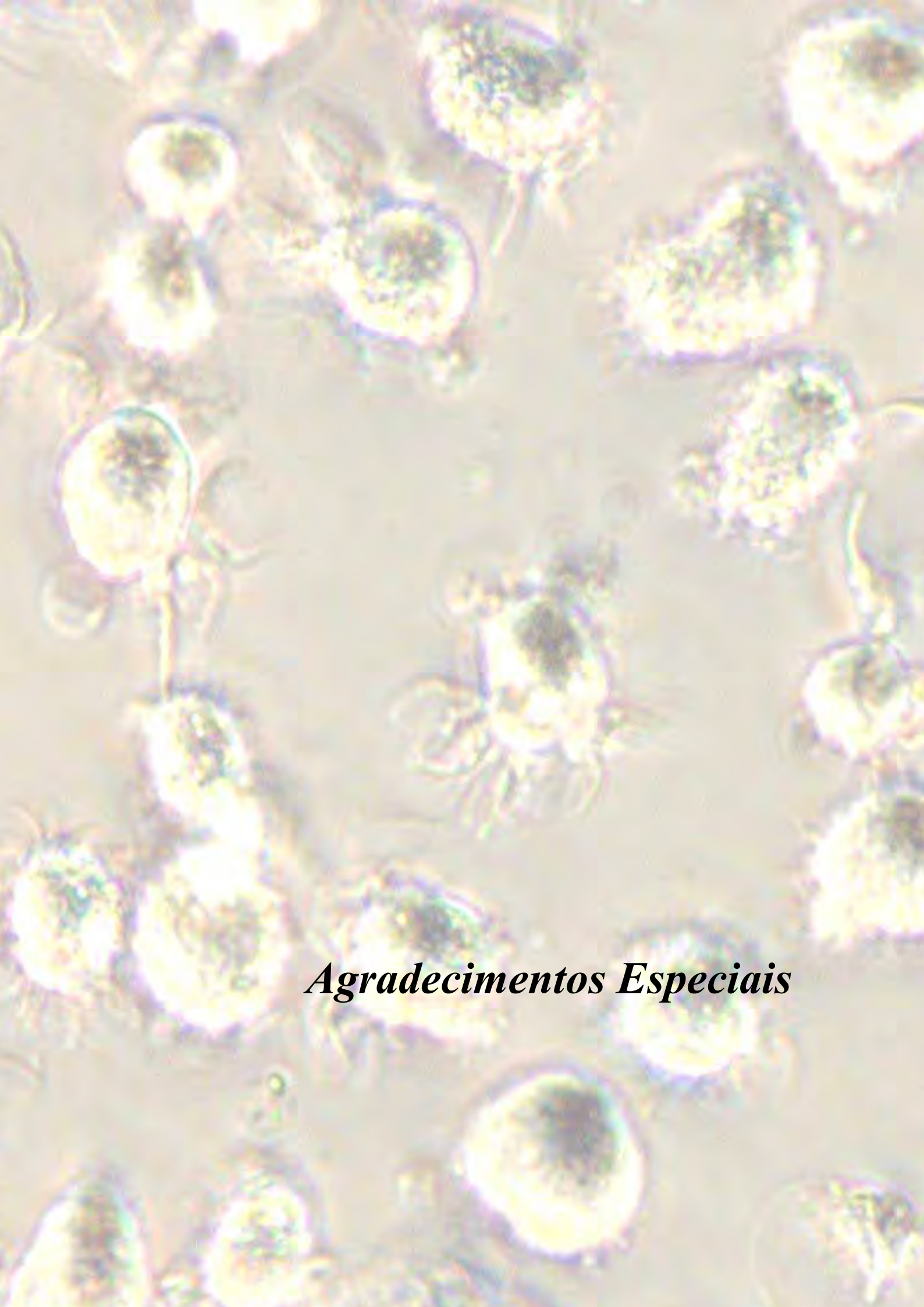
*Estudo realizado nos laboratórios do  
Departamento de Microbiologia e  
Imunologia do Instituto de Biociências,  
UNESP – Botucatu.*

The background of the page is a microscopic image showing numerous cells, likely from a tissue sample. The cells are stained, showing various shades of pink, purple, and blue. Some cells have prominent nuclei, while others are more rounded or elongated. The overall texture is granular and complex, typical of a histological slide.

## *Dedicatória*

*Dedico este estudo às Professoras da Universidade  
Sagrado Coração - USC: Prof<sup>a</sup> Daniela Barbosa  
Nicolielo pela sua ilustre competência com que me  
introduziu a imunologia básica, Prof<sup>a</sup> Silvana  
Torossian Coradi pelo modo inigualável com que  
ministrou a imunologia aplicada entre outras  
disciplinas e à Prof<sup>a</sup> Dulce Helena Jardim  
Constantino que além de me introduzir de modo  
excepcional aos princípios da patologia, me orientou  
na iniciação científica me fazendo tomar mais gosto  
ainda, pela ciência e pela pesquisa.*

*Voces fizeram toda a diferença na minha formação  
depositando confiança, despertando minha  
curiosidade, iluminando meu caminho e acima de  
tudo sendo o melhor dos exemplos no que diz  
respeito à dedicação e ao amor a profissão.*

The background of the page is a microscopic image showing numerous cells, likely from a tissue sample. The cells are stained, showing various shades of yellow, green, and blue. Some cells have prominent nuclei, while others are more rounded or elongated. The overall texture is granular and complex, typical of a histological slide.

*Agradecimentos Especiais*

*Agradeço em especial ao que eu chamaria de  
essência superior, que por meio de uma voz que vem  
lá do fundo não me diz o que fazer, mas me diz que  
eu sempre sou capaz de fazer...*

*Agradeço em especial à minha orientadora Prof<sup>a</sup>  
Titular Ângela Maria Victoriano de Campos Soares  
por me receber e me acolher com tanta disposição na  
UNESP - FMB, Botucatu.*

*Voce me permitiu crescer e aguçou a minha vontade  
de investigar com dedicação e seriedade.*

*Voce é um exemplo de profissional competente e  
ética. A consequência disso foi uma orientação  
comprometida e determinante.*

*Agradeço em especial à minha co-orientadora Prof<sup>a</sup>  
Dr<sup>a</sup> Luciane Alarcão Dias-Melicio por me guiar com  
muita vontade e dedicação às atividades do  
laboratório.*

*Voce de forma competente e precisa me permitiu  
desenvolver técnicas essenciais para a conclusão  
deste estudo.*

*O resultado disso foi uma co-orientação segura.*

*Agradeço em especial ao colaborador deste estudo  
Profº Drº Ramon Kaneno pela imensa contribuição  
na padronização da diferenciação de monócitos em  
células dendríticas e pelas sugestões valiosas. Voce  
foi essencial no desenvolvimento deste Projeto.*

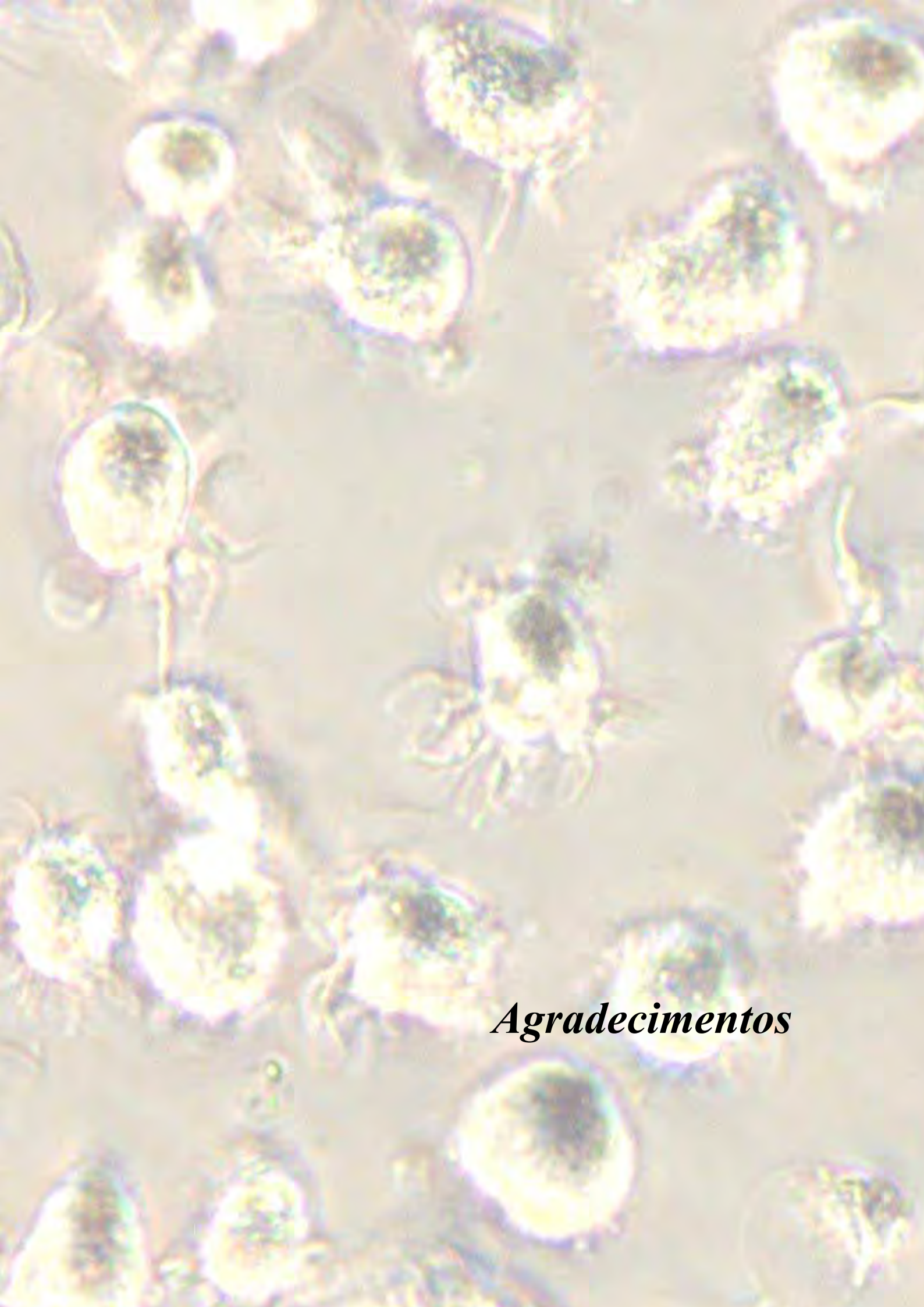
*Agradeço em especial à Profª Drª Luciane Alarcão  
Dias-Melicio, à Drª Ana Paula Bordon-Graciani e  
aos doutorandos Daniela Ramos Rodrigues, Tatiana  
Fernanda Bachiega, Helanderson de Almeida  
Balderramas e Guilherme Augusto Biondo por me  
receberem de braços abertos ao grupo de pesquisa  
Imunologia da Paracoccidioidomicose.*

*Voces me confortaram, me incentivaram, me  
guiaram e acreditaram na minha capacidade de  
contribuir com o grupo. Eu acredito e sou muito  
grato a cada um de voces.*

*Agradeço em especial aos meus pais Abílio Fernandes Sobrinho e Neize Aparecida Keller Fernandes pela intensa compreensão e paciência com a minha opção em dar seguimento aos meus estudos. Vocês acreditaram e eu estou fazendo valer a pena.*

*À minha irmã e pupila Regiane Keller Fernandes por participar tão ativamente das minhas atividades desde a graduação à pós-graduação. Eu tento ser um exemplo para que você perceba como é possível chegar onde queremos. Você é parte do que eu tenho de melhor, parte da minha essência.*

*Ao meu melhor amigo e parceiro Fábio Aparecido Ramos Cardoso pela generosidade em me conceder aulas particulares e gratuitas de língua estrangeira e pelo apoio incondicional desde a minha tomada de decisão com a pós-graduação, até a conquista desta. Você tem responsabilidade direta na minha evolução profissional.*



*Agradecimientos*

*Agradeço aos doadores de sangue voluntários pela imensa contribuição em doar um pedacinho de si para o desenvolvimento desse Projeto.*

*À Dr<sup>a</sup> Ana Paula Bordon-Graciani, aos doutorandos Daniela Ramos Rodrigues, Tatiana Fernanda Bachiega, Helanderson de Almeida Balderramas pela amizade, pela convivência muito agradável e por todo auxílio prestado nos experimentos e nas análises destes. Vocês contribuíram muito.*

*Ao Laboratório de Citometria de Fluxo – Hemocentro, em especial, à Mårjorie de Assis Golim pelo auxílio durante toda caminhada para a conclusão desse Projeto. Aprendi muito com vc.*

*Aos Professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia – UNESP: Ramon Kaneno, Sílvia Luís de Oliveira, Maurício Sforcin, Alexandrina Sartori e Maria Terezinha Serrão Peraçoli pela convivência agradável nesses dois anos de pós-graduação.*

*Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia – UNESP: Sônia M. Faraldo, Leonice A. Garcia (Nice), Luís S. dos Santos (Lula) por toda ajuda burocrática e etapas dos experimentos nesses 2 anos de convivência.*

*À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Denise Fecchio e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sueli Calvi pelas preciosas sugestões durante o exame de qualificação.*

*À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Guimarães da Silva, coordenadora do curso de Pós-graduação em Patologia pelo apoio e auxílio constantes.*

*Às secretárias da Pós-Graduação em Patologia Vânia Soler e Tânia Andrade. Aos funcionários da seção de Pós-Graduação Regina Spadin e Nathanael Salles pela disposição de esclarecer todas as minhas dúvidas.*

*Aos amigos de sempre Richardson, Vinícius, Bruno Conti, Bruno Laser, Douglas, Graziela Dias e Cilene de Oliveira pelo apoio incondicional e pela fé depositada em mim na busca dos meus objetivos. Amigos de coração.*

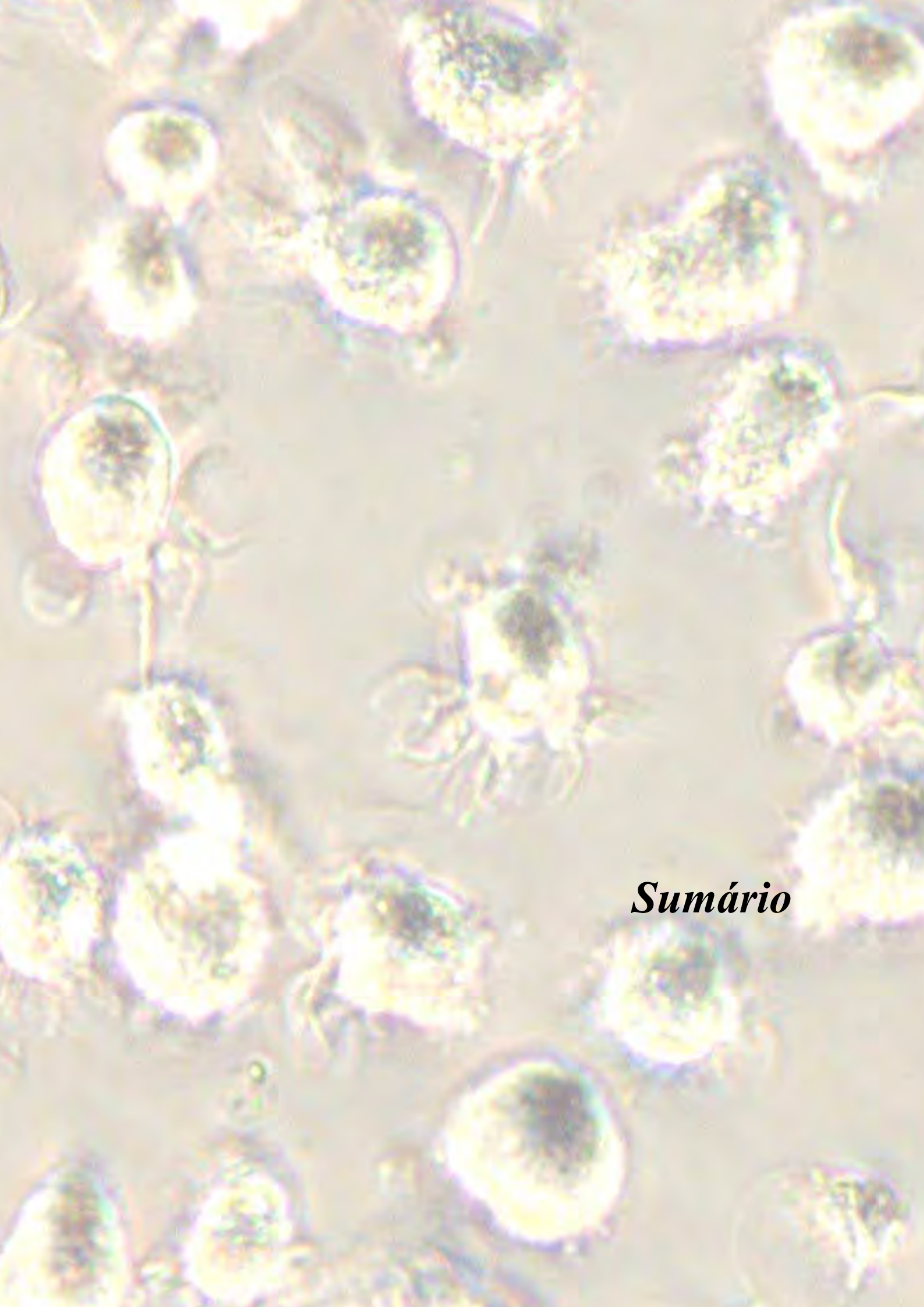
*Às minhas amigas muito especiais que conheci na graduação: Aline, Isabela, Mayara, Michelle, Gérsika e Tatiana por me proporcionar os momentos mais preciosos da minha vida e por participarem tão diretamente da minha caminhada. Amo vocês.*

*Aos Professores da USC: Dorival, Zezito, Paulão, Fausi, Dulce, Silvana, Daniela, Ana Maria, Valéria e Maricê pelas aulas prazerosas, pela amizade e pelo apoio incondicional na busca dos meus objetivos.*

*À FAPESP pela concessão da bolsa de estudos e auxílio financeiro.*

***“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais  
inteligente, mas o que melhor se adapta às  
mudanças”.***

***Charles Darwin***



## *Sumário*

## SUMÁRIO

|                                                                      |           |
|----------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Capítulo I .....</b>                                              | <b>19</b> |
| 1. Revisão Bibliográfica .....                                       | 20        |
| 1.1. Mediadores Lipídicos na Resposta Imune Inata e Adaptativa ..... |           |
| 1.2. Prostaglandinas .....                                           | 22        |
| 1.3. Leucotrienos .....                                              | 26        |
| 1.4. Eicosanóides e Paracoccidioidomicose .....                      | 30        |
| 2. Referências Bibliográficas .....                                  | 32        |
| <b>Capítulo II .....</b>                                             | <b>45</b> |
| Manuscrito .....                                                     | 46        |
| Introdução .....                                                     | 48        |
| Material e Métodos .....                                             | 51        |
| Resultados .....                                                     | 56        |
| Discussão .....                                                      | 89        |
| Referências Bibliográficas .....                                     | 98        |
| Anexos .....                                                         | 106       |
| Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética.....                            | 107       |
| Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....            | 108       |

The background of the slide is a microscopic image showing numerous cells, likely from a tissue sample. The cells are stained, with prominent dark purple nuclei and lighter, pinkish cytoplasm and extracellular matrix. The cells are scattered across the field of view, with some appearing more distinct than others.

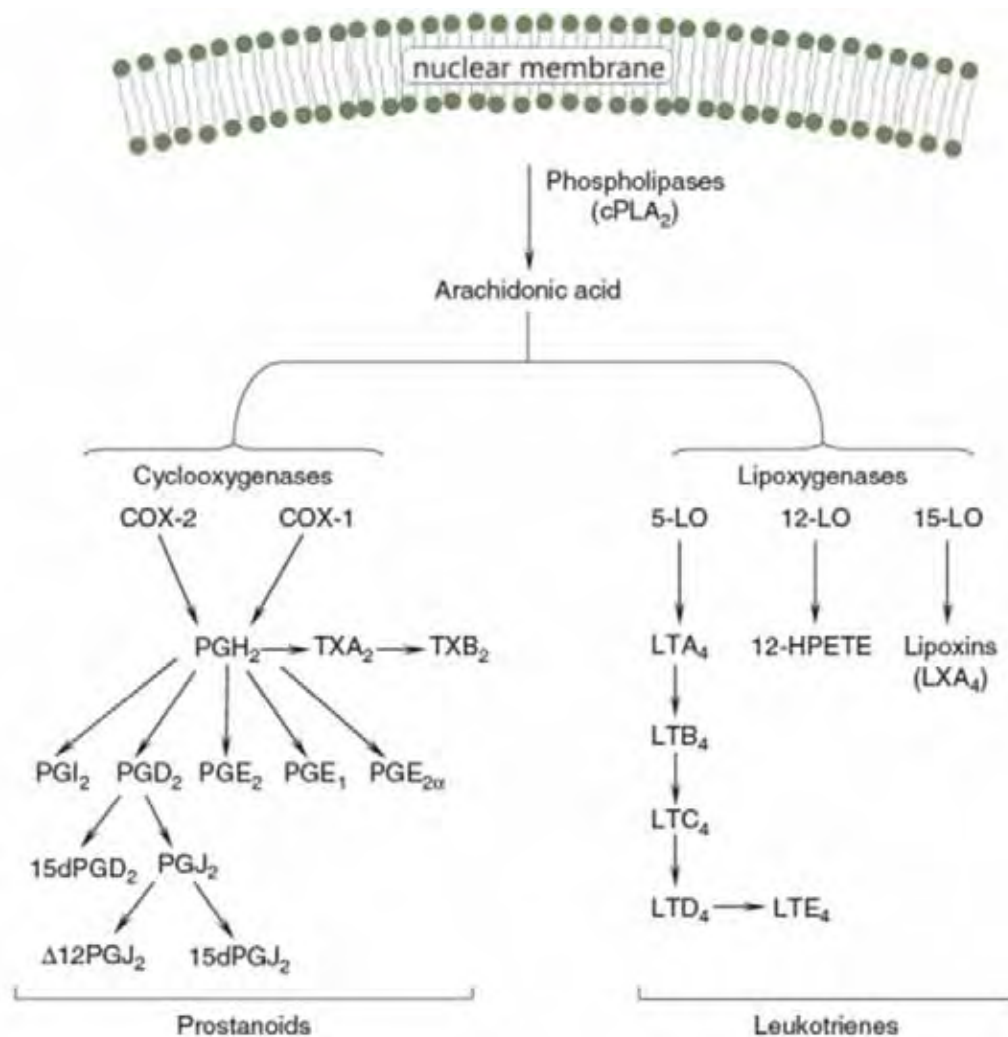
***Capítulo I***  
***Revisão Bibliográfica***

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. Mediadores Lipídicos na Resposta Imune Inata e Adaptativa

Os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da imunidade inata e da adaptativa e das interações entre elas são modulados por uma variedade de moléculas secretadas por diferentes células do sistema imune e não imune. Entre essas moléculas destacam-se os mediadores lipídicos que apresentam grande impacto na indução da liberação de citocinas, na diferenciação celular, na apoptose <sup>(1)</sup> e ainda estão envolvidos na modulação da intensidade e duração da resposta inflamatória, e também na regulação das funções dos linfócitos B e T <sup>(2)</sup>. Os mediadores lipídicos: prostaglandinas, tromboxanas, leucotrienos e lipoxinas chamados coletivamente de eicosanóides são uma importante classe de moléculas biologicamente ativas resultantes do metabolismo do ácido araquidônico (AA) <sup>(1, 3)</sup>.

Os ácidos graxos são os precursores do AA e se encontram distribuídos em todos os tecidos, principalmente nas membranas celulares e nucleares, e nas células de gordura. Desempenham importante função na conformação da membrana celular, nos processos metabólicos e na produção de eicosanóides <sup>(4)</sup>. Entre os ácidos graxos destacam-se os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) ômega 3: ácido  $\alpha$ -Linolênico (LNA) e ácido eicosapentaenoico (EPA), e ômega 6: ácido linoléico (LA), ácido docosahexaenóico (DHA) e o ácido araquidônico (AA) que apresentam vários efeitos sobre a resposta imune e inflamatória <sup>(5, 6)</sup>. O EPA e principalmente o AA constituem substratos para a síntese dos eicosanóides <sup>(7)</sup>. O AA é liberado dos fosfolipídios da membrana celular ou nuclear por meio da ação da enzima fosfolipase A2 (PLA<sub>2</sub>) em resposta a uma série de estímulos não específicos como mediadores próinflamatório-inflamatórios e outros estresses. O AA liberado sofre ação de enzimas como as ciclooxigenases (COX) liberando prostanóides como prostaglandinas (PGs) e Tromboxanos (TXA<sub>2</sub>), ou as lipoxigenases (LO) que geram leucotrienos (LTs), ácidos hidroperoxieicosatetraenóicos (HPETEs) e lipoxinas (LXs) <sup>(8)</sup> (Fig. 1). Em conjunto esses eicosanóides estão envolvidos na manutenção da homeostasia, na regulação da pressão sanguínea, na função renal, na reprodução dos mamíferos, bem como na defesa do hospedeiro <sup>(9)</sup>.



**Figura 1:** Esquema representativo da síntese de eicosanóides. Alterado de Harizi & Gualde, 2005; Haeggstrom & Funk, 2011.

Dentre os eicosanóides sintetizados, as prostaglandinas (PGs) e os leucotrienos (LTs) têm merecido atenção por desempenharem um importante papel na modulação da resposta imune em diferentes infecções<sup>(10,11)</sup>. As células da imunidade inata como macrófagos teciduais, células dendríticas (DCs) e neutrófilos (PMNs) são as maiores produtoras de eicosanóides<sup>(12)</sup>. A produção endógena desses mediadores inflamatórios por células apresentadoras de antígenos (APCs) pode estar relacionada a um importante mecanismo pelo qual essas células modulam suas próinflamatórias funções e as funções de outros tipos celulares, como células T, células B e células *natural killer* (NK)<sup>(13)</sup>.

Contudo, para que os eicosanóides possam exercer suas funções biológicas, esses mediadores ligam-se a receptores específicos presentes em células da imunidade

inata e adaptativa <sup>(8)</sup>. Essas células são estimuladas por padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) ou outros estresses e produzem citocinas que tem parte de sua produção e atividade controlada por mediadores lipídicos, principalmente PGE<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub> e LTC<sub>4</sub> <sup>(1)</sup>.

## 1.2. Prostaglandinas (PGs)

As PGs são moléculas derivadas do ácido araquidônico (AA) por ação das enzimas ciclooxygenases (COX-1 e COX-2), sendo a COX-1 a forma constitutiva presente em muitos tipos celulares, particularmente no estômago, intestino, rins e plaquetas (Smith & Dewitt, 1996) e a COX-2 a forma induzida condicionada a estímulos inflamatórios <sup>(14, 15)</sup>. Em resposta a vários estímulos esse grupo de mediadores lipídicos que incluem PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGJ<sub>2</sub> e TXA<sub>2</sub> são liberados e exercem suas atividades ligando-se a receptores específicos: receptor de prostaglandina D (DP), receptor de prostaglandina E<sub>1,2,3,4</sub> (EP1, EP2, EP3 e EP4), receptor de prostaglandina F (FP), receptor de prostaglandina I (IP), receptor de prostaglandina J (JP) e receptor de tromboxana (TP) <sup>(16)</sup>. As TXA<sub>2</sub> são potentes mediadores da formação e agregação plaquetária <sup>(17,18)</sup> e apresentam efeitos inflamatórios <sup>(19, 20, 21)</sup>. As PGs além do seu papel em processos inflamatórios como febre, hiperalgesia e edema, também regulam uma variedade de eventos celulares da resposta imune, particularmente a PGE<sub>2</sub> desempenha um importante papel modulador sobre as funções das células da resposta imune inata e adaptativa <sup>(22)</sup>.

No que se refere à resposta imune inata, estudos pioneiros mostraram o papel supressor da PGE<sub>2</sub> sobre a fagocitose e secreção de enzimas lisossomais por neutrófilos <sup>(23)</sup>. Esse mediador ainda atua sobre macrófagos alveolares inibindo a sua capacidade fagocítica <sup>(24,25)</sup>. Outros estudos mostraram que a alta produção de PGE<sub>2</sub> após o transplante de medula óssea é um fator crítico para a diminuição da resposta imune contra patógenos. Nessas condições, esse mediador além de inibir a fagocitose atua sobre a capacidade bactericida de macrófagos alveolares e a capacidade bactericida de neutrófilos, assim como a produção de TNF- $\alpha$  <sup>(26)</sup>. Os efeitos da PGE<sub>2</sub> sobre a atividade bactericida das células fagocíticas, envolve a redução do metabolismo do oxigênio <sup>(27)</sup>.

Ainda no que se refere à resposta imune inata, a PGE<sub>2</sub> inibe a atividade citolítica das células NK <sup>(28, 29)</sup>. Esse efeito supressor sobre as células NK envolve a atuação da PGE<sub>2</sub> sobre citocinas importantes para a ativação dessas células como a IL-

12, IL-18<sup>(30)</sup> e IL15<sup>(31)</sup>. A PGE<sub>2</sub> ainda inibe as atividades imunoregulatórias das células NK. Nesse sentido, essas células podem se diferenciar em células com alta capacidade de migração aos linfonodos e produzirem IFN- $\gamma$  após exposição às células dendríticas (DCs) ou após receber sinais de ativação de células T CD4<sup>+</sup> e ainda de promoverem a produção de IL-12 por DCs, e conseqüentemente o desenvolvimento de respostas envolvendo células CD4<sup>+</sup> e células CD8<sup>+</sup> citotóxicas. Esse processo é altamente induzido por IL-18, mas bloqueado pela PGE<sub>2</sub><sup>(32)</sup>.

A PGE<sub>2</sub> também desempenha um importante papel modulador sobre a resposta imune adaptativa, desde a fase de indução até a de efetuação dessa resposta. Embora o seu efeito preponderante sobre o desenvolvimento da resposta imune adaptativa, seja o de supressão, alguns trabalhos mostram que a adição de PGE<sub>2</sub> a um coquetel de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 aumenta consideravelmente o processo de maturação das DCs com conseqüente aumento da sua capacidade de migração aos tecidos linfóides secundários, assim como a de expressar moléculas coestimulatórias e de ativar células T. Assim, DCs cultivadas na presença das citocinas citadas acima + PGE<sub>2</sub> tornam-se ótimas células indutoras de células CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ <sup>(33, 34, 35)</sup>. No entanto, outros trabalhos têm demonstrado que DCs diferenciadas na presença de PGE<sub>2</sub>, apresentam inibição da capacidade de induzir uma resposta do tipo Th<sub>1</sub>, de células T citotóxicas ou de NK, enquanto aumenta respostas do tipo Th<sub>2</sub>, sendo esse efeito mediado pela supressão da produção de IL-12<sup>(36, 37)</sup>. Esse mediador ainda suprime diretamente a função das células T inibindo a produção de IL-2<sup>(38)</sup> e a expressão do seu receptor<sup>(39)</sup>. Inibe ainda os níveis da proteína JAK3<sup>(40)</sup> e a expressão do receptor para IL-12<sup>(41)</sup>. Além desse efeito supressor inespecífico sobre as células T, esse eicosanóide regula o balanço entre as atividades das células Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub> em favor de uma resposta do tipo Th<sub>2</sub>, uma vez que ele seletivamente inibe a produção de citocinas de padrão Th<sub>1</sub> como o IFN-  $\gamma$ , mas não as de padrão Th<sub>2</sub> como IL-4 e IL-5<sup>(42, 43)</sup>. Adicionalmente a PGE<sub>2</sub> por alterar o balanço IL-12/IL-23 em favor da IL-23, promove diferenciação das células T em Th<sub>17</sub><sup>(44, 45, 46, 47, 48)</sup>.

A PGE<sub>2</sub> ainda inibe a atividade de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas indiretamente por induzir DCs não produtoras de IL-12<sup>(49)</sup> e diretamente, atuando sobre a indução de atividade dessas células<sup>(50, 51)</sup> e sobre a capacidade dessas células já totalmente

diferenciadas em interagirem com seus alvos <sup>(52, 53)</sup>. A PGE<sub>2</sub> também diminui a produção de IFN- $\gamma$  pelas células CD8<sup>+</sup> <sup>(54)</sup>.

Além desse efeito supressor sobre as células efetoras da resposta imune, vários trabalhos têm demonstrado que esse mediador pode induzir a diferenciação de células que suprimem a resposta imune, como as Tregs, tanto em processos tumorais <sup>(55, 56)</sup> como em outros de imunossupressão <sup>(57)</sup>. O mecanismo de ação nesse caso envolve o aumento da expressão do gene para o fator de transcrição FOXP3 <sup>(58)</sup>. A PGE<sub>2</sub> pode mediar também a atividade das Tregs <sup>(59)</sup> e expandir as populações dessas células preexistentes, provavelmente por aumentar a interação dessas células com as DCs <sup>(60, 61)</sup>. Durante o desenvolvimento de processos tumorais a PGE<sub>2</sub> ainda pode induzir o acúmulo e retenção de células supressoras de origem mielóide (MDSC) <sup>(62)</sup> que tem capacidade de bloquear a imunidade adaptativa inibindo a ativação de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> <sup>(63, 64, 65, 66)</sup> e a imunidade inata inibindo as células NK <sup>(67)</sup>.

A PGE<sub>2</sub>, liberada pelas células tumorais é ainda capaz de induzir macrófagos teciduais a liberarem grandes concentrações de IL-10 <sup>(68, 69)</sup>. Esse eicosanóide ainda inibe a migração de monócitos em resposta a estímulos quimiotáticos e a capacidade dessas células de aderirem às células endoteliais, provavelmente via modulação do receptor CCR5 e da beta 2 integrina Mac-1 <sup>(70)</sup>.

Os efeitos da PGE<sub>2</sub> citados acima, de caráter nitidamente supressor sobre a resposta imune, têm levado os pesquisadores a investigar o papel desse mediador nos mecanismos de imunossupressão detectados em várias infecções. Assim, estudos utilizando inibição farmacológica ou deleção genética da enzima COX demonstraram uma substancial melhora da infecção *in vivo* e/ou aumento das funções das células fagocíticas *in vitro*, em infecções por várias bactérias como *Klebsiella pneumonia* <sup>(24)</sup>, *Pseudomonas aeruginosa* <sup>(71)</sup> e *Streptococcus pneumonia* <sup>(72, 73)</sup>. Edwards *et al.*, 1986 <sup>(74)</sup>, demonstraram que em camundongos infectados com *Mycobacterium avium intracellulare*, a PG suprime a produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos com consequente inibição da atividade microbicida de macrófagos. Da mesma forma, camundongos infectados com *Mycobacterium leprae* liberam PGE<sub>2</sub>, que atua como um modulador negativo endógeno da resposta imune que ocorre no microambiente da reação granulomatosa induzida por esse microorganismo <sup>(75)</sup>. Estudos em modelo experimental murino de tuberculose, demonstraram uma participação significativa da PGE<sub>2</sub> na

patogênese da tuberculose pulmonar, uma vez que durante a fase inicial da infecção, foram detectadas baixas concentrações de PGE<sub>2</sub> associadas à expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), permitindo o controle do crescimento do bacilo. Já, durante uma fase mais tardia da infecção, altas concentrações de PGE<sub>2</sub> estiveram associadas com diminuição da expressão de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , iNOS e alta expressão de IL-4, permitindo a progressão da doença <sup>(76)</sup>. Farrel & Kirkpatrick, 1987 <sup>(77)</sup>, demonstraram que células esplênicas de camundongos infectados com *Leishmania major* produzem elevados níveis de PGs associados à exacerbação da doença cutânea e depressão da resposta linfoproliferativa à Concanavalina-A (ConA). Alguns autores demonstraram que camundongos BALB/c infectados com *L. major*, susceptíveis à infecção, desenvolvem resposta imune preferencialmente mediada por células Th<sub>2</sub>. No entanto, quando tratados com indometacina passam a desenvolver resposta do tipo Th<sub>1</sub>, mostrando o efeito da PGE<sub>2</sub> na indução de resposta não protetora mediada por Th<sub>2</sub> <sup>(78)</sup>. Da mesma forma, tratamento com *Glycyrrhizic acid* de camundongos infectados com *Leishmania donovani* que induz uma diminuição da expressão da COX-2 em macrófagos infectados, resultou em um aumento da expressão de Nosintase, IL-12 e TNF- $\alpha$  e na inibição de IL-10 e TGF- $\beta$ , aumento da proliferação de células T e diminuição da carga parasitária no fígado e baço. Esses resultados comprovam o papel imunossupressor da PGE<sub>2</sub> em infecções por *Leishmania* <sup>(79)</sup>.

Schleifer & Mansfield, 1993 <sup>(80)</sup>, demonstraram que a ativação de macrófagos durante a infecção por *Trypanosoma brucei rhodesiense* leva à liberação de óxido nítrico (NO) e PGs que inibem a resposta proliferativa de células T durante a infecção. De forma semelhante, Pinge-Filho *et al.*, 1999 <sup>(81)</sup>, demonstraram que grandes quantidades de PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  e NO são produzidas durante a infecção por *T. cruzi* e que esses mediadores participam de um circuito que controla as respostas de linfoproliferação e de citocinas à infecção por esse microorganismo. Assim, o TNF- $\alpha$  estimula a síntese de PGE<sub>2</sub>, e o NO inibe a síntese de TNF- $\alpha$ . A inibição combinada de PGE<sub>2</sub> e do NO restaura a capacidade proliferativa das células em resposta a ConA. Da mesma forma, o tratamento durante a infecção com melatonina e meloxicam inibem a produção de PGs e NO com conseqüente aumento da resposta Th<sub>1</sub> e redução da parasitemia <sup>(82)</sup>. Barros-Mazon *et al.*, 2004 <sup>(83)</sup>, demonstraram que existe uma regulação diferenciada da resposta linfoproliferativa a antígenos do *T. cruzi* em pacientes com a forma cardíaca ou indeterminada da doença de Chagas. A IL-10 está envolvida na

supressão da resposta em pacientes com a forma cardíaca, enquanto que as PGs regulam a linfoproliferação de células tanto de pacientes com forma cardíaca, como indeterminada da doença.

### 1.3. Leucotrienos (LTs)

Os LTs assim como as PGs também são moléculas derivadas do AA, porém por ação das enzimas lipoxigenases 5 (LO-5), 12 (LO-12) e 15 (LO-15) em conjunto com uma proteína auxiliadora, a *5-LO-activating protein* (FLAP), sendo que a LO-5 é responsável pela síntese de LTB<sub>4</sub> e a LO-12 e LO-15 são responsáveis pela síntese de lipoxinas A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>)<sup>(9)</sup>. Esses metabólitos são formados a partir de um hidroperóxido (5-HPETE) o qual é transformado em leucotrieno A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>). Este, por sua vez, é instável e pode sofrer hidrólise enzimática gerando leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) ou então receber um resíduo de glutatona gerando o leucotrieno C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>). A retirada enzimática do ácido glutâmico do LTC<sub>4</sub> dá origem ao leucotrieno D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>) e com a retirada da glicina do LTD<sub>4</sub> forma-se o leucotrieno E<sub>4</sub> (LTE<sub>4</sub>)<sup>(84)</sup>. Eles estão divididos em duas classes: o LTB<sub>4</sub> que é o mais potente mediador quimioatraente e o cisteinil-leucotrieno (Cys-LT) LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub> que são poderosos agentes espasmogênicos<sup>(85)</sup>. Para exercer as suas funções biológicas esses mediadores lipídicos ligam-se à receptores específicos: BLT1 e BLT2, e CysLT1 e CysLT2, respectivamente<sup>(86, 87, 88, 89)</sup>. Essa ligação é mediada pela proteína G<sup>(90, 91)</sup>.

Diferentemente das PGs, os LTs são predominantemente sintetizados em leucócitos, principalmente em granulócitos, monócitos/macrófagos, mastócitos e DCs<sup>(92)</sup>. Os mastócitos e os eosinófilos sintetizam principalmente cysLTs, e os neutrófilos, os macrófagos e as DCs secretam LTB<sub>4</sub><sup>(93)</sup>. Os LTs foram identificados inicialmente como potentes agentes estimuladores da quimiotaxia e adesão de leucócitos às células endoteliais, com consequente aumento da migração de neutrófilos<sup>(94, 95, 96, 97, 98, 99, 100)</sup>. No entanto, várias outras funções moduladoras tanto sobre a resposta imune inata, quanto sobre a adaptativa tem sido atribuída a esses mediadores nos últimos anos<sup>(101)</sup>. Nesse sentido, os neutrófilos, os monócitos e os macrófagos produzem LTs, ao mesmo tempo em que respondem a esses mediadores. O LTB<sub>4</sub> induz o recrutamento de macrófagos e monócitos<sup>(102)</sup>, produção de TNF-α<sup>(103)</sup> e redução de MCP-1 por monócitos<sup>(104)</sup>. Da mesma forma o LTC<sub>4</sub> e LTD<sub>4</sub> induzem a liberação de MCP-1 e seu receptor, o CCR2B<sup>(105)</sup>, de TNF-α e metaloproteinase<sup>(106)</sup> por essas células, resultados

que reforçam o papel desses leucotrienos nas funções de monócitos e macrófagos no processo inflamatório.

Outros numerosos estudos com modelos *in vitro* e *in vivo*, têm revelado o importante papel desses mediadores no aumento da fagocitose por monócitos/macrófagos <sup>(107, 108, 109)</sup> e neutrófilos <sup>(110)</sup>. Além da fagocitose, esses mediadores aumentam a capacidade microbicida dessas células contra vários microrganismos <sup>(111, 112, 113 114, 115, 116)</sup>. Esse efeito dos LTs está associado a sua capacidade de estimular os mecanismos efetores das células fagocíticas, como o metabolismo oxidativo. Nesse sentido, esse mediador promove a geração de NO por neutrófilos <sup>(117, 118)</sup> e macrófagos humanos <sup>(119)</sup> e dos metabólitos do oxigênio em neutrófilos <sup>(120, 121)</sup>. Estimula ainda a liberação de enzimas lisossomais <sup>(122, 123)</sup> e de peptídeos antimicrobianos por neutrófilos, como as  $\alpha$ -defensinas <sup>(124, 125, 126)</sup> e as catelicidinas <sup>(125, 127)</sup>.

As DCs também produzem e respondem aos leucotrienos <sup>(128)</sup>. O LTB<sub>4</sub> promove a migração das DCs maduras e imaturas aos sítios inflamatórios e aumenta a função e expressão do receptor para quimiocina CCR7, envolvido no acúmulo e organização dessas células e das células T nos linfonodos <sup>(129)</sup>. O LTB<sub>4</sub> também está envolvido na indução de IL-12 pelas DCs, mostrando o importante papel desse mediador na instrução de uma resposta do tipo Th<sub>1</sub> <sup>(130)</sup>. Além do LTB<sub>4</sub>, os CYsLTs tem uma importante participação na circulação de DCs para o sítios de encontro com o antígeno, assim como para os linfonodos <sup>(131, 132)</sup>.

No que se refere à resposta imune adaptativa, o LTB<sub>4</sub> especificamente, é um importante mediador para o recrutamento de linfócitos T efetores dos órgãos linfóides para os tecidos periféricos <sup>(89,134)</sup>. Adicionalmente, modula a ativação e adesão de células B por aumentar a expressão de CD23 e CD54, respectivamente <sup>(135)</sup>.

Os estudos citados acima, mostrando as ações estimuladoras dos LTs sobre a resposta imune, associados aos achados que vários microrganismos induzem a produção de LTs, chamam a atenção para o papel desses mediadores na proteção contra as diversas infecções <sup>(85, 136)</sup>.

Neste contexto, trabalhos pioneiros mostraram que LTB<sub>4</sub> adicionado a cultura de macrófagos murinos peritoneais aumentou a capacidade dessas células fagocitarem e

destruírem *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa* <sup>(112)</sup>. Outros estudos demonstraram um aumento na produção de LTs por macrófagos de camundongos infectados por *Klebsiella pneumonia*. Esse aumento esteve associado ao aumento da fagocitose, atividade microbicida e ativação da enzima NADPH oxidase <sup>(114, 111, 136)</sup>.

Coffey *et al.*, 2004 <sup>(117)</sup>, observaram que a síntese de LT endógeno por PMNs após a fagocitose de *Mycobacterium bovis* tem um importante papel na capacidade bactericida destas células. Em relação aos vírus, Chen *et al.*, 2001 <sup>(137)</sup>, mostraram que os LTs desempenham um importante papel na proteção contra a encefalite causada pelo vírus da estomatite vesicular e na inibição da reativação do citomegalovírus após transplantes de medula <sup>(138)</sup>. Esse mediador também é importante na defesa contra o vírus da AIDs, pois pacientes com baixos níveis de CD4 apresentam uma expressão diminuída de 5-LO e FLAP <sup>(139)</sup>. Adicionalmente a administração de LTB<sub>4</sub> a pacientes induziu aumento de dois peptídeos anti-HIV importantes como as  $\alpha$ -defensinas e a (MIP)-1 beta (macrophage inflammatory protein), que evita a entrada do HIV e/ou inibe a sua replicação <sup>(124)</sup>.

O papel protetor dos leucotrienos foi identificado também em infecções por protozoários e helmintos e envolve a ação desses mediadores sobre a resposta imune inata e adaptativa que inclui o aumento da atividade microbicida de macrófagos, a indução da quimiotaxia de células CD4 e da produção de citocinas de perfil Th<sub>1</sub> como o IFN- $\gamma$ . No caso da infecção por helmintos, os LTs são produzidos por eosinófilos e mastócitos e especificamente os CysLTs contribuem para a expulsão desses microrganismos aumentando a produção de muco, contração da musculatura lisa intestinal e aumento da permeabilidade das células endoteliais. O LTB<sub>4</sub> induz quimiotaxia de células CD4 e regula a produção de IL-5 por essas células, assim como recruta e ativa eosinófilos, importantes na destruição dos helmintos <sup>(140)</sup>.

Os primeiros trabalhos sobre o papel dos LTs na infecção por protozoários foram realizados com *Leishmania* e mostraram que células esplênicas e macrófagos de camundongos infectados produzem LTC<sub>4</sub> *in vitro* <sup>(141, 142)</sup>. Camundongos resistentes à *Leishmania amazonensis* produzem maiores níveis de LTB<sub>4</sub> quando comparados à cultura de células dos animais suscetíveis que produzem níveis baixos desse mediador. Adicionalmente, maiores níveis de leucotrienos nos camundongos resistentes estiveram associados a maior produção de NO e atividade leishmanicida de macrófagos <sup>(143)</sup>. No

caso da toxoplasmose, os primeiros estudos mostraram que macrófagos peritoneais infectados *in vitro* com taquizoítos de *Toxoplasma gondii* liberam concentrações substanciais de LTC<sub>4</sub> e D<sub>4</sub><sup>(144)</sup>. Por outro lado, macrófagos de camundongos resistentes não liberam LTs após a fagocitose de *T. gondii*<sup>(145)</sup>. Outros estudos com macrófagos humanos mostraram que o toxoplasma inibe a produção de LTB<sub>4</sub> por essas células. Essa inibição representa um mecanismo de escape do parasita demonstrando o importante papel desempenhado por esse mediador na atividade anti-toxoplasma induzida pelo IFN- $\gamma$ <sup>(113)</sup>. Os leucotrienos também exercem um importante papel protetor na infecção pelo *T. cruzi*. O LTB<sub>4</sub> e O LTC<sub>4</sub> aumentam a atividade fagocítica e microbicida de macrófagos incubados com as formas tripomastigotas do protozoário<sup>(109, 110)</sup>. Talvani *et al.*, 2002<sup>(116)</sup>, descreveram que a adição de LTs nas culturas de macrófagos peritoneais murinos, induzem produção de NO, aumento da síntese de TNF- $\alpha$  e da atividade microbicida contra o *T. cruzi*. Outros estudos mostraram que apesar dos LTS desempenharem um papel não protetor durante a infecção chagásica participando do stress oxidativo dos eritrócitos mediado por NO, podem desempenhar ao mesmo tempo um papel protetor participando do controle do parasitismo cardíaco durante a fase aguda da infecção<sup>(146)</sup>. Estudos mais recentes tem confirmado o papel dos LTs no controle da parasitemia, mediado por NO durante a infecção<sup>(147)</sup>.

Em relação aos helmintos, trabalhos têm mostrado que o LTC<sub>4</sub> e LTB<sub>4</sub> liberados por mastócitos intestinais participam de uma resposta protetora contra *Trichinella spiralis*, induzindo rápida expulsão desse helminto, provavelmente devido aos efeitos do LTC<sub>4</sub> aumentando a contração de musculatura lisa, permeabilidade vascular, secreção de muco, e do LTB<sub>4</sub> no recrutamento e ativação de células inflamatórias<sup>(148)</sup>. Nas infecções por *Strongilóides venezuelensis*, o LTB<sub>4</sub> está envolvido no aumento da produção de IgE e IL-5 e o conseqüente controle da carga parasitária<sup>(149)</sup>. Os LTs ainda tem um importante papel na inflamação eosinofílica durante a infecção por *Toxocara canis*, por induzirem o recrutamento de leucócitos e modularem a expressão de moléculas de adesão<sup>(150)</sup>. O LTB<sub>4</sub> aumenta a destruição mediada pelo sistema complemento da larva de *S. mansoni* por neutrófilos e eosinófilos<sup>(151)</sup>.

No que se refere à infecções fúngicas, os estudos sobre o papel dos leucotrienos tem sido realizados principalmente na histoplasmose<sup>(152, 11, 153, 154, 155, 156)</sup>. Nesse sentido, trabalhos iniciais mostraram que os leucotrienos estão envolvidos no

recrutamento de leucócitos induzidos pelo *Histoplasma* ou componentes de sua parede<sup>(152)</sup>. Adicionalmente, mostraram que a administração de MK886, um inibidor da síntese de leucotrieno, induz alto índice de mortalidade em camundongos infectados, ao mesmo tempo em que diminui a síntese de IL-2, IL-5 e IL-12 e IFN- $\gamma$ <sup>(11)</sup>. Outros estudos mostraram que a proteção de camundongos imunizados com antígenos de *Histoplasma* esteve associada com aumento na produção de LTB<sub>4</sub> e IFN- $\gamma$ , assim como recrutamento de células T de memória no pulmão<sup>(153)</sup>. Estudos recentes mostraram que animais nocautes para a lipoxigenase apresentam maior carga fúngica no pulmão, diminuição na capacidade fagocítica dos macrófagos, da produção de NO e na geração e recrutamento de células T efectoras ao pulmão<sup>(156)</sup>. O papel dos LTs também tem sido estudado nas infecções por *Cândida*. Estudos iniciais mostraram que o fungo estimula macrófagos a liberarem LTB<sub>4</sub> e LTD<sub>4</sub> via seus componentes de parede como a beta-glucana e a alfa-manana<sup>(157)</sup>. Trabalhos mais recentes mostraram que LTB<sub>4</sub> e CysLTs liberados por macrófagos alveolares em resposta *Cândida albicans*, estão envolvidos no aumento da fagocitose e destruição do fungo por essas células, por um mecanismo que envolve ativação da enzima NADPH oxidase. Adicionalmente, os resultados mostraram que o LTB<sub>4</sub> aumenta a fagocitose mediada pelos receptores de manose e o dectina-1, enquanto que o LTD<sub>4</sub> é necessário para que ocorra uma ótima resposta via dectina-1<sup>(158)</sup>.

#### 1.4. Eicosanóides e paracoccidioidomicose

Os trabalhos avaliando os efeitos moduladores dos eicosanóides na PCM são bastante escassos. Estudos pioneiros foram realizados em relação ao efeito das PGs. Os resultados mostraram que durante a infecção experimental pelo fungo ocorre uma grande liberação de PGE<sub>2</sub> que medeia à imunossupressão em fases precoces da infecção por um mecanismo dependente de IL-4 e IL-10<sup>(159)</sup>. Com relação aos efeitos dos LTs na PCM, um trabalho demonstrou que a infecção *in vitro* ou *in vivo* com o *P. brasiliensis* induz a produção de LTs. Nesse estudo, camundongos susceptíveis (B10.A) apresentam maiores níveis de LTs nos pulmões bem como aumento da infecção, quando comparados com os animais resistentes. Além disso, foi avaliado o efeito do inibidor de LTs (MK-0591) na infecção *in vitro* e *in vivo* com o *P. brasiliensis*. O tratamento de macrófagos alveolares com MK-0591 reduziu significativamente a recuperação de células leveduriformes do fungo. Por outro lado, o tratamento *in vivo* dos animais com MK-0591 não alterou a severidade da PCM pulmonar. Assim, os autores sugerem que

os LTs atuam na resposta de macrófagos após a interação com o fungo, como importante modulador da resposta destas células em murinos <sup>(160)</sup>.

Nos últimos anos, estudos em nosso laboratório têm avaliado o papel modulador desses eicosanóides sobre as atividades antifúngicas de monócitos humanos. Os resultados mostraram que o *P. brasiliensis* induz monócitos humanos a produzirem PGs que inibem a atividade fungicida dessas células. O mecanismo de ação das PGs envolve diminuição da produção de TNF- $\alpha$  pelas células, com consequente redução dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o metabólito envolvido na destruição do fungo por monócitos humanos. Esse efeito inibidor das PGs pode ser revertido pela pré-ativação das células com IFN- $\gamma$  e principalmente TNF- $\alpha$  e GM-CSF. Essas citocinas induziriam as células a produzir mais TNF- $\alpha$  e consequentemente mais H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> <sup>(161, 162, 163)</sup> compensando a inibição desses fatores pelas PGs. Além das PGs, estudos preliminares em nosso laboratório, mostraram que o fungo induz a produção de LTs que, ao contrário das PGs, modulam positivamente a atividade fungicida de monócitos humanos <sup>(164)</sup>. Esses estudos demonstraram de forma clara a capacidade do *P. brasiliensis* de induzir a produção de eicosanóides por monócitos humanos, que de uma forma autócrina modulam a função dessas células. No entanto, os estudos devem ser aprofundados no sentido de avaliar o papel modulador desses mediadores sobre a resposta de outras células importantes para o desenvolvimento da resposta imune contra o fungo. Nesse sentido, as células dendríticas merecem ser avaliadas, pelo seu importante papel no reconhecimento inicial de patógenos e na indução de uma resposta adaptativa no hospedeiro.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Harizi H, Gualde N.** 2005. The impact of eicosanoids on the crosstalk between innate and adaptive immunity: the key roles of dendritic cells. *Tissue Antigens*. **65**:507-514.
2. **Calder, P.** 2007. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids*. **77**:327-35.
3. **Peters-Golden M, Henderson WR Jr.** Leukotrienes. 2007. *N. Engl. J. Med.* **357**:1841-54. Review.
4. **Wanten GJ, Calder PC.** 2007. Immune modulation by parenteral lipid emulsions. *Am. J. Clin. Nutr.* **85**:1171-84.
5. **Andrade PMM, Carmo MGT.** 2006. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanóides, inflamação e imunidade. *Ver. Mn-Metabólica*. **8**:135-43.
6. **Calder PC, Albers R, Antoine JM, Blum S, Bourdet-Sicard R, Ferns GA, Folkerts G, Friedmann PS, Frost GS, Guarner F, Løvik M, Macfarlane S, Meyer PD, M'Rabet L, Serafini M, van Eden W, van Loo J, Vas Dias W, Vidry S, Winklhofer-Roob BM, Zhao J.** 2009. Inflammatory Disease Processes and Interactions with Nutrition. *Br. J. Nutr.* **101**:S1-S45.
7. **Calder, P.** 2006. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* **83**:1505S-19S.
8. **Funk CD.** 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*. **294**:1871-5.
9. **Haeggstrom JZ, Funk CD.** 2011. Lipoxygenase and Leukotriene Pathways: Biochemistry, Biology, and Roles in Disease. *Chem. Rev.* **111**:5866-5898.
10. **Smith WL, Dewitt DL.** 1996. Prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and 2. *Adv. Immunol.* **62**:167-215.
11. **Medeiros AI, Sá-Nunes A, Soares EG, Peres CM, Silva CL, Faccioli LH.** 2004. Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. *Infect. Immun.* **72**:1637-44.
12. **Phipps RP, Stein SH, Roper RL.** 1991. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunol. Today*. **12**: 349-52.
13. **Juzan M, Hostein I, Gualde N.** 1992. Role of thymus-eicosanoids in the immune response. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. **46**:247-55.
14. **Akarasereenont P, Bakhle YS, Thiemermann C, Vane JR.** 1995. Cytokine-mediated induction of cyclo-oxygenase-2 by activation of tyrosine kinase in bovine endothelial cells stimulated by bacterial lipopolysaccharide. *Br. J. Pharmacol.* **115**:401-8.
15. **Akarasereenont P, Hide E, Ney P, Thiemermann C, Vane JR.** 1995. The induction of cyclooxygenase-2 elicited by endotoxin in endothelial cells and macrophages is inhibited by prostaglandin E1 and 13,14-dihydro prostaglandin E1. *Agents Actions Suppl.* **45**:59-64.
16. **Hirata T, Narumiya S.** 2011. Prostanoid receptors. *Chem. Rev.* **111**:6209-6230.

17. **Hirata T, Kakizuka A, Ushikubi F, Fuse I, Okuma M, Narumiya S.** 1994. Arg60 to Leu mutation of the human thromboxane A<sub>2</sub> receptor in a dominantly inherited bleeding disorder. *J. Clin. Invest.* **94**:1662-1667.
18. **Mitsui T, Yokoyama S, Shimizu Y, Katsuura M, Akiba K, Hayasaka K.** 1997. Defective signal transduction through the thromboxane A<sub>2</sub> receptor in a patient with a mild bleeding disorder: Deficiency of the inositol 1,4,5-triphosphate formation despite normal G-protein activation. *Thromb. Haemost.* **77**:991-995.
19. **Capra V, Habib A, Accomazzo MR, Ravasi S, Citro S, Levy-Toledano S, Nicosia S, Rovati GE.** 2003. Thromboxane prostanoid receptor in human airway smooth muscle cells: A relevant role in proliferation. *Eur. J. Pharmacol.* **474**:149–159.
20. **Thomas DW, Rocha PN, Nataraj C, Robinson LA, Spurney RF, Koller BH, Coffman TM.** 2003. Proinflammatory actions of thromboxane receptors to enhance cellular immune responses. *J. Immunol.* **171**:6389-6395.
21. **Kabashima K, Murata T, Tanaka H, Matsuoka T, Sakata D, Yoshida N, Katagiri K, Kinashi T, Tanaka T, Miyasaka M, Nagai H, Ushikubi F, Narumiya S.** 2003. Thromboxane A<sub>2</sub> modulates interaction of dendritic cells and T cells and regulates acquired immunity. *Nat. Immunol.* **4**: 694-701.
22. **Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP.** 2002. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol.* **23**:144-150.
23. **Smith RJ.** 1977. Modulation of phagocytosis by and lysosomal enzyme secretion from guinea-pig neutrophils: effect of nonsteroid anti-inflammatory agents and prostaglandins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **200**:647-57.
24. **Aronoff DM, Canetti C, Peters-Golden M.** 2004. Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. *J. Immunol.* **173**:559-65.
25. **Canetti C, Serezani CH, Atrasz RG, White ES, Aronoff DM, Peters-Golden M.** 2007. Activation of phosphatase and tensin homolog on chromosome 10 mediates the inhibition of Fcγ<sub>3</sub> phagocytosis by prostaglandin E<sub>2</sub> in alveolar macrophages. *J. Immunol.* **179**:8350-6.
26. **Ballinger MN, Aronoff DM, McMillan TR, Cooke KR, Olkiewicz K, Toews GB, Peters-Golden M, Moore BB.** 2006. Critical role of prostaglandin E<sub>2</sub> overproduction in impaired pulmonary host response following bone marrow transplantation. *J. Immunol.* **177**:5499-508.
27. **Serezani CH, Chung J, Ballinger MN, Moore BB, Aronoff DM, Peters-Golden M.** 2007. Prostaglandin E<sub>2</sub> suppresses bacterial killing in alveolar macrophages by inhibiting NADPH oxidase. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **37**:562-70.
28. **Bankhurst AD.** 1982. The modulation of human natural killer cell activity by prostaglandins. *J. Clin. Lab. Immunol.* **7**:85-91.

29. **Goto T, Herberman RB, Maluish A, Strong DM.** 1983. Cyclic AMP as a mediator of prostaglandin E<sub>2</sub>-induced suppression of human natural killer cell activity. *J. Immunol.* **130**:1350-5.
30. **Walker W, Rotondo D.** 2004. Prostaglandin E<sub>2</sub> is a potent regulator of interleukin-12- and interleukin-18-induced natural killer cell interferon- $\gamma$  synthesis. *Immunology.* **111**:298–305.
31. **Joshi P C, Zhou X., Cuchens M, Jones Q.** 2001. Prostaglandin E<sub>2</sub> suppressed IL-15-mediated human NK cell function through down-regulation of common gamma-chain. *J. Immunol.* **166**:885-91.
32. **Mailliard RB, Alber SM, Shen H, Watkins SC, Kirkwood JM, Herberman RB, Kalinski P.** 2005. IL-18-induced CD83<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> NK helper cells. *J. Exp. Med.* **202**: 941–953.
33. **Jonuleit H, Kühn U, Müller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk AH.** 1997. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur. J. Immunol.* **12**:3135-42.
34. **Rieser C, Bock G, Klocker H, Bartsch G, Thurnher M.** 1997. Prostaglandin E<sub>2</sub> and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells. Synergistic activation of interleukin 12 production. *J. Exp. Med.* **186**:1603-8.
35. **Kalinski P, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Kapsenberg ML.** 1998. Prostaglandin E<sub>2</sub> induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a<sup>+</sup>CD83<sup>+</sup> dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J. Immunol.* **161**: 2804–2809.
36. **Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML.** 1999. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol. Today.* **20**: 561–567.
37. **Gustafsson K, Ingelsten M, Bergqvist L, Nyström J, Andersson B, Karlsson-Parra A.** 2008. Recruitment and activation of natural killer cells in vitro by a human dendritic cell vaccine. *Cancer Res.* **68**:5965–5971.
38. **Walker C, Kristensen F, Bettens F, deWeck AL.** 1983. Lymphokine regulation of activated (G1) lymphocytes, I: Prostaglandin E<sub>2</sub>-induced inhibition of interleukin 2 production. *J. Immunol.* **130**:1770-1773.
39. **Rincón MA, Tugores A, López-Rivas A, Silva M, Alonso M, De Landázuri O, López-Botet M.** 1988. Prostaglandin E<sub>2</sub> and the increase of intracellular cAMP inhibit the expression of interleukin 2 receptors in human T cells. *Eur. J. Immunol.* **18**: 1791–1796.
40. **Kolenko V, Rayman P, Roy B, Cathcart MK., O'Shea J, Tubbs R, Rybicki L, Bukowski R, Finke J.** 1999. Downregulation of JAK3 protein levels in T lymphocytes by prostaglandin E<sub>2</sub> and other cyclic adenosine monophosphate-elevating agents: impact on interleukin-2 receptor signaling pathway. *Blood.* **93**: 2308–2318.
41. **Wu CY, Wang K, McDyer JF, Seder RA.** 1998. Prostaglandin E<sub>2</sub> and dexamethasone inhibit IL-12 receptor expression and IL-12 responsiveness. *J. Immunol.* **161**:2723–2730.

42. **Betz M, Fox BS.** 1991. Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits production of Th<sub>1</sub> lymphokines but not of Th<sub>2</sub> lymphokines. *J. Immunol.* **146**:108–113.
43. **Snijdwint FG, Kaliński P, Wierenga EA, Bos JD, Kapsenberg ML.** 1993. Prostaglandin E<sub>2</sub> differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. *J. Immunol.* **150**: 5321–5329.
44. **Sheibanie AF, Yen JH, Khayrullina T, Emig F, Zhang M, Tuma R, Ganea D.** 2007. The proinflammatory effect of prostaglandin E<sub>2</sub> in experimental inflammatory bowel disease is mediated through the IL-23→IL-17 axis. *J. Immunol.* **178**:8138–8147.
45. **Khayrullina T, Yen JH, Jing H, Ganea D.** 2008. In vitro differentiation of dendritic cells in the presence of prostaglandin E<sub>2</sub> alters the IL-12/IL-23 balance and promotes differentiation of Th17 cells. *J. Immunol.* **181**: 721–735.
46. **Woolard MD, Hensley LL, Kawula TH, Frelinger JA.** 2008. Respiratory *Francisella tularensis* live vaccine strain infection induces Th<sub>17</sub> cells and prostaglandin E<sub>2</sub>, which inhibits generation of  $\gamma$  interferon-positive T cells. *Infect. Immun.* **76**:2651–2659.
47. **Boniface K, Bak-Jensen KS, Li Y, Blumenschein WM, McGeachy MJ, McClanahan TK, McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ, de Waal Malefyt R.** 2009. Prostaglandin E<sub>2</sub> regulates Th<sub>17</sub> cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. *J. Exp. Med.* **206**:535–548.
48. **Esaki Y, Li Y, Sakata D, Yao C, Segi-Nishida E, Matsuoka T, Fukuda K, Narumiya S.** 2010. Dual roles of PGE<sub>2</sub>-EP4 signaling in mouse experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**:12233–12238.
49. **Watchmaker PB, Berk E, Muthuswamy R, Mailliard RB, Urban JA, Kirkwood JM, Kalinski P.** 2010. Independent regulation of chemokine responsiveness and cytolytic function versus CD8<sup>+</sup> T cell expansion by dendritic cells. *J. Immunol.* **184**:591–597.
50. **Hale AH, Evans DL, Daniel LW.** 1982. Effect of prostaglandins on elicitation of anti-viral-cytolytic activity. *Immunol. Lett.* **4**:171-174.
51. **Plaut M, Marone G, Gillespie E.** 1983. The role of cyclic AMP in modulating cytotoxic T lymphocytes, II: Sequential changes during culture in responsiveness of cytotoxic lymphocytes to cyclic AMP-active agents. *J. Immunol.* **131**: 2945–2952.
52. **Valitutti S, Dessing M, Lanzavecchia A.** 1993. Role of cAMP in regulating cytotoxic T lymphocyte adhesion and motility. *Eur. J. Immunol.* **23**:790–795.
53. **Specht C, Bexten S, Kölsch E, Pauels HG.** 2001. Prostaglandins, but not tumor-derived IL-10, shut down concomitant tumor-specific CTL responses during murine plasmacytoma progression. *Int. J. Cancer.* **91**:705-712.
54. **Ganapathy V, Gurlo T, Jarstamarken HO, Von Grafenstein H.** 2000. Regulator of TCR induced IFN- $\gamma$  release from islet-reactive non-obese diabetic CD8<sup>+</sup> T cells by prostaglandin E<sub>2</sub> receptor signaling. *Int Immunol.* **12**:851-60.
55. **Sharma S, Yang SC, Zhu L, Reckamp K, Gardner B, Baratelli F, Huang M, Batra RK, Dubinett SM.** 2005. Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin E<sub>2</sub>-dependent promotion of

FOXP3 expression and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cell activities in lung cancer. *Cancer Res.* **65**:5211–5220.

56. **Bergmann C, Strauss L, Zeidler R, Lang S, Whiteside TL.** 2007. Expansion of human T regulatory type 1 cells in the microenvironment of cyclooxygenase 2 overexpressing head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* **67**:8865–8873.

57. **Soontrapa K, Honda T, Sakata D, Yao C, Hirata T, Hori S, Matsuoka T, Kita Y, Shimizu T, Kabashima K, Narumiya S.** 2011. Prostaglandin E<sub>2</sub>-prostaglandin E receptor subtype 4 (EP4) signaling mediates UV irradiation-induced systemic immunosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**:6668–6673.

58. **Baratelli F, Lin Y, Zhu L, Yang SC, Heuzé-Vourc'h N, Zeng G, Reckamp K, Dohadwala M, Sharma S, Dubinett SM.** 2005. Prostaglandin E<sub>2</sub> induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol.* **175**:1483–1490.

59. **Mahic M, Yaqub S, Johansson CC, Taskén K, Aandahl EM.** 2006. FOXP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> adaptive regulatory T cells express cyclooxygenase-2 and suppress effector T cells by a prostaglandin E<sub>2</sub>-dependent mechanism. *J. Immunol.* **177**: 246–254.

60. **Muthuswamy R, Urban J, Lee JJ, Reinhart TA, Bartlett D, Kalinski, P.** 2008. Ability of mature dendritic cells to interact with regulatory T cells is imprinted during maturation. *Cancer Res.* **68**: 5972–5978.

61. **Banerjee DK, Dhodapkar MV, Matayeva E, Steinman RM, Dhodapkar KM.** 2006. Expansion of FOXP3<sup>high</sup> regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients. *Blood.* **108**:2655–2661.

62. **Sinha P, Clements VK, Fulton AM, Ostrand-Rosenberg S.** 2007. Prostaglandin E<sub>2</sub> promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* **67**:4507-13.

63. **Sinha P, Clements VK, Ostrand-Rosenberg S.** 2005. Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease. *J. Immunol.* **174**:636-45.

64. **Bronte V, Apolloni E, Cabrelle A, Ronca R, Serafini P, Zamboni P, Restifo NP, Zanovello P.** 2000. Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood.* **96**:3838–46.

65. **Liu Y, Van Ginderachter JA, Brys L, De Baetselier P, Raes G, Geldhof AB.** 2003. Nitric oxide-independent CTL suppression during tumor progression: association with arginase-producing (M2) myeloid cells. *J Immunol.* **170**: 5064-74.

66. **Mazzoni A, Bronte V, Visintin A, Spitzer JH, Apolloni E, Serafini P, Zanovello P, Segal DM.** 2002. Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. *J Immunol.* **168**: 689–95.

67. **Suzuki E, Kapoor V, Jassar AS, Kaiser LR, Albelda SM.** 2005. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin. Cancer Res.* **11**:6713–21.

68. **Huang M, Stolina M, Sharma S, Mao JT, Zhu L, Miller PW, Wollman J, Herschman H, Dubinett SM.** 1998. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Res.* **58**:1208-1216.
69. **Stolina M, Sharma S, Lin Y, Dohadwala M, Gardner B, Luo J, Zhu L, Kronenberg M, Miller PW, Portanova J, Lee JC, Dubinett SM.** 2000. Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. *J. Immunol.* **164**:361-370.
70. **Zeidler R, Csanady M, Gires O, Lang S, Schmitt B, Wollenberg B.** 2000. Tumor cell-derived prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits monocyte function by interfering with CCR5 and Mac-1. *FASEB J.* **14**:661-668.
71. **Sadikot RT, Zeng H, Azim AC, Joo M, Dey SK, Breyer RM, Peebles RS, Blackwell TS, Christman JW.** 2007. Bacterial clearance of *Pseudomonas aeruginosa* is enhanced by the inhibition of COX-2. *Eur. J. Immunol.* **37**:1001-9.
72. **Stables MJ, Newson J, Ayoub SS, Brown J, Hyams CJ, Gilroy DW.** 2010. Priming innate immune responses to infection by cyclooxygenase inhibition kills antibiotic-susceptible and -resistant bacteria. *Blood.* **116**:2950-9.
73. **Aronoff DM, Bergin IL, Lewis C, Goel D, O'Brien E, Peters-Golden M, Mancuso P.** 2012. E-prostanoid 2 receptor signaling suppresses lung innate immunity against *Streptococcus pneumoniae*. *Prostaglandins Other Lipid. Mediat.* **98**:23-30.
74. **Edwards CK, Hedegaard HB, Zlotnik A, Gangadharam PR, Johnston RBJr, Pabst MJ.** 1986. Chronic infection due to *Mycobacterium intracellulare* in mice: association with macrophage release of prostaglandin E<sub>2</sub> and reversal by injection of indomethacin, muramyl dipeptide, or interferon-gamma. *J. Immunol.* **136**:1820-7.
75. **Adams LB, Gillis TP, Hwang DH, Krahenbuhl JL.** 1997. Effects of essential fatty acid deficiency on prostaglandin E<sub>2</sub> production and cell-mediated immunity in a mouse model of leprosy. *Infect. Immun.* **65**:1152-7.
76. **Rangel-Moreno J, Estrada-Garcia I, Garcia-Hernandez ML, Aguilar-Leon D, Marquez R, Hernandez-Pando R.** 2002. The role of prostaglandin E<sub>2</sub> in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology.* **106**: 257-66.
77. **Farrell JP, Kirkpatrick CE.** 1987. Experimental cutaneous leishmaniasis. II. A possible role for prostaglandins in exacerbation of disease in *Leishmania major*-infected BALB/c mice. *J. Immunol.* **138**:902-7.
78. **De Freitas LA, Mbow LM, Estay M, Bleyenbergh JA, Titus RG.** 1999. Indomethacin treatment slows disease progression and enhances a Th<sub>1</sub> response in susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *Parasite Immunol.* **21**:273-7.
79. **Bhattacharjee S, Bhattacharjee A, Majumder S, Majumdar SB, Majumdar S.** 2012. Glycyrrhizic acid suppresses Cox-2-mediated anti-inflammatory responses during *Leishmania donovani* infection. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**:1905-14.

80. **Schleifer KW, Mansfield MJ.** 1993. Suppressor macrophages in African trypanosomiasis inhibit T cell proliferative responses by nitric oxide and prostaglandins. *J. Immunol.* **151**:5492-5503.
81. **Pinge-Filho P, Tadakoro CE, Abrahamsohn IA.** 1999. Prostaglandins mediated suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell Immunol.* **193**: 90-98.
82. **Oliveira LG, Kuehn CC, Santos CD, Toldo MP, do Prado JC Jr.** 2010. Enhanced protection by melatonin and meloxicam combination in experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* **32**:245-51.
83. **Barros-Mazon S, Guariento ME, Silva CA, Coffman RL, Abrahamsohn IA.** 2004. Differential regulation of lymphoproliferative responses to *Trypanosoma cruzi* antigen in patients with the cardiac or indeterminate form of Chagas disease. *Clin. Immunol.* **111**:137-145.
84. **Peters-Golden M.** 1998. Molecular mechanisms of leukotriene synthesis: the changing paradigm. *Clin Exp Allergy.* **28**:1059-65.
85. **Peters-Golden M, Coffey M.** 1998b. Role of leukotrienes in antimicrobial defense of the lung. *J. Lab. Clin. Med.* **132**:251-7.
86. **Samuelsson B.** 1983. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science.* **220**:568-75.
87. **Owman C, Nilsson C, Lolait SJ.** 1996. Cloning of cDNA encoding a putative chemoattractant receptor. *Genomics.* **37**: 187-94.
88. **Yokomizo T, Izumi T, Chang K, Takuwa Y, Shimizu T.** 1997. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B<sub>4</sub> that mediates chemotaxis. *Nature.* **387**:620-4.
89. **Heise CE, O'Dowd BF, Figueroa DJ, Sawyer N, Nguyen T, Stocco R, Bellefeuille JN, Abramovitz M, Cheng R, Williams DL Jr, Zeng Z, Liu Q, Ma L, Clements MK, Coulombe N, Liu Y, Austin CP, George SR, O'Neill GP, Metters KM, Lynch KR, Evans JF.** 2000. Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J. Biol. Chem.* **275**:305-31.
90. **Nothacker HP, Wang ZW, Zhu YH, Reinscheid RK, Lin SH, Civelli O.** 2000. Molecular cloning and characterization of a second human cysteinyl leukotriene receptor: discovery of a subtype selective agonist. *Mol. Pharmacol.* **58**: 1601-8.
91. **Tager AM, Luster AD.** 2003. BLT1 and BLT2: the leukotriene B<sub>4</sub> receptors. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* **69**:123-34.
92. **Kanaoka Y, Boyce JA.** 2004. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses. *J. Immunol.* **173**:1503.
93. **Haeggstrom JZ, Wetterholm A.** 2002. Enzymes and receptors in the leukotriene cascade. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**:742-53.
94. **Lewis RA, Austen KF, Soberman RJ.** 1990. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway: biochemistry and relation to pathobiology in human disease. *N. Engl. J. Med.* **323**:645-55.

95. **Ford-Hutchinson A, Bray M, Doig M.** 1980. Leukotriene B<sub>4</sub>, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature*. **286**:264-5.
96. **Bomalaski JS, Dundee D, Brophy L, Clark MA.** 1990. Leukotriene B<sub>4</sub> modulates phospholipid methylation and chemotaxis in human polymorphonuclear leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* **47**:1–12.
97. **Shi ZZ, Han B, Habib GM, Matzuk MM, Lieberman MW.** Disruption of  $\gamma$ -glutamyl leukotrienase results in disruption of leukotriene D<sub>4</sub> synthesis in vivo and attenuation of the acute inflammatory response. *Mol. Cell. Biol.* **21**:5389-95.
98. **Maekawa A, Austen KF, Kanaoka Y.** 2002. Targeted gene disruption reveals the role of cysteinyl leukotriene 1 receptor in the enhanced vascular permeability of mice undergoing acute inflammatory responses. *J. Biol. Chem.* **277**:208-20.
99. **Kim ND, Chou RC, Seung E, Tager AM, Luster AD.** 2006. A unique requirement for the leukotriene B<sub>4</sub> receptor BLT1 for neutrophil recruitment in inflammatory arthritis. *J. Exp. Med.* **203**: 829–835.
100. **Grespan R, Fukada SY, Lemos HP, Vieira SM, Napimoga MH, Teixeira MM, Fraser AR, Liew FY, McInnes IB, Cunha FQ.** 2008. CXCR2-specific chemokines mediate leukotriene B<sub>4</sub>-dependent recruitment of neutrophils to inflamed joints in mice with antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **58**:2030–2040.
101. **Chou RC, Kim ND, Sadik CD, Seung E, Lan Y, Byrne MH, Haribabu B, Iwakura Y, Luster AD.** 2010. Lipid-cytokine-chemokine cascade drives neutrophil recruitment in a murine model of inflammatory arthritis. *Immunity*. **33**:266–278.
102. **Di Gennaro A, Haeggström J. Z.** 2012. The leukotrienes: immune-modulating lipid mediators of disease. *Adv. Immunol.* **116**:51-92.
103. **Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey S, Weng W, Freeman A, Showell HJ.** 2002. Leukotriene B<sub>4</sub> receptor antagonism reduces monocytic foam cells in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**:443-9.
104. **Goldman G, Welbourn R, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D.** 1993. Hechtman HB. Lavage with leukotriene B<sub>4</sub> induces lung generation of tumor necrosis factor- $\alpha$  that in turn mediates neutrophil diapedesis. *Surgery*. **113**:297-303.
105. **Huang L, Zhao A, Wong F, Ayala JM, Struthers M, Ujjainwalla F, Wright SD, Springer MS, Evans J, Cui J.** 2004. Leukotriene B<sub>4</sub> strongly increases monocyte chemoattractant protein-1 in human monocytes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**:1783-8.
106. **Ichiyama T, Hasegawa M, Ueno Y, Makata H, Matsubara T, Furukawa S.** 2005. Cysteinyl leukotrienes induce monocyte chemoattractant protein 1 in human monocytes/macrophages. *Clin Exp Allergy*. **35**:1214-9.
107. **Ichiyama T, Kajimoto M, Hasegawa M, Hashimoto K, Matsubara T, Furukawa S.** 2007. Cysteinyl leukotrienes enhance tumour necrosis factor- $\alpha$ -induced matrix metalloproteinase-9 in human monocytes/macrophages. *Clin Exp Allergy*. **37**:608-14.
108. **Mancuso P, Standiford TJ, Marshall T, Peters-Golden M.** 1998. 5-Lipoxygenase reaction products modulate alveolar macrophage phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* **66**: 5140-6.

109. **Wirth JJ, Kierszenbaum F.** 1985. Effects of leukotriene C<sub>4</sub> on macrophage association with and intracellular fate of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. **15**:1-10.
110. **Wirth JJ, Kierszenbaum F.** 1985. Stimulatory effects of leukotriene B<sub>4</sub> on macrophage association with and intracellular destruction of *Trypanosoma cruzi*. J. Immunol. **134**:1989-93.
111. **Mancuso P, Nana-Sinkam P, Peters-Golden M.** 2001. Leukotriene B<sub>4</sub> augments neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. Infect. Immun. **69**:2011-6.
112. **Demitsu T, Katayama H, Saito-Taki T, Yaoita H, Nakano M.** 1989. Phagocytosis and bactericidal action of mouse peritoneal macrophages treated with leukotriene B<sub>4</sub>. Int. J. Immunopharmacol. **11**:801-8.
113. **Yong EC, Chi EY, Henderson WR.** 1994. *Toxoplasma gondii* alters eicosanoid release by human mononuclear phagocytes: role of leukotrienes in interferon  $\gamma$ -induced antitoxoplasma activity. J. Exp. Med. **180**:1637-48.
114. **Bailie MB, Standiford TJ, Laichalk LL, Coffey MJ, Strieter R, Peters-Golden M.** 1996. Leukotriene-deficient mice manifest enhanced lethality from *Klebsiella pneumoniae* in association with decreased alveolar macrophage phagocytic and bactericidal activities. J. Immunol. **157**:5221-4.
115. **Coffey M, Phare S, George S, Peters-Golden M, Kazanjian P.** 1998. Granulocyte colony-stimulating factor administration to HIV-infected subjects augments reduced leukotriene synthesis and anticryptococcal activity in neutrophils. J. Clin. Invest. **102**:663-70.
116. **Talvani A, Machado FS, Santana GC, Klein A, Barcelos L, Silva JS, Teixeira MM.** 2002. Leukotriene B<sub>4</sub> induces nitric oxide synthesis in infected murine macrophages and mediates resistance to infection. Infect Immun. **70**:4247-53.
117. **Coffey MJ, Phare SM, Peters-Golden M.** 2004. Role of leukotrienes in killing of *Mycobacterium bovis* by neutrophils. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. **71**:185-90.
118. **Schmidt HH, Seifert R, Bohme E.** 1989. Formation and release of nitric oxide from human neutrophils and HL-60 cells induced by a chemotactic peptide, platelet activating factor and leukotriene B<sub>4</sub>. FEBS Lett. **244**:357-60.
119. **Larfars G, Lantoin F, Devynck MA, Palmblad J, Gyllenhammar H.** 1999. Activation of nitric oxide release and oxidative metabolism by leukotrienes B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, and D<sub>4</sub> in human polymorphonuclear leukocytes. Blood. **93**:1399-405.
120. **Hubbard N, Erickson K.** 1995. Role of 5-lipoxygenase metabolites in the activation of peritoneal macrophages for tumoricidal function. Mol. Immunol. **160**:115-22.
121. **Dewald B, Baggiolini M.** 1985. Activation of NADPH oxidase in human neutrophils: synergism between fMLP and the neutrophil products PAF and LTB<sub>4</sub>. Biochem. Biophys. Res. Commun. **128**:297-304.
122. **Serhan CN, Haeggström JZ, Leslie CC.** 1996. Lipid mediator networks in cell signaling: update and impact of cytokines. FASEB J. **10**:1147-58.

123. **Ito N, Yokomizo T, Sasaki T, Kurosu, H, Penninger, J, Kanaho Y, Katada T, Hanaoka K, Shimizu T.** 2002. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase activation and calcium influx for leukotriene B<sub>4</sub>-induced enzyme release. *J. Biol. Chem.* **277**: 44898-904.
124. **Flamand L, Borgeat P, Lalonde R, Gosselin J.** 2004. Release of anti-HIV mediators after administration of leukotriene B<sub>4</sub> to humans. *J. Infect. Dis.* **189**:2001-9.
125. **Flamand L, Tremblay MJ, Borgeat P.** 2007. Leukotriene B<sub>4</sub> triggers the in vitro and in vivo release of potent antimicrobial agents. *J. Immunol.* **178**:8036-45.
126. **Gaudreault E, Gosselin J.** 2008. Leukotriene B<sub>4</sub> induces release of antimicrobial peptides in lungs of virally infected mice. *J. Immunol.* **180**:6211-21.
127. **Wan M, Sabirsh A, Wetterholm A, Agerberth B, Haeggström JZ.** 2007. Leukotriene B<sub>4</sub> triggers release of the cathelicidin LL-37 from human neutrophils: novel lipid-peptide interactions in innate immune responses. *FASEB J.* **21**:2897-905.
128. **Spanbroek R, Hildner M, Steinhilber D, Fusenig N, Yoneda K, Radmark O, Samuelsson B, Habenicht AJ.** 2000. 5-lipoxygenase expression in dendritic cells generated from CD34(+) hematopoietic progenitors and in lymphoid organs. *Blood.* **96**:3857-65.
129. **Del Prete A, Shao WH, Mitola S, Santoro G, Sozzani S, Haribabu B.** Regulation of dendritic cell migration and adaptive immune response by leukotriene B<sub>4</sub> receptors: a role for LTB<sub>4</sub> in up-regulation of CCR7 expression and function. 2007. *Blood.* **109**:626-31.
130. **Toda A, Terawaki K, Yamazaki S, Saeki K, Shimizu T, Yokomizo T.** 2010. Attenuated Th<sub>1</sub> induction by dendritic cells from mice deficient in the leukotriene B<sub>4</sub> receptor 1. *Biochimie.* **92**:682-91.
131. **Robbiani DF, Finch RA, Jager D, Muller WA, Sartorelli AC, Randolph GJ.** 2000. The leukotriene C<sub>4</sub> transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3 $\beta$ , ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes. *Cell.* **103**:757–768.
132. **Parameswaran K, Liang H, Fanat A, Watson R, Snider DP, O’byrne PM.** 2004. Role for cysteinyl leukotrienes in allergen-induced change in circulating dendritic cell number in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **114**:73-9.
133. **Goodarzi K, Goodarzi M, Tager AM, Luster AD, von Andrian UH.** 2003. Leukotriene B<sub>4</sub> and BLT1 control cytotoxic effector T cell recruitment to inflamed tissues. *Nat. Immunol.* **4**:965–73.
134. **Runarsson G, Liu A, Mahshid Y, Feltenmark S, Pettersson A, Klein E, Björkholm M, Claesson HE.** 2005. Leukotriene B<sub>4</sub> plays a pivotal role in CD40-dependent activation of chronic B lymphocytic leukemia cells. *Blood.* **105**:1274-9.
135. **Peters-Golden M, Canetti C, Mancuso P, Coffey MJ.** 2005. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. *J. Immunol.* **174**: 589-594.

136. **Serezani CH, Aronoff DM, Jancar S, Mancuso P, Peters-Golden M.** 2005. Leukotrienes enhance the bactericidal activity of alveolar macrophages against *Klebsiella pneumoniae* through the activation of NADPH oxidase. *Blood*. **106**:1067-75.
137. **Chen N, Restivo A, Reiss CS.** 2001. Leukotrienes play protective roles early during experimental VSV encephalitis. *J. Neuroimmunol.* **120**:94-102.
138. **Gosselin J, Borgeat P, Flamand L.** 2005. Leukotriene B<sub>4</sub> protects latently infected mice against murine cytomegalovirus reactivation following allogeneic transplantation. *J. Immunol.* **174**:1587-93.
139. **Coffey MJ, Phare SM, Kazanjian PH, Peters-Golden M.** 1996. 5-Lipoxygenase metabolism in alveolar macrophages from subjects infected with the human immunodeficiency virus. *J. Immunol.* **157**:393-9.
140. **Rogerio AP, Anibal FF.** 2012. Role of leukotrienes on protozoan and helminth infections. *Mediators Inflamm.* **2012**:595-694. Review.
141. **Reiner NE, Malemud CJ.** 1984. Arachidonic acid metabolism in murine leishmaniasis (Donovani): ex-vivo evidence for increased cyclooxygenase and 5-lipoxygenase activity in spleen cells. *Cell Immunol.* **88**:501-10.
142. **Reiner NE, Malemud CJ.** 1985. Arachidonic acid metabolism by murine peritoneal macrophages infected with *Leishmania donovani*: in vitro evidence for parasite-induced alterations in cyclooxygenase and lipoxygenase pathways. *J. Immunol.* **134**:556-63.
143. **Serezani CH, Perrela JH, Russo M, Peters-Golden M, Jancar S.** 2006. Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. *J. Immunol.* **177**:3201-8.
144. **Thardin JF, M'Rini C, Beraud M, Vandaele J, Frisach MF, Bessieres MH, Seguela JP, Pipy B.** 1993. Eicosanoid production by mouse peritoneal macrophages during *Toxoplasma gondii* penetration: role of parasite and host cell phospholipases. *Infect Immun.* **61**:1432-41.
145. **Locksley RM, Fankhauser J, Henderson WR.** 1985. Alteration of leukotriene release by macrophages ingesting *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **82**:6922-6.
146. **Borges CL, Cecchini R, Tatakihara VL, Malvezi AD, Yamada-Ogatta SF, Rizzo LV, Pinge-Filho P.** 2009. 5-Lipoxygenase plays a role in the control of parasite burden and contributes to oxidative damage of erythrocytes in murine Chagas' disease. *Immunol Lett.* **123**:38-45.
147. **Panis C, Mazzuco TL, Costa CZ, Victorino VJ, Tatakihara VL, Yamauchi LM, Yamada-Ogatta SF, Cecchini R, Rizzo LV, Pinge-Filho P.** 2011. *Trypanosoma cruzi*: effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. *Exp. Parasitol.* **127**:58-65.
148. **Moqbel R, Wakelin D, MacDonald AJ, King SJ, Grecis RK, Kay AB.** 1987. Release of leukotrienes during rapid expulsion of *Trichinella spiralis* from immune rats. *Immunology.* **60**:425-30.

149. **Machado ER, Ueta MT, Lourenço EV, Anibal FF, Sorgi CA, Soares EG, Roque-Barreira MC, Medeiros AI, Faccioli LH.** 2005. Leukotrienes play a role in the control of parasite burden in murine strongyloidiasis. *J. Immunol.* **175**:3892-9.
150. **Carlos D, Machado ER, De Paula L, Sá-Nunes A, Sorgi CA, Jamur MC, Oliver C, Lima WT, Faccioli LH.** 2011. Evidence for eosinophil recruitment, leukotriene B<sub>4</sub> production and mast cell hyperplasia following *Toxocara canis* infection in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **44**:319-26.
151. **Moqbel R, Sass-Kuhn SP, Goetzl EJ, Kay AB.** 1983. Enhancement of neutrophil- and eosinophil-mediated complement-dependent killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* in vitro by leukotriene B<sub>4</sub>. *Clin. Exp. Immunol.* **52**:519-27.
152. **Medeiros AI, Silva CL, Malheiro A, Maffei CM, Faccioli L H.** 1999. Leukotrienes are involved in leukocyte recruitment induced by live *Histoplasma capsulatum* or by the beta-glucan present in their cell wall. *Br. J. Pharmacol.* **128**:1529-37.
153. **Medeiros AI, Sá-Nunes A, Turato WM, Secatto A, Frantz FG, Sorgi CA, Serezani CH, Deepe GS, Faccioli LH.** 2008. Leukotrienes are potent adjuvant during fungal infection: effects on memory T cells. *J. Immunol.* **181**:8544-51.
154. **Nicolete R, Secatto A, Pereira PA, Soares EG, Faccioli LH.** 2009. Leukotriene B<sub>4</sub>-loaded microspheres as a new approach to enhance antimicrobial responses in *Histoplasma capsulatum*-infected mice. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **34**:365-9.
155. **Dos Santos DF, Bitencourt CS, Gelfuso GM, Pereira PA, De Souza PR, Sorgi CA, Nicolete R, Faccioli LH.** 2011. Biodegradable microspheres containing leukotriene B<sub>4</sub> and cell-free antigens from *Histoplasma capsulatum* activate murine bone marrow-derived macrophages. *Eur. J. Pharm. Sci.* **44**:580-8.
156. **Secatto A, Rodrigues LC, Serezani CH, Ramos SG, Dias-Baruffi M, Faccioli LH, Medeiros AI.** 2012. 5-Lipoxygenase deficiency impairs innate and adaptive immune responses during fungal infection. *PLoS One.* **7**:31701.
157. **Castro M, Ralston NV, Morgenthaler TI, Rohrbach MS, Limper AH.** 1994. *Candida albicans* stimulates arachidonic acid liberation from alveolar macrophages through alpha-mannan and beta-glucan cell wall components. *Infect Immun.* **62**:3138-45.
158. **Morato-Marques M, Campos MR, Kane S, Rangel AP, Lewis C, Ballinger MN, Kim SH, Peters-Golden M, Jancar S, Serezani CH.** 2011. Leukotrienes target F-actin/cofilin-1 to enhance alveolar macrophage anti-fungal activity. *J. Biol. Chem.* **286**:28902-13.
159. **Michelin MA, Figueiredo F, Cunha FQ.** 2002. Involvement of prostaglandins in the immunosuppression occurring during experimental infection by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Exp. Parasitol.* **102**:170-7.
160. **Ribeiro LRR, Calich VLG.** 2005. The role of leukotrienes in pulmonary paracoccidioidomycosis (PCM) and in the fungicidal and secretory ability of peritoneal macrophages infected by *Paracoccidioides brasiliensis*. In: IX International Meeting on Paracoccidioidomycosis. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* **47**:27.

161. **Soares AM, Calvi SA, Peraçoli MT, Fernandes AC, Dias LA, Dos Anjos AR.** 2001. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunology*. **102**:480-5.
162. **Bordon AP, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Calvi SA, Serrão Peraçoli MT, Victoriano De Campos Soares AM.** 2007. Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human monocytes. *Microbes Infect*. **9**:744-7.
163. **Bordon-Graciani AP, Dias-Melicio LA; Acorci-Valério MJ, Araujo JPJR, De Campos Soares AM.** 2012. Inhibitory effect of PGE<sub>2</sub> on the killing of *Paracoccidioides brasiliensis* by human monocytes can be reversed by cellular activation with cytokines. *Med Mycol*. [Epub ahead of print]
164. **Ferrari C, Bordon-Graciani AP, Acorci-Valério MJ, Dias-Melicio LA, Soares A.M.V.C.** 2009. Role of leukotrienes on the human monocyte in fungicidal activity against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Anais XXXIV Congresso Sociedade Brasileira de Imunologia*.



*Capítulo II*  
*Manuscrito*

## **A INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE PGE<sub>2</sub> E LTB<sub>4</sub> PELAS CÉLULAS DENDRÍTICAS INDUZIDA PELO *Paracoccidioides brasiliensis*, ESTÁ ASSOCIADA À NÃO MATURAÇÃO DESSAS CÉLULAS**

**Reginaldo K. Fernandes<sup>a</sup>, Tatiana F. Bachiega<sup>a</sup>, Daniela R. Rodrigues<sup>a</sup>, Marjorie de A. Golim<sup>b</sup>, Luciane A. Dias- Melicio<sup>c</sup>, Helanderson de A. Balderramas<sup>a</sup>, Ramon Kaneno<sup>a</sup>, Ângela M. V. C. Soares<sup>a</sup>**

Departamento de Microbiologia e Imunologia-Instituto de Biociências<sup>a</sup>, Hemocentro-Hospital das Clínicas<sup>b</sup>, Departamento de Patologia-Faculdade de Medicina<sup>c</sup> -Universidade Estadual Paulista-UNESP-Botucatu, SP-Brasil

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da Paracoccidioidomicose, uma micose sistêmica, endêmica na América Latina. As células dendríticas (DCs) desempenham papel crucial na detecção de patógenos, desencadeamento de uma resposta inicial do hospedeiro, assim como na instrução da resposta imune adaptativa. Mediadores liberados pelas DCs, de uma forma autócrina, modulam as suas funções. Entre esses, destacamos as prostaglandinas e leucotrienos. Assim, avaliamos se DCs humanas produzem PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> em resposta ao fungo, a participação de receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRS) nessa produção, assim como o papel modulador desses eicosanóides sobre a maturação fenotípica dessas células e a produção das citocinas IL-6, IL-10, IL-12, IL-23 e TNF- $\alpha$ . DCs humanas imaturas (CD14<sup>+</sup> / CD1a<sup>high</sup> / CD83<sup>low</sup>) obtidas a partir da diferenciação de monócitos cultivados com GM-CSF e IL-4 (7 dias) liberaram substanciais concentrações de PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> que aumentaram significativamente, no caso da PGE<sub>2</sub>, com incubação com LPS durante 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 18h, 24h ou 48h. No entanto, os níveis de PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> foram significativamente inibidos após o desafio com as duas cepas do fungo. Ensaios de bloqueio dos PRRS mostraram que o processo de inibição de PGE<sub>2</sub> envolveu o receptor de manose. Adicionalmente, ensaios de fenotipagem mostraram que após o desafio com o fungo, as DCs não alteraram o seu fenótipo de imaturas para o de células maduras. Assim, detectamos uma clara associação entre inibição da produção de PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> e a incapacidade do fungo em induzir a maturação de DCs. Ensaios utilizando PGE<sub>2</sub> ou LTB<sub>4</sub> exógenos confirmaram essa associação. Estas células ainda produzem altos níveis de IL-6 em resposta ao fungo, que, no entanto, não estiveram associados à inibição da produção dos eicosanóides. Ao contrário, essas DCs não produzem IL-10 em resposta ao fungo, provavelmente devido a inibição da produção de PGE<sub>2</sub>. A inibição desse mediador pode ainda ter sido responsável pela inibição da produção de TNF- $\alpha$ , apesar de termos detectado níveis substanciais dessa citocina em resposta ao fungo.

## INHIBITION OF PGE<sub>2</sub> AND LTB<sub>4</sub> PRODUCTION BY DENDRITIC CELLS INDUCED BY *Paracoccidioides brasiliensis* IS ASSOCIATED WITH THE NON MATURATION OF THESE CELLS

**Reginaldo K. Fernandes<sup>a</sup>, Tatiana F. Bachiega<sup>a</sup>, Daniela R. Rodrigues<sup>a</sup>, Marjorie de A. Golim<sup>b</sup>, Luciane A. Dias- Melicio<sup>c</sup>, Helanderson de A. Balderramas<sup>a</sup>, Ramon Kaneno<sup>a</sup>, Ângela M. V. C. Soares<sup>a</sup>**

Departamento de Microbiologia e Imunologia-Instituto de Biociências<sup>a</sup>, Hemocentro-Hospital das Clínicas<sup>b</sup>, Departamento de Patologia-Faculdade de Medicina<sup>c</sup> -Universidade Estadual Paulista-UNESP-Botucatu, SP-Brasil

The fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is the etiological agent of paracoccidioidomycosis, a systemic mycosis, endemic in Latin America. Dendritic cells (DCs) play a crucial role in the detection of pathogens, triggering an initial response from the host as well as the instruction of the adaptive immune response. Mediators released by DCs, by an autocrine way, modulate their functions. Among these, we highlight the prostaglandins and leukotrienes. We therefore assessed whether human DCs produce PGE<sub>2</sub> and LTB<sub>4</sub> in response to fungus, the participation of recognition receptors of molecular patterns (PRRS) in this production, as well as the modulating role of these eicosanoids on phenotypic maturation of these cells and the production of the cytokines IL-6, IL-10, IL-12, IL-23 e TNF- $\alpha$ . Human immature DCs (CD14<sup>+</sup>/CD1a<sup>high</sup>/CD83<sup>low</sup>) derived from the differentiation of monocytes cultured with GM-CSF and IL-4 (7 days) released substantial concentrations of PGE<sub>2</sub> and LTB<sub>4</sub> which increased significantly in the case of PGE<sub>2</sub>, with incubation with LPS for 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 18h, 24h or 48h. However, the levels of PGE<sub>2</sub> and LTB<sub>4</sub> were significantly inhibited after challenge with two different strains of the fungus. Trials have shown that blockade of PRRS process involved the inhibition of PGE<sub>2</sub> mannose receptor. Additionally, phenotyping assays showed that after challenge with the fungus, DCs did not change their phenotype of immature cells to mature ones. Accordingly, we detected a clear association between inhibition of the production of PGE<sub>2</sub> and LTB<sub>4</sub> fungus and inability to induce maturation of DCs. Assays using exogenous PGE<sub>2</sub> and LTB<sub>4</sub> confirmed this association. These cells also produce high levels of IL-6 in response to fungus, which, however, were not associated with inhibition of the production of eicosanoids. Rather than that, these DCs do not produce IL-10 in response to the fungus, probably due to inhibition of PGE<sub>2</sub> production. Inhibition of mediator may also have been responsible for inhibiting the production of TNF- $\alpha$ , despite having detected substantial levels of this cytokine in response to the fungus.

## 1. INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica que se manifesta endemicamente na América Latina, sendo predominante em países como Brasil, Argentina, Colômbia e Venezuela <sup>(1)</sup>. O agente etiológico dessa micose é o *Paracoccidioides brasiliensis*, um fungo imperfeito e dimórfico, que se apresenta sob a forma de levedura *in vivo* e quando cultivado a 37°C em meios de cultura enriquecidos e, na forma de micélio à temperatura ambiente com variação de 4 a 28°C. O seu dimorfismo é crucial na patogenicidade do fungo, pois se acredita que a fonte primária de infecção seja propágulos micelianos <sup>(2)</sup> presentes no solo e nas plantas que transportados pelo ar penetrariam no hospedeiro pelas vias aéreas, atingindo primeiramente os pulmões, provocando o chamado complexo primário pulmonar. Esse processo pode evoluir para a cura ou tornar-se latente caracterizando a paracoccidioidomicose-infecção, identificada pela ausência de sinais ou sintomas clínicos, embora ocorra o desenvolvimento de uma resposta imune específica, que pode ser evidenciada pelo teste intradérmico com paracoccidioidina <sup>(3)</sup>. Ao contrário, o processo pode progredir para a paracoccidioidomicose-doença com consequente disseminação para outros órgãos como fígado, baço e adrenais pela via linfohematogênica. As manifestações clínicas da micose podem ser agrupadas em dois padrões que definem as formas aguda e crônica da doença. A forma aguda é habitualmente grave, de evolução rápida e compromete o sistema fagocítico mononuclear (baço, fígado, linfonodos e medula óssea). A forma crônica tem duração prolongada, instalação lenta e gradual e as lesões permanecem localizadas ou envolvem mais de um órgão ou sistema <sup>(4, 5)</sup>. O estabelecimento da paracoccidioidomicose-infecção ou paracoccidioidomicose-doença nas suas formas mais ou menos graves depende principalmente das complexas interações parasita - hospedeiro que podem resultar em uma resposta imune mais ou menos eficaz por parte deste último. Neste contexto, estudos em humanos e animais têm mostrado que a resistência ao fungo envolve um padrão de resposta do tipo Th<sub>1</sub> e que em animais suscetíveis e pacientes ocorre um desvio desse tipo de resposta para um padrão Th<sub>2</sub> não protetor <sup>(6, 7)</sup>. Vários estudos tem identificado em pacientes, alguns mecanismos envolvidos nessa polarização <sup>(6)</sup>. No entanto, esses mecanismos merecem ser explorados particularmente no que se refere à participação das células apresentadoras de antígeno (APCs) com as

quais os trabalhos ainda são bastante escassos. As células dendríticas (DCs) são críticas para a detecção de patógenos e no desencadeamento de uma resposta inicial do hospedeiro. Adicionalmente a natureza da interação microorganismos-células dendríticas constitui um dos principais fatores que instruem o tipo de resposta imune adaptativa que se desenvolverá posteriormente. Nesse sentido, estudos voltados para a interação do *P. brasiliensis* com as APCs, em especial as DCs, podem contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos que levam à respostas polarizadas na paracoccidiodomicose.

Muitos mediadores secretados pelas DCs, de uma forma autócrina, podem modular as suas funções. Entre esses mediadores as prostaglandinas (PGs) e leucotrienos (LTs) têm merecido destaque nos últimos anos. As PGs e os LTs são eicosanóides que desempenham um importante papel na modulação da resposta imune em diferentes infecções <sup>(8, 9)</sup>. As PGs são moléculas derivadas do ácido araquidônico (AA) por ação das enzimas ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), sendo a COX-1 a forma constitutiva e a COX-2 a forma induzida. Além do seu papel em processos inflamatórios como febre, hiperalgesia e edema, a PGE<sub>2</sub> regula uma variedade de eventos celulares da resposta imune <sup>(10)</sup>. No que se refere ao efeito sobre DCs, alguns trabalhos mostram que a adição de PGE<sub>2</sub> a um coquetel de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 aumenta consideravelmente o processo de maturação dessas células com consequente aumento da sua capacidade de migração aos tecidos linfóides secundários, assim como a de expressar moléculas coestimulatórias e de ativar células T. Assim, DCs cultivadas na presença das citocinas citadas acima, mais PGE<sub>2</sub> tornam-se ótimas células indutoras de células CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub><sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  <sup>(11, 12, 13)</sup>. No entanto, outros trabalhos têm demonstrado que DCs diferenciadas na presença de PGE<sub>2</sub> não induzem respostas do tipo Th<sub>1</sub>, de células T citotóxicas ou de NK, enquanto aumentam respostas do tipo Th<sub>2</sub>, sendo esse efeito mediado pela supressão da produção de IL-12 <sup>(14, 15)</sup>.

Os LTs assim como as PGs são moléculas derivadas do AA, porém por ação das enzimas lipoxigenases (LO-5, LO-12 e LO-15). Nesse sentido, os LTs foram identificados inicialmente como potentes agentes estimuladores da quimiotaxia e adesão de leucócitos às células endoteliais, com consequente maior migração de neutrófilos <sup>(16, 17, 18, 19, 20, 21, 22)</sup>. No entanto, várias outras funções moduladoras tanto sobre a resposta imune inata, quanto sobre a adaptativa têm sido atribuídas a esses mediadores nos últimos anos <sup>(9)</sup>. Especificamente em relação às DCs, estudos tem mostrado que essas células produzem e respondem aos LTs <sup>(23)</sup>. O LTB<sub>4</sub> promove a migração das DCs

maduras e imaturas aos sítios inflamatórios e aumenta a função e expressão do receptor para quimiocina CCR7, envolvido no acúmulo e organização dessas células e das células T nos linfonodos <sup>(24)</sup>. O LTB<sub>4</sub> também está envolvido na indução de IL-12 pelas DCs, mostrando o importante papel desse mediador na instrução de uma resposta do tipo Th<sub>1</sub> <sup>(25)</sup>. Além do LTB<sub>4</sub>, os CYsLTs têm uma importante participação na circulação de DCs para os sítios de encontro com o antígeno assim como para os linfonodos <sup>(26, 27)</sup>. Os estudos sobre os receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs) nas DCs, envolvidos na produção dos eicosanóides são bastante escassos <sup>(28)</sup>. No entanto, estudo recente mostrou que em DCs estimuladas por zimozan ocorre um intenso metabolismo do AA com produção principalmente de produtos derivados da atuação da COX-2. Adicionalmente os autores mostraram que os componentes manana e β-glucana do zimozan são reconhecidos por TLR2, dectina-1, DC-SIGN e principalmente via associação dectina-1 e DC-SIGN <sup>(29)</sup>. Baseados nesses estudos, objetivamos avaliar se as DCs humanas produzem PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> em resposta ao desafio com cepas de alta ou baixa virulência do *P. brasiliensis*, determinar os receptores de reconhecimento de padrões moleculares envolvidos nessa produção e finalmente avaliar o papel modulador desses eicosanóides sobre a maturação fenotípica das DCs por meio da avaliação da expressão de moléculas de superfície características desse processo, e sobre a produção das citocinas IL-6, IL-10, IL-12, IL-23 e TNF-α.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Casuística

Foi coletado cerca de 50 mL de sangue periférico de 20 indivíduos saudáveis, de ambos os sexos, com idade entre 20 e 40 anos, funcionários do Instituto de Biociências, UNESP - Botucatu. O consentimento dos indivíduos para participação no presente trabalho foi obtido após informação e esclarecimento sobre os objetivos da pesquisa em questão, por meio da assinatura de formulário de consentimento. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, sob ofício número 375/2011.

### 2.2. Geração de DCs humanas a partir de monócitos do sangue periférico

Células mononucleares do sangue periférico foram obtidas por meio da separação em gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich, ST Louis, MO, USA) com centrifugação à 1500 rpm por 30 minutos. O anel rico em células mononucleares foi coletado e tratado com tampão de lise para hemáceas por 5 minutos em temperatura ambiente. Após este período, a suspensão celular foi lavada por 2 vezes com meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) por 10 minutos a 1500 rpm, para total remoção das plaquetas. Em seguida, a suspensão foi ressuspensa em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich), 40 µg/mL de gentamicina. A contagem, identificação e a viabilidade das células mononucleares foram realizadas por meio da coloração com Azul Tripán (alíquotas de 50 µL da suspensão celular serão incubadas com 50 µL da solução do corante a 0,02%). A concentração foi ajustada para  $5.10^6$  células/mL com posterior plaqueamento de 2 mL da suspensão em placas de macrocultura com 6 orifícios.

Após o plaqueamento, as culturas celulares foram incubadas por 2 horas à 37°C em tensão de 5% de CO<sub>2</sub> para aderência dos monócitos. Após esse período, as células não aderentes foram removidas por meio da lavagem das placas com meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich). Em seguida, as culturas de monócitos foram submetidas ao tratamento com 4 mL de RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich), 40 µg/mL de gentamicina e 10% de soro bovino fetal inativado, acrescido de IL-4 recombinante humana (80 ng/mL) e GM-CSF recombinante humano (80 ng/mL). Após 7 dias de cultivo, as células frouxamente

aderidas foram recolhidas com auxílio de uma pipeta, lavadas com meio completo e a concentração celular foi ajustada para  $1.10^6$  células dendríticas/mL e plaqueadas em placas de 24 orifícios (1,0 mL/orifício) para a realização dos ensaios propostos. Foi realizada a fenotipagem das células para confirmação da diferenciação das DCs, analisando-se a expressão dos marcadores  $CD14^-/CD1a^+/CD83^-$ , característicos de DC imatura.

### 2.3. Cultivo do *P. brasiliensis*

Foram utilizadas as cepas 18 e 265 de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265) mantidas em nosso laboratório por meio de cultivo em meio GPY, (2% glicose, 1% peptona e 0,5% extrato de levedura) à 37°C, em tubos de 20 x 20 mm, com subcultivos semanais. As culturas foram usadas após 5 ou 6 dias de cultivo.

### 2.4. Obtenção da suspensão de *P. brasiliensis* e teste de viabilidade

Células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram cultivadas de acordo com o item 2.3. Após o crescimento, essas células foram coletadas da superfície de cultivo com auxílio de alça de platina e transferidas para tubos estéreis com pérolas de vidro de 4 mm de diâmetro e aproximadamente 10 mL de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), e homogeneizadas em agitador de tubos tipo Vortex por 30 segundos. Em seguida, as suspensões celulares foram mantidas a 37° C durante 5 minutos para sedimentação de grumos não desfeitos durante a agitação. Após este período, o sobrenadante dessa suspensão foi coletado, sendo utilizada uma alíquota para contagem em câmara hemocitométrica tipo Neubauer, utilizando microscópio com contraste de fase. Foram consideradas como células viáveis as que se apresentaram com aspecto brilhante (refringente), uma vez que as células mortas apresentam-se com coloração escura. Foram utilizadas as suspensões que apresentaram pelo menos 95% de viabilidade<sup>(30)</sup>.

### 2.5. Desafio das DCs com *P. brasiliensis*

Células dendríticas geradas conforme item 2.2 na concentração de  $1.10^6$ /mL foram desafiadas durante 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 18h, 24h e 48h com Pb18 ou Pb265 nas concentrações de  $1.10^5$  ou  $2.10^5$  leveduras/mL estabelecendo uma relação DCs:leveduras de 10:1 ou 5:1, respectivamente ou com 5 µg/mL de LPS.

## **2.6. Imunofenotipagem das Células Dendríticas derivadas de Monócitos (Mo-DCs)**

A imunofenotipagem foi realizada tanto nas DCs imaturas (não desafiadas com o fungo) como nas DCs desafiadas com o fungo ou ativadas com LPS. As células foram transferidas para tubos Falcon para citômetro (BD - Becton, Dickinson and Company) e centrifugadas a 1700 rpm por 10 minutos à 4°C. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em 1 mL de solução eletrolítica (ISOTON II). Em seguida, no caso das células imaturas seguiu-se incubação com anticorpos monoclonais anti-CD14 conjugado com PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein Complex) (2 µL), anti-CD1a conjugado com FITC (Fluorescein) (5 µL) e anti-CD83 conjugado com PE (Phycoerythrin) (5 µL) durante 30 minutos. Para cada teste foi feito um tubo controle no qual as DCs foram incubadas com anticorpos de controle isotípico marcados com os respectivos fluorocromos dos testes. Após o período de incubação com os respectivos anticorpos, as células foram centrifugadas a 1700 rpm por 10 minutos para lavagem, ressuspensas em 450 µL de ISOTON II, fixadas com 50 µL de solução de fixação contendo 5% de formaldeído (BD-Becton, Dickinson and Company) e analisadas em citômetro de fluxo modelo FACSCalibur™ (BD-Becton, Dickinson and Company), usando programa CellQuest.

## **2.7. Expressão dos receptores TLR2, MMR, Dectina-1 e DC-SIGN**

Células dendríticas imaturas (sem desafio com o fungo) e DCs desafiadas com Pb18 e Pb265 foram transferidas para tubos Falcon para citômetro (BD - Becton, Dickinson and Company) e centrifugadas a 1700 rpm por 10 minutos à 4°C. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em 1 mL de solução eletrolítica (ISOTON II). Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-TLR2 conjugado com FITC (Fluorescein), anti-Receptor de Manose conjugado com PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein Complex), anti-Dectina-1 conjugado com PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein Complex) e anti-DC-SIGN conjugado com FITC (Fluorescein) durante 30 minutos. Para cada teste foi feito um tubo controle no qual as DCs foram incubadas com anticorpos de controle isotípico marcados com os respectivos fluorocromos dos testes. Após o período, as células foram centrifugadas a 1700 rpm por 10 minutos para lavagem, ressuspensas em 450 µL de ISOTON II, fixadas com 50 µL de solução de fixação contendo 5% de formaldeído (BD-Becton, Dickinson and Company).

Company) e analisadas em citômetro de fluxo modelo FACSCalibur™ (BD-Becton, Dickinson and Company), usando programa CellQuest.

## **2.8. Produção de PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> por DCs desafiadas com Pb18 ou Pb265**

Sobrenadantes de culturas de DCs desafiadas ou não com Pb18, Pb265 ou LPS foram coletados e avaliados quanto a produção dos eicosanóides utilizando kits comerciais de ELISA Competitivo para dosagem de PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). Em alguns experimentos, antes do desafio com o fungo as DCs foram incubadas por 2 horas com anticorpo monoclonal anti-TLR2 (20 uL), anti-receptor de manose (3 uL), anti-Dectina-1 (35 uL) ou anti-DC-SIGN (7 uL), e avaliadas quanto a produção dos eicosanóides.

## **2.9. Avaliação da expressão de moléculas MHC de classe II e moléculas coestimulatórias na superfície das DCs, por citometria de fluxo**

DCs controles (sem desafio) e desafiadas com o fungo foram transferidas para tubos Falcon para citômetro (BD - Becton, Dickinson and Company) e centrifugadas a 1700 rpm por 10 minutos à 4°C. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em 1 mL de solução eletrolítica (ISOTON II). Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-HLA-DR conjugado com FITC (Fluorescein) (20 uL), anti-CD40 conjugado com PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein Complex) (5 uL), anti-CD80 conjugado com FITC (Fluorescein) (20 uL), anti-CD83 conjugado com PE (Phycoerythrin) (5 uL) ou anti-CD86 conjugado com APC (Allophycocyanin) (15 uL) durante 30 minutos. Para cada teste foi feito um tubo controle no qual as células foram incubadas com anticorpos de controle isotípico marcados com os respectivos fluorocromos dos testes. As células foram centrifugadas por 10 minutos a 1700 rpm para lavagem, ressuspensas em 450 µL de ISOTON II, fixadas com 50 µL de solução de fixação contendo 5% de formaldeído (BD-Becton, Dickinson and Company) e analisadas em citômetro de fluxo modelo FACSCalibur™ (BD-Becton, Dickinson and Company), usando programa CellQuest.

## **2.10. Avaliação da expressão dos receptores para as quimiocinas CCR5, CCR7 e CXCR4 na superfície das DCs, por citometria de fluxo**

Foi utilizado protocolo semelhante ao descrito acima, com exceção de que as células foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-CCR5 conjugado com FITC

(Fluorescein), anti-CCR7 conjugado com PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein Complex) ou anti-CXCR4 conjugado com PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein Complex).

### **2.11. Tratamento das DCs com PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> exógenos**

Células dendríticas geradas conforme item 2.2 na concentração de  $1.10^6$  DCs/mL foram desafiadas durante 48h com Pb18 ou Pb265 nas concentrações de  $2.10^5$  leveduras/mL estabelecendo uma relação DCs:leveduras de 5:1 ou com 5 µg/mL de LPS. DCs controles (sem desafio) e desafiadas com o fungo foram tratadas com 100 pg/mL de PGE<sub>2</sub> exógena ou 100 pg/mL de LTB<sub>4</sub> exógeno (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) e avaliadas quanto a expressão de HLA-DR, moléculas coestimulatórias, receptores para quimiocinas e produção das citocinas IL-6, IL-10, IL-12, IL-23 e TNF- $\alpha$ .

### **2.12. Determinação da produção de citocinas por DCs desafiadas com Pb18 ou Pb265**

Após os tratamentos das culturas (item 2.11), os sobrenadantes produzidos pelas DCs controles ou as desafiadas com o fungo ou LPS, na presença ou ausência de PGE<sub>2</sub> ou LTB<sub>4</sub>, foram coletados, centrifugados a 400 g, e as alíquotas desse material conservadas a -80°C até o momento de sua utilização para a dosagem das citocinas IL-6, IL-10, IL-12p70 e TNF- $\alpha$  utilizando kits comerciais para ELISA DuoSet (BD OptEIA-Becton, Dickinson and Company) específico para cada citocina, e a IL-23 dosada por meio do kit comercial ELISA DuoSet (R&D Systems).

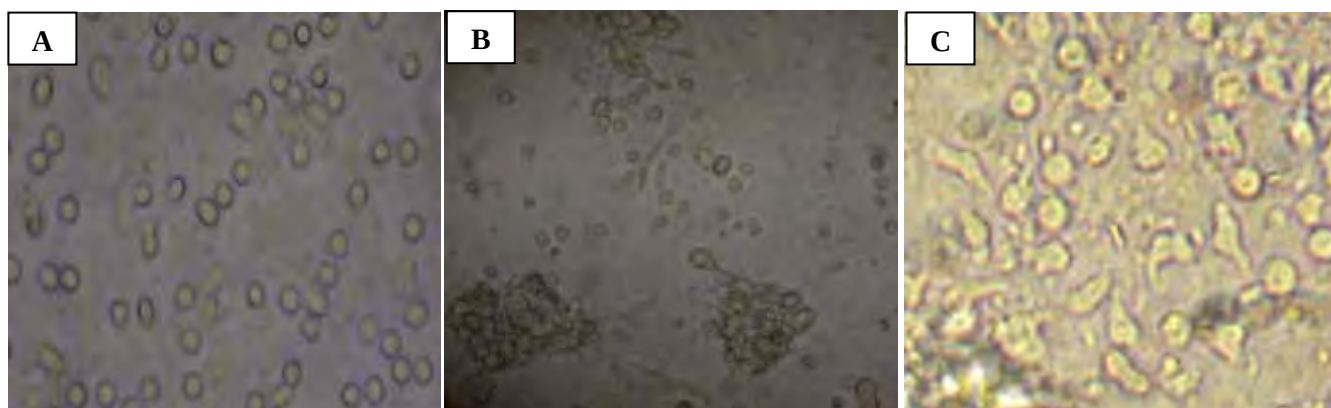
### **2.13. Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software Graphpad Prism 5.01. Diferenças significativas entre os diversos grupos foram determinadas pelo teste de Análise de Variância para amostras dependentes, e as médias comparadas pelo teste de Correlações Múltiplas de Tukey-Kramer, assumindo como verdadeira cada hipótese em que a probabilidade de erro foi menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Caracterização das células dendríticas obtidas a partir de monócitos do sangue periférico (MO-DCs).

As figuras 1 A, B ,C confirmam sob o ponto de vista morfológico a obtenção de culturas de células dendríticas a partir de monócitos do sangue periférico humano. Após a estimulação de monócitos isolados do sangue periférico com as citocinas GM-CSF e IL-4, observamos a disposição destas células que se apresentaram flutuantes ou levemente aderidas à placa. Além disso, observamos também a morfologia desde o dia “1” após o tratamento até o dia “7” da coleta. Como esperado, no 7º dia, as células apresentaram-se com morfologia típica de células dendríticas derivadas de monócitos (MO-DCs).



**FIGURA 1:** Cinética da cultura de células observadas em microscópio óptico invertido: (A) - Monócitos no 1º dia de cultura (aumento 400X). (B) - Monócitos em fase preliminar de diferenciação no 3º dia de cultura (aumento 400X). (C) - Células Dendríticas derivadas de Monócitos no 7º dia de cultura (aumento 400X).

Com o intuito de confirmar o fenótipo dessas células para que não houvesse dúvidas quanto a sua diferenciação de monócitos para células dendríticas (DCs), realizamos ensaio de citometria de fluxo que nos possibilitou investigar a expressão de moléculas de superfície. A nossa busca foi por células dendríticas com fenótipo imaturo (iDCs).

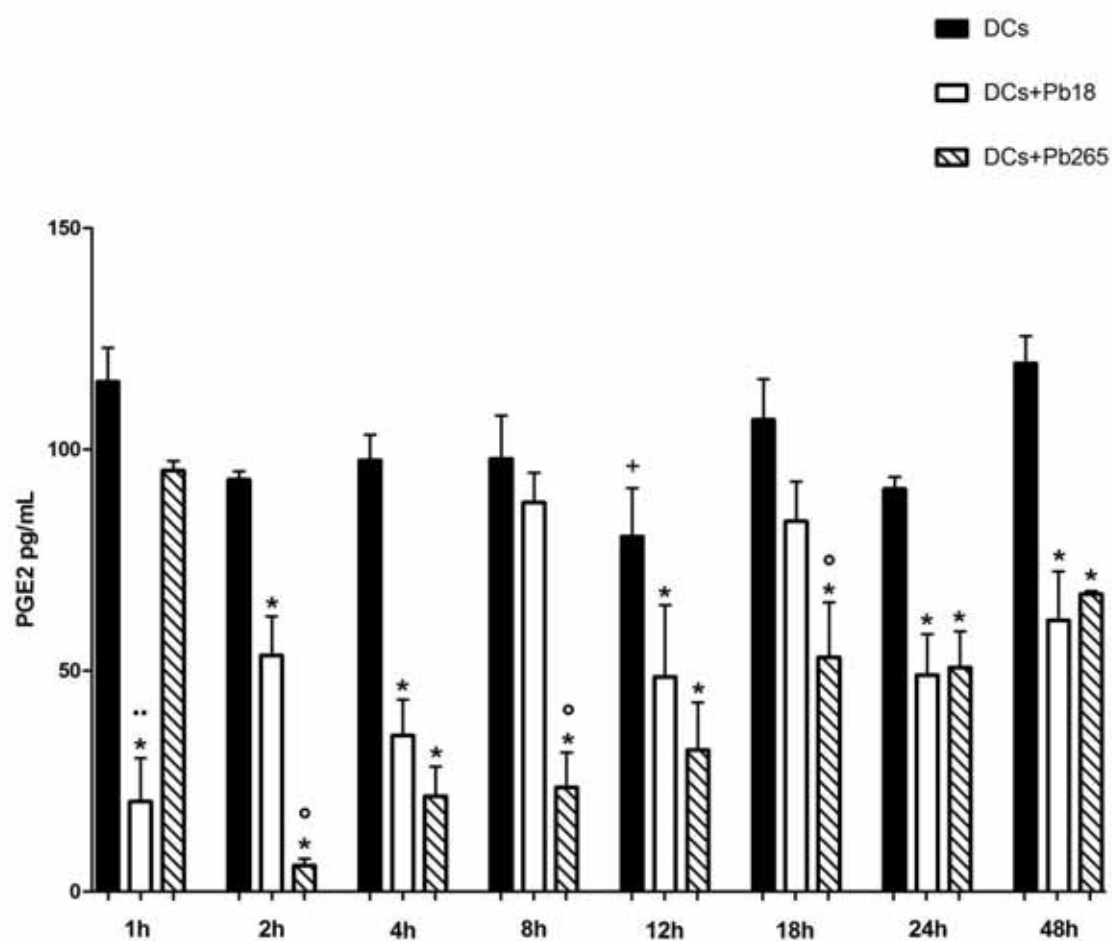
Além das células cultivadas por 7 dias com 80 ng/mL de GM-CSF e 80 ng/mL de IL-4, testamos o cultivo de 6 e 8 dias. Além disso, foram realizadas culturas com reforço de 40 ng/mL de cada citocina na metade dos dias 6, 7 e 8 de cultura. Em todas

as culturas obtivemos células que apresentaram diminuição da expressão da molécula CD14, alta expressão de CD1a e baixa expressão de CD83, fenótipo característico de iDCs (CD14<sup>-</sup>/CD1a<sup>high</sup>/CD83<sup>low</sup>)<sup>(31, 32)</sup>, não sendo detectadas diferenças importantes entre os diferentes tratamentos. Desse modo, estabelecemos como definitivo, o nosso protocolo inicial de obtenção de DCs, isto é, cultivo de 7 dias e estimulação com 80 ng/mL de cada citocina, sem reforço no tratamento. As células submetidas a esse protocolo passaram a ser consideradas definitivamente como MO-DCs.

### 3.2. Produção de PGE<sub>2</sub> por MO-DCs desafiadas com as cepas Pb18, Pb265 e LPS

Com o objetivo de padronizar o melhor período de produção desses mediadores pelas DCs quando desafiadas com as cepas Pb 18 e Pb 265, as culturas foram avaliadas desde períodos precoces até períodos mais tardios (1, 2, 4, 8, 12, 18, 24 e 48 horas). Além disso, padronizamos a melhor proporção de DCs:Pb desafiando 5 DCs com 1 Pb e 10 DCs com 1 Pb (resultados não mostrados). A melhor proporção foi 5:1, respectivamente. Os resultados são mostrados na Figura 5.

Apesar de algumas diferenças detectadas entre os períodos estudados, podemos considerar que a produção basal de PGE<sub>2</sub> pelas DCs foi relativamente estável durante o período, com produção mínima de 80.304 pg/mL (12 horas) e máxima de 119.434 pg/mL (48 horas). No entanto, após o desafio com Pb18 e Pb265 houve diminuição significativa da produção basal de PGE<sub>2</sub>, chamando a atenção que em alguns períodos (2, 8, e 18 horas) a inibição induzida pela Pb265 foi maior em relação à Pb18. Para confirmar o efeito inibidor das duas cepas do fungo sobre a produção de PGE<sub>2</sub>, realizamos ensaios nos quais as células foram estimuladas com LPS, considerado como um controle positivo para a produção de PGE<sub>2</sub> e maturação das células dendríticas. Observamos de uma forma bem clara que ao contrário do fungo, o LPS estimulou a produção do mediador de uma forma gradativa na dependência do tempo de estímulo ( $158,8 \pm 15,18$  pg/mL em 1 hora para  $372,8 \pm 36,36$  pg/mL em 48 horas) (Figura6).



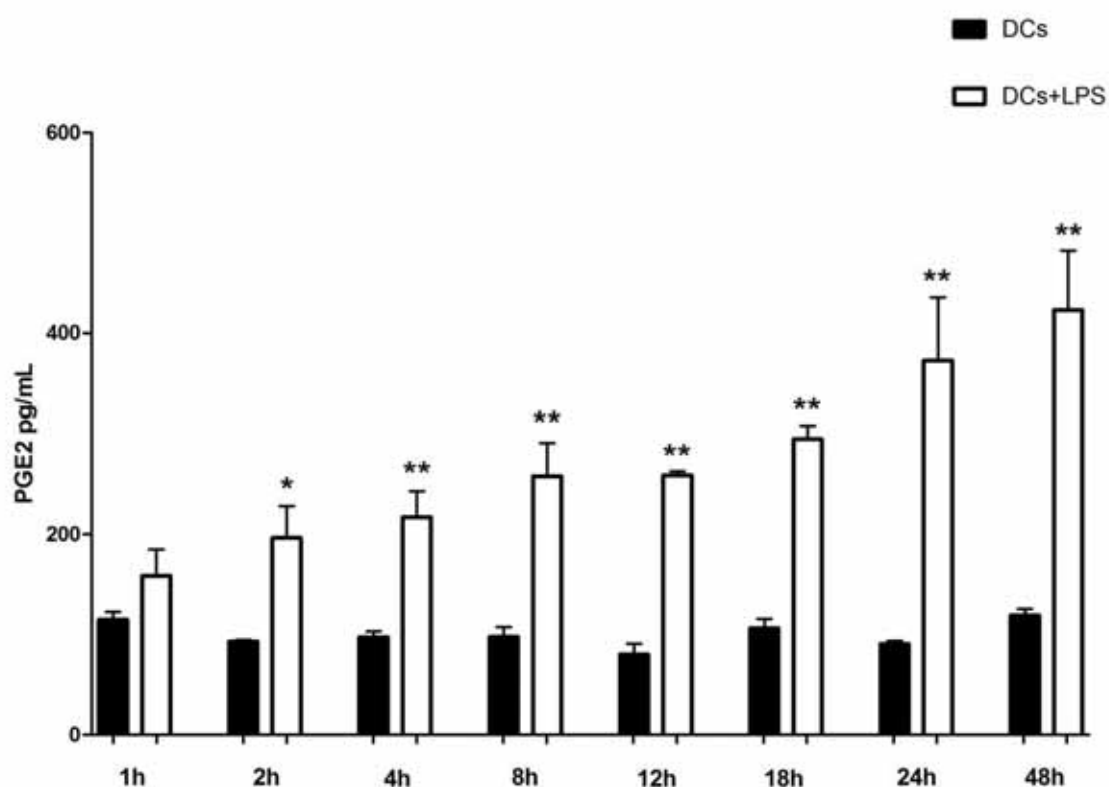
**FIGURA 2:** Produção de  $\text{PGE}_2$  por DCs controle (não desafiadas) ou desafiadas com Pb18 ou Pb265 (relação DCs:Pb de 5:1) por diferentes períodos. Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de resultados obtidos com células de 5 indivíduos.

\*  $p < 0.05$  x respectivo DC

+  $p < 0.05$  x DC outros períodos

o  $p < 0.05$  x respectivo Pb18

\*\*  $p < 0.05$  x respectivo Pb265



**FIGURA 3:** Produção de PGE<sub>2</sub> por DCs ativadas com LPS 5μ/mL por diferentes períodos. Os valores são expressos como média ± desvio padrão de resultados obtidos com células de 5 indivíduos.

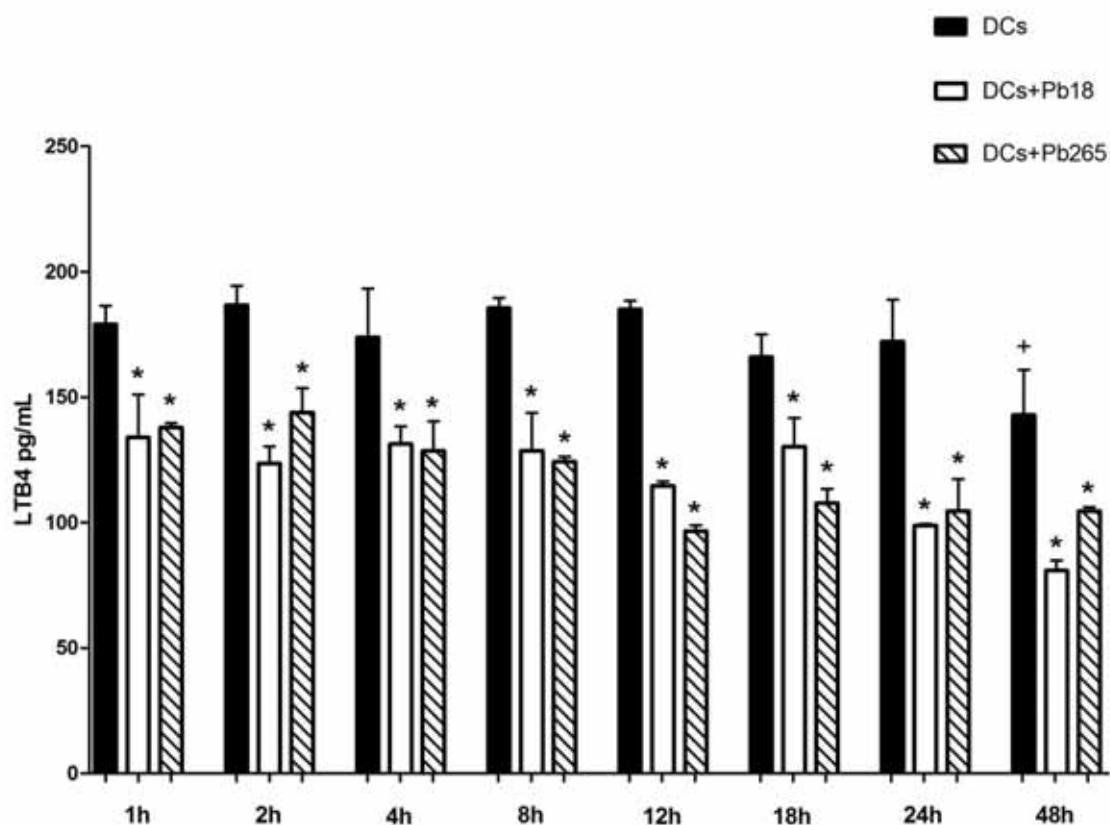
\*p < 0.05 x respectivo DC

\*\*p < 0.001 x respectivo DC

### 3.3. Produção de LTB<sub>4</sub> por MO-DCs desafiadas com as cepas Pb18, Pb265 e LPS

Os resultados referentes à produção de LTB<sub>4</sub> em resposta às duas cepas do fungo são mostrados na Figura 7. Detectamos uma produção substancial de LTB<sub>4</sub> pelas células não desafiadas já no período de 1 hora. Os valores mantiveram-se nos mesmos níveis até o período de 18 horas, no qual ocorreu uma leve queda, que no entanto mostrou-se mais significativa no último período de avaliação. A produção máxima foi de  $186.7 \pm 4.4$  pg/mL no período de 2 horas e a mínima foi de  $142.8 \pm 10.51$  pg/mL com 48 horas. No entanto, para cada período, após o desafio com Pb18 e Pb265 houve uma diminuição significativa da produção de LTB<sub>4</sub>, não havendo diferenças significativas entre as duas cepas. Da mesma forma que o avaliado para a produção de PGE<sub>2</sub>, para confirmar o efeito inibidor das duas cepas do fungo sobre a produção de

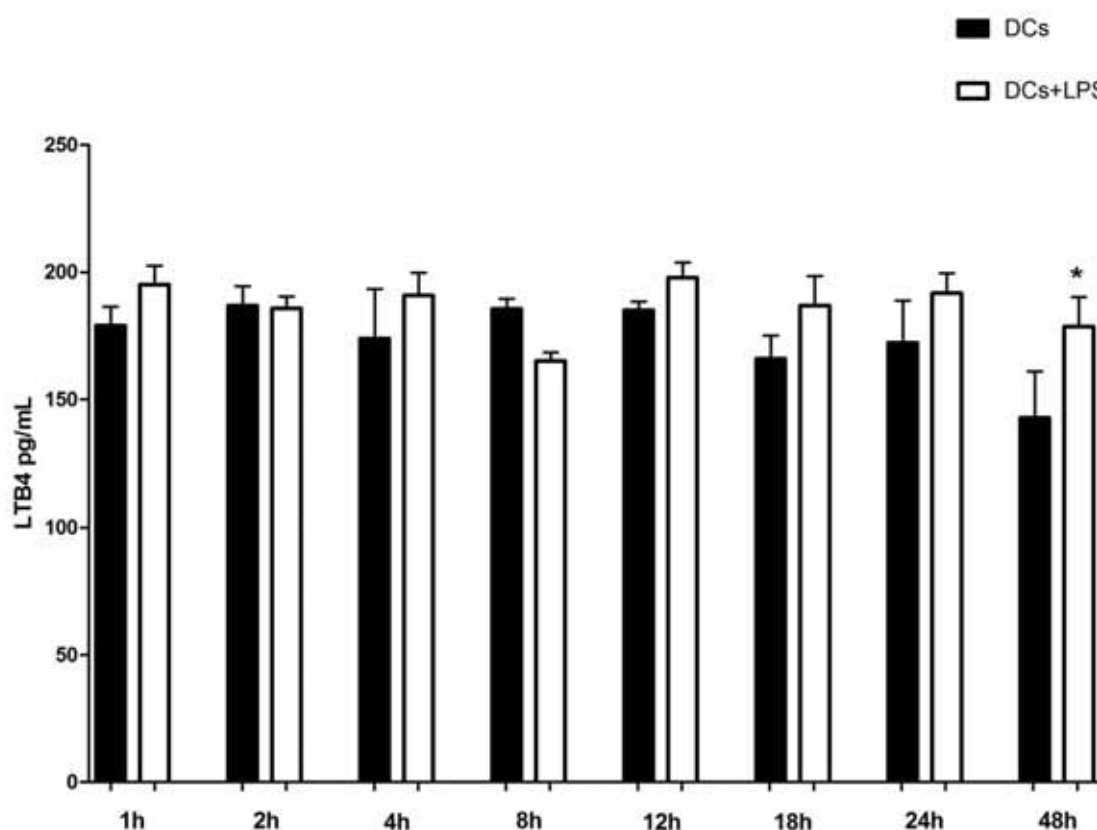
LTB<sub>4</sub>, realizamos ensaios nos quais as células foram estimuladas com LPS. Observamos que ao contrário do fungo, o LPS não inibiu a produção do mediador. No entanto de forma diferente ao detectado para a PGE<sub>2</sub>, na maioria dos períodos o LPS apenas tendeu a aumentar a produção do mediador. Um aumento significativo somente foi obtido no período de 48 horas (Figura 8).



**FIGURA 4:** Produção de LTB<sub>4</sub> por DCs controle (não desafiadas) ou desafiadas com PB18 ou Pb265 ( relação DCs:Pb de 5:1) por diferentes períodos. Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de resultados obtidos com células de 5 indivíduos.

\*  $p < 0.05$  x respectivo DC

+  $p < 0.05$  x DC outros períodos



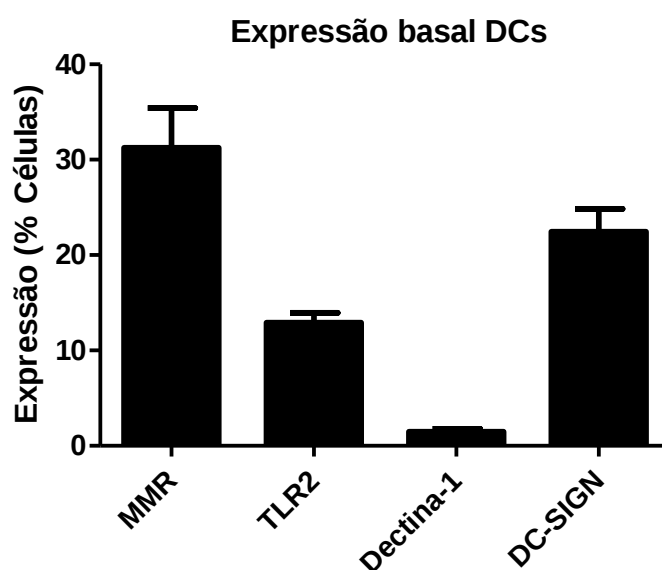
**FIGURA 5:** Produção de LTB<sub>4</sub> por DCs ativadas com LPS 5 µ/mL por diferentes períodos. Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de resultados obtidos com células de 5 indivíduos.

\*p < 0.05 x respectivo DC

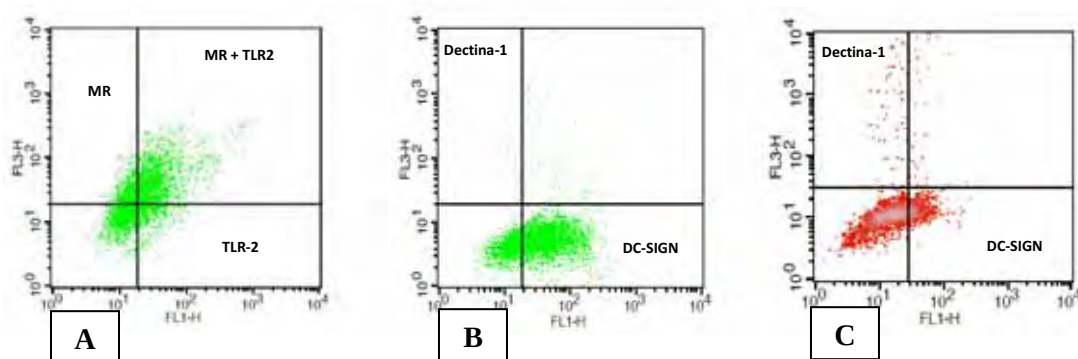
### 3.4. Envolvimento dos receptores MMR, TLR2, Dectina-1 e DC-SIGN na inibição da produção de PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> pelas MO-DCs, induzida pelo *P. brasiliensis*.

Antes de avaliar o papel dos receptores no processo de inibição, houve necessidade de avaliar a expressão desses receptores pelas DCs. Detectamos que a porcentagem de células que expressaram MMR, TLR2 e DC-SIGN foi bastante significativa. Por outro lado, os valores para Dectina-1 foram bastante baixos (Figura 9). As Figuras 10 A B e C mostram “dot plots” representativos desses resultados. Uma vez analisada a expressão dos receptores passamos a realizar experimentos de bloqueio dos mesmos para análise da participação desses quatro receptores de modo individual no processo de inibição. A cada ensaio três receptores eram bloqueados, e um deles era

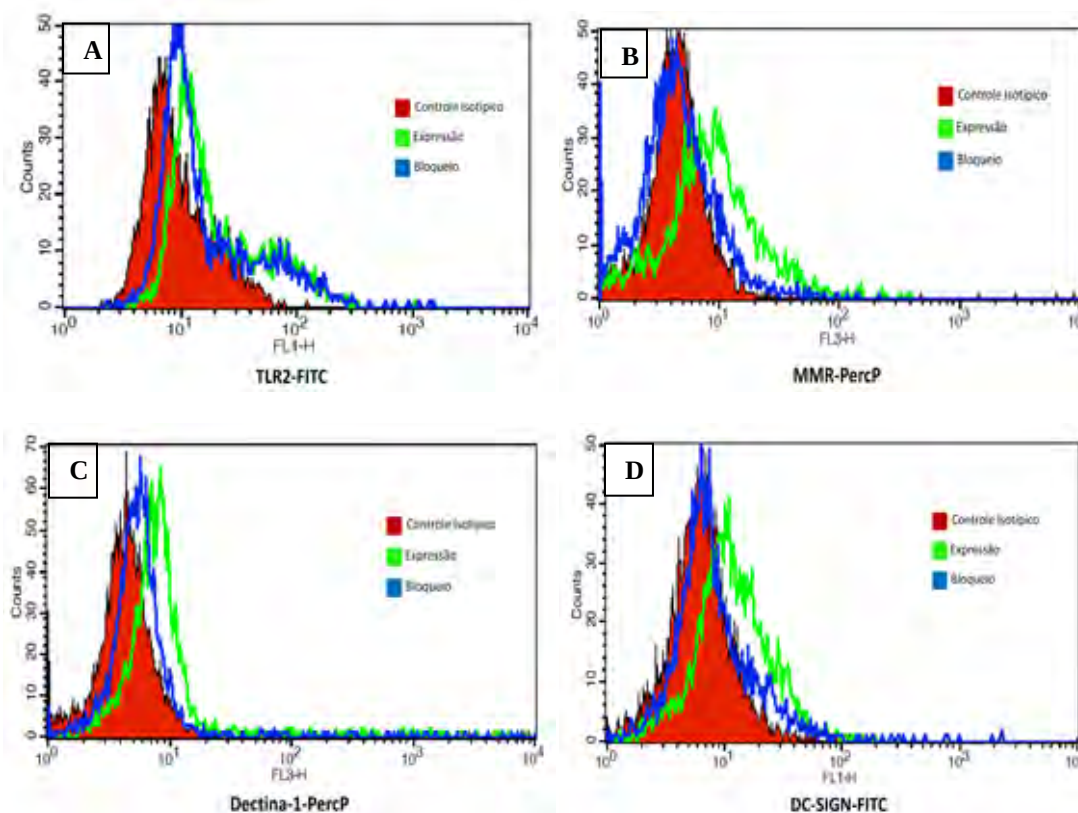
disponibilizado, mantendo uma via funcional em cada momento. As Figuras 11 A, B, C e D mostram histogramas representativos dos resultados relativos aos bloqueios dos receptores. Nas figuras 12 e 13 podemos analisar os resultados relativos ao envolvimento de cada um dos receptores na inibição da produção de  $\text{PGE}_2$  e  $\text{LTB}_4$ , respectivamente. Os ensaios foram realizados após 4 e 24 horas de desafio com o fungo. Os resultados mostram perfis de resposta semelhantes para as duas cepas e nos dois períodos. Detectamos que uma inibição da produção de  $\text{PGE}_2$  só ocorreu quando os receptores de manose ficaram disponíveis, indicando o papel desse receptor no processo. A disponibilidade individual dos outros receptores resultou em níveis do mediador bastante semelhantes ou até maiores aos detectados pelas DCs não desafiadas, indicando o não envolvimento dos mesmos. Em relação ao  $\text{LTB}_4$ , detectamos inibição da produção do metabólito quando cada um dos receptores ficou disponibilizado, sugerindo o envolvimento de todos os receptores nesse processo.



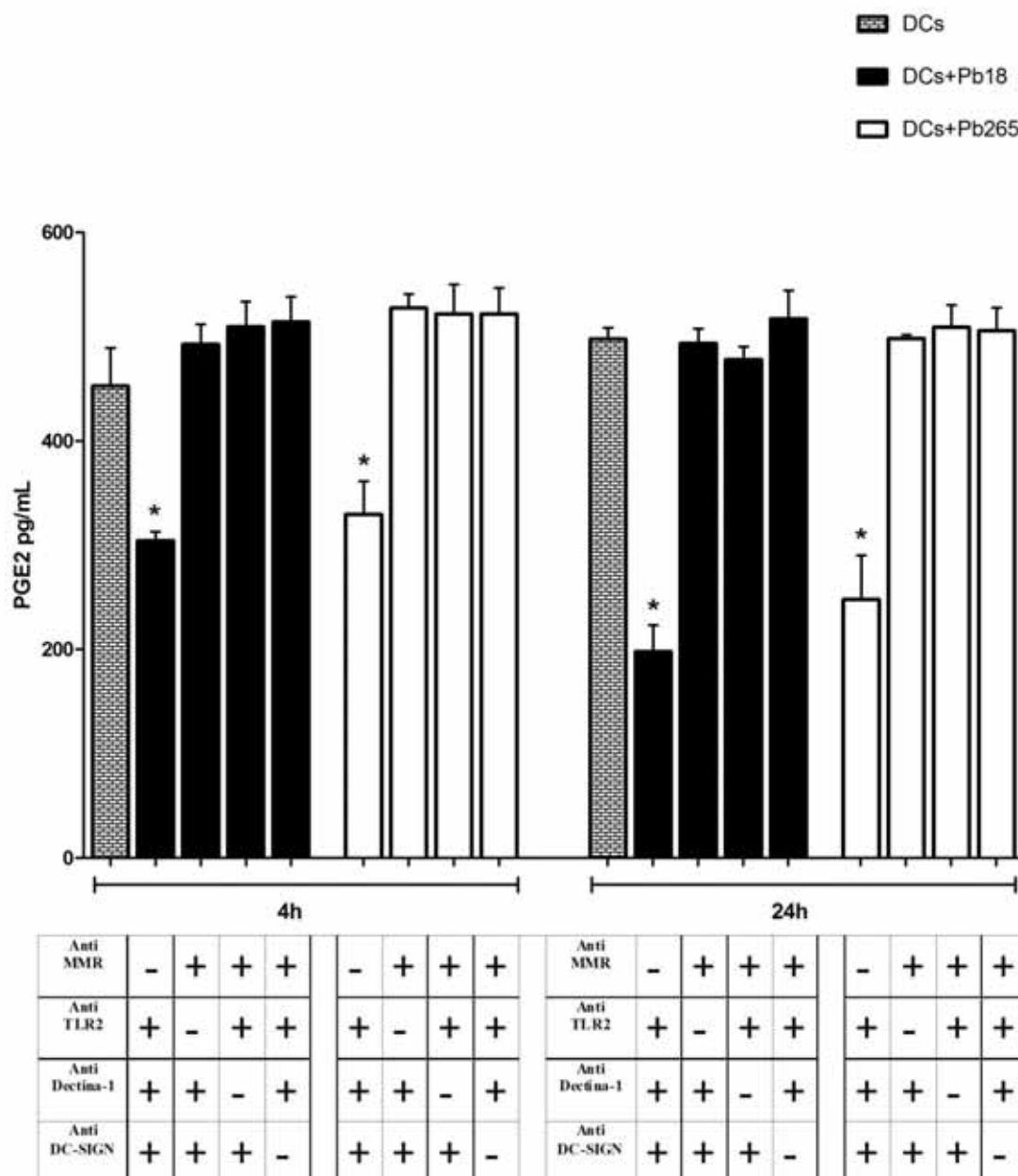
**FIGURA 6:** Porcentagem de MO-DCs que expressam MMR, TLR2, Dectina-1 e DC-SIGN. Os valores são expressos em média  $\pm$  desvio padrão de resultados obtidos com células de 4 indivíduos.



**FIGURA 7:** “Dot plots” representativos da porcentagem de MO-DCs que expressaram MMR e TLR2 (A), Dectina-1 e DC-SIGN (B) e Dectina-1 e DC-SIGN (C).

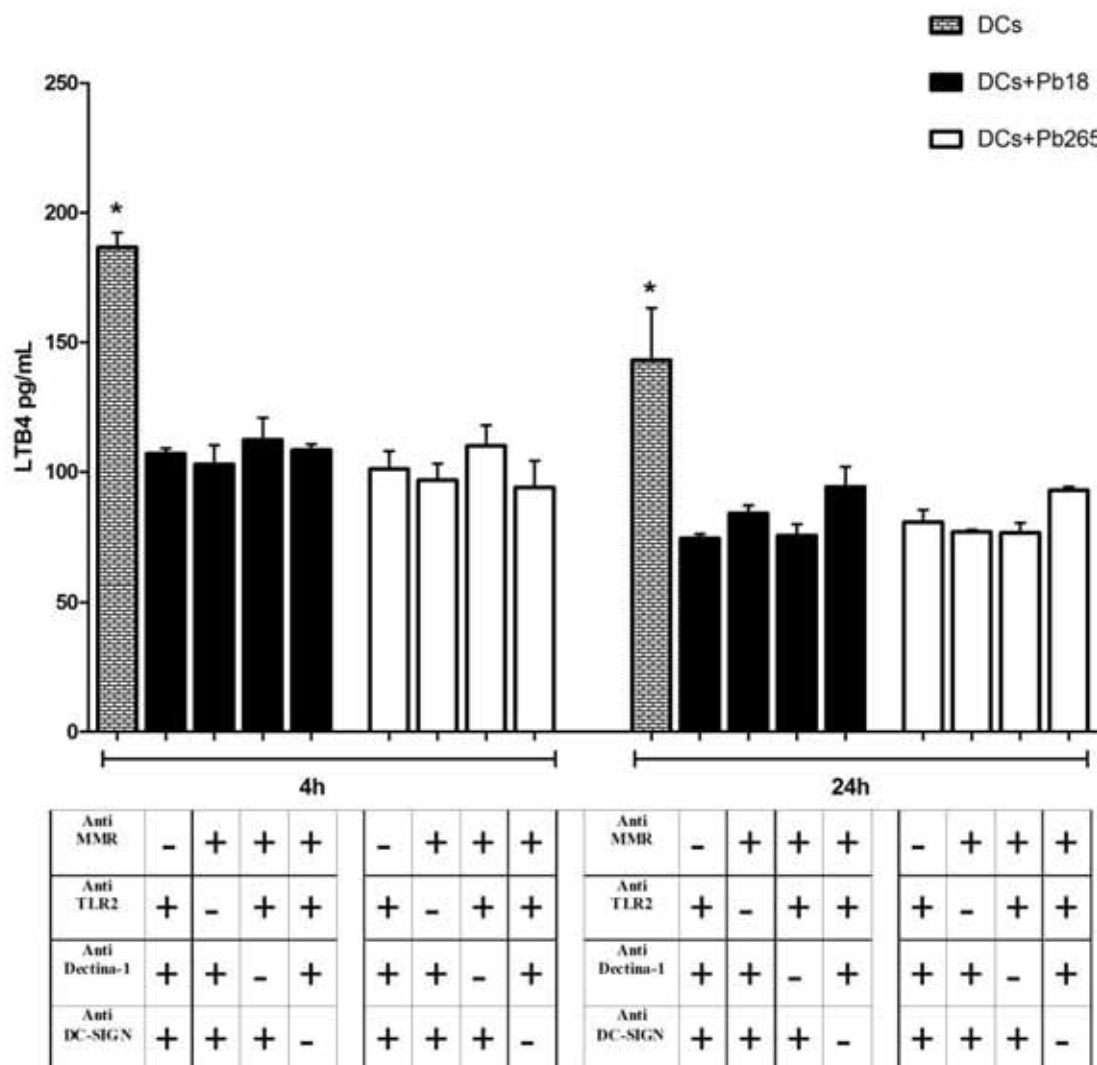


**FIGURA 8:** Histogramas representativos dos resultados de bloqueio de TLR2 (A), MMR (B), Dectina-1 (C) e DC-SIGN (D).



**FIGURA 9:** Envolvimento dos receptores MMR, TLR2, Dectina-1 e DC-SIGN na inibição da produção de PGE<sub>2</sub> induzida pelo *P. brasiliensis*. Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de resultados obtidos com MO-DCs de 4 indivíduos.

\*  $p < 0.05$  x DCs e outros receptores



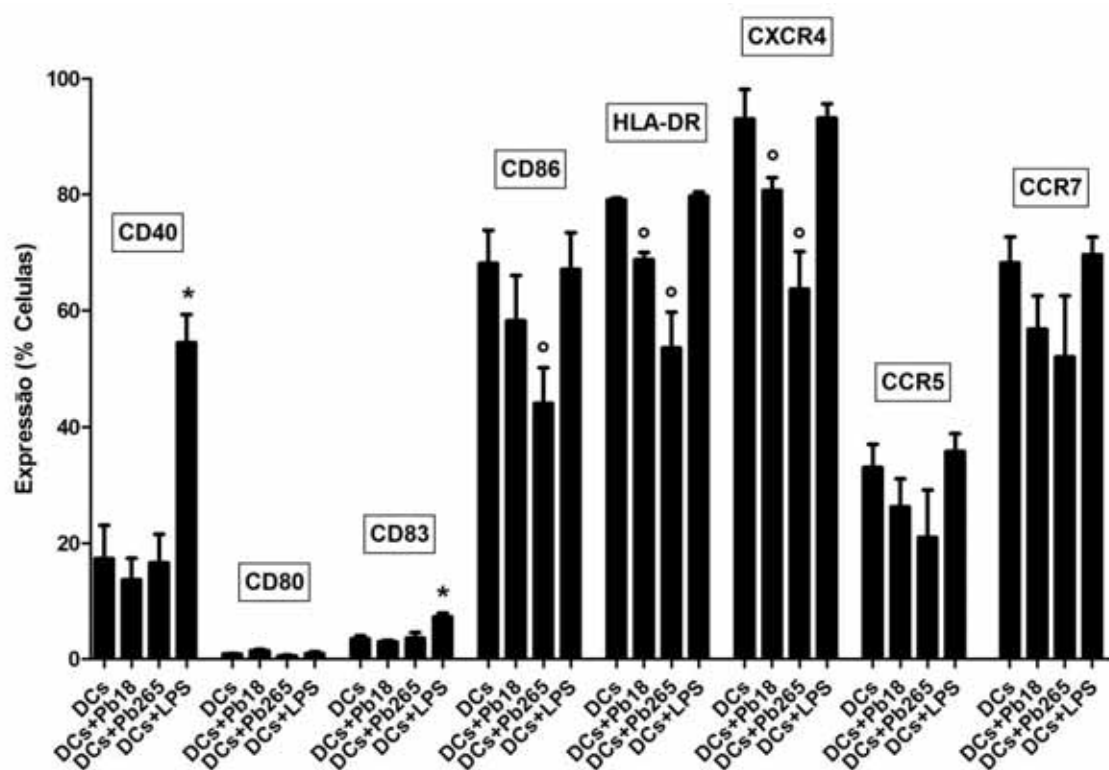
**FIGURA 10:** Envolvimento dos receptores MMR, TLR2, Dectina-1 e DC-SIGN na inibição da produção de LTB<sub>4</sub> induzida pelo *P. brasiliensis*. Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de resultados obtidos com MO-DCs de 4 indivíduos.

\*  $p < 0.05$  x todos os receptores

### **3.5. Expressão de moléculas MHC de classe II, moléculas coestimulatórias e receptores para quimiocinas na superfície das DCs.**

Uma vez detectado que as duas cepas do fungo inibem a produção de PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> pelas MO-DCs, nosso próinflamatório objetivo foi avaliar a consequência dessa inibição para a maturação das DCs. Assim, avaliamos a expressão de algumas moléculas características dessa diferenciação como CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR, CXCR4, CCR5 e CCR7 no período de 48 horas de desafio, por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos em porcentagem de células que expressaram o receptor assim como média de intensidade de fluorescência (MIF) (Figuras 11a e 11b, respectivamente). Observamos que tanto a cepa 18, como a 265, não induziram aumento da porcentagem de células que expressaram CD40, CD80 e CD83, ocorrendo por outro lado, uma tendência (no caso da CCR5 e CCR7) ou mesmo uma diminuição significativa (CD86, HLA-DR e CXCR4) na porcentagem de células que expressaram tais moléculas, após o desafio com o fungo (Figura 11a). No que se refere à MIF, observamos também que ambas as cepas não induziram aumento das moléculas CD40, CD83, CD86, HLA-DR, CXCR4, CCR5 e CCR7. No entanto, ocorreu uma tendência (no caso da CD40) ou mesmo uma diminuição significativa de CD80 e CD83. Nas figuras 12, 13, 14 e 15 são mostrados os dot plots e histogramas representativos da avaliação das porcentagens de células que expressam CD40 e CD80, CD83 e CD86, HLA-DR e CXCR4, e CCR5 e CCR7, respectivamente.

a)



b)

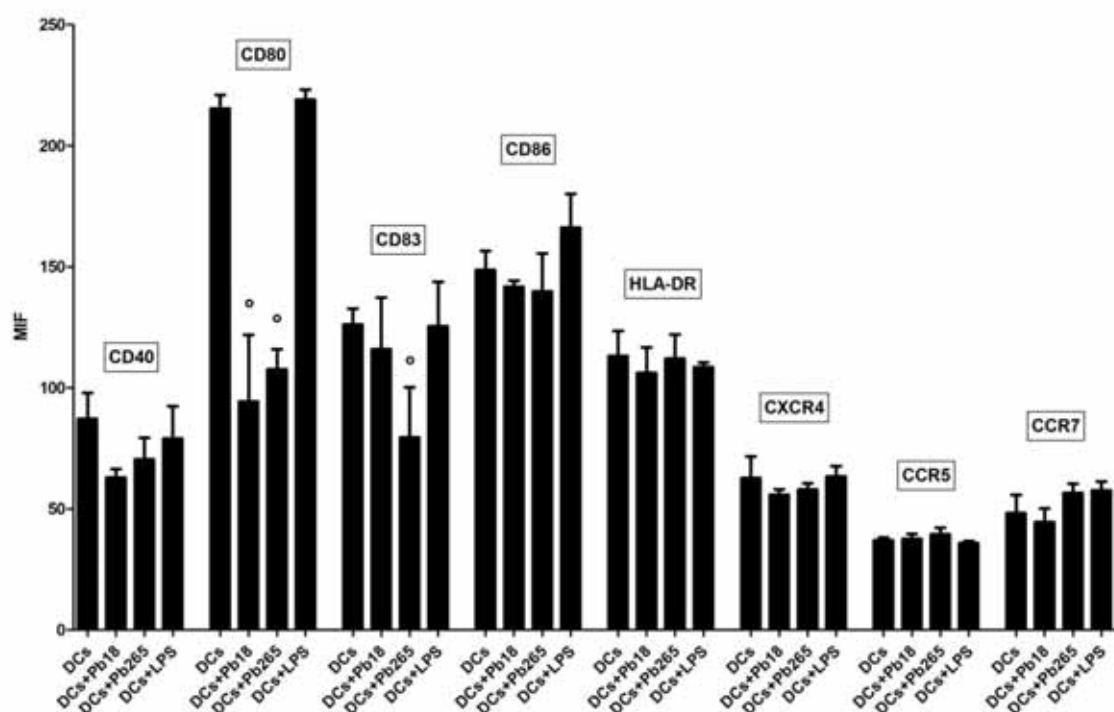
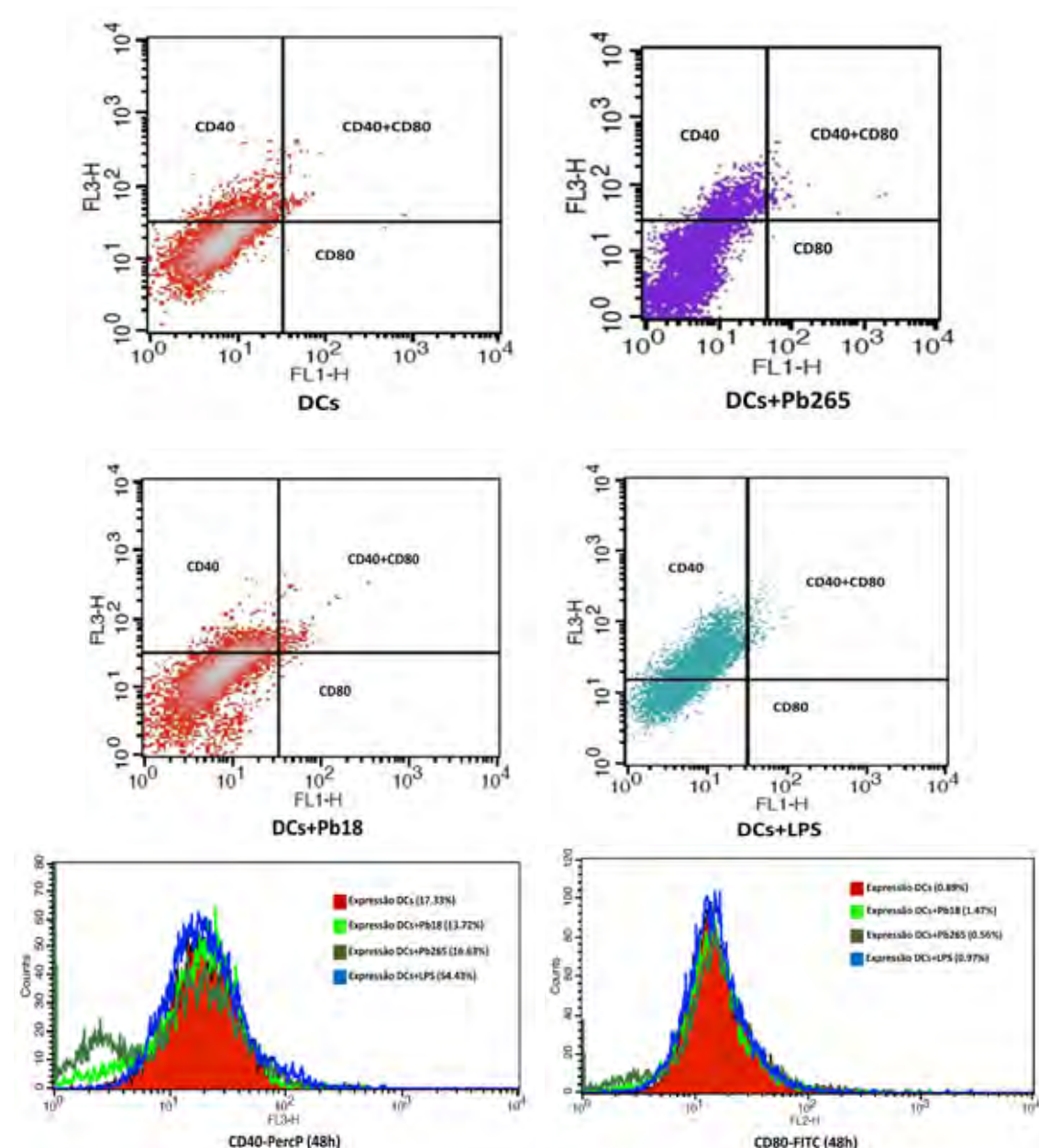


FIGURA 11: a) Porcentagem de MO-DCs incubadas com Pb18 ou Pb265 ou LPS por 48h que expressam CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR, CXCR4, CCR5 e CCR7. b)

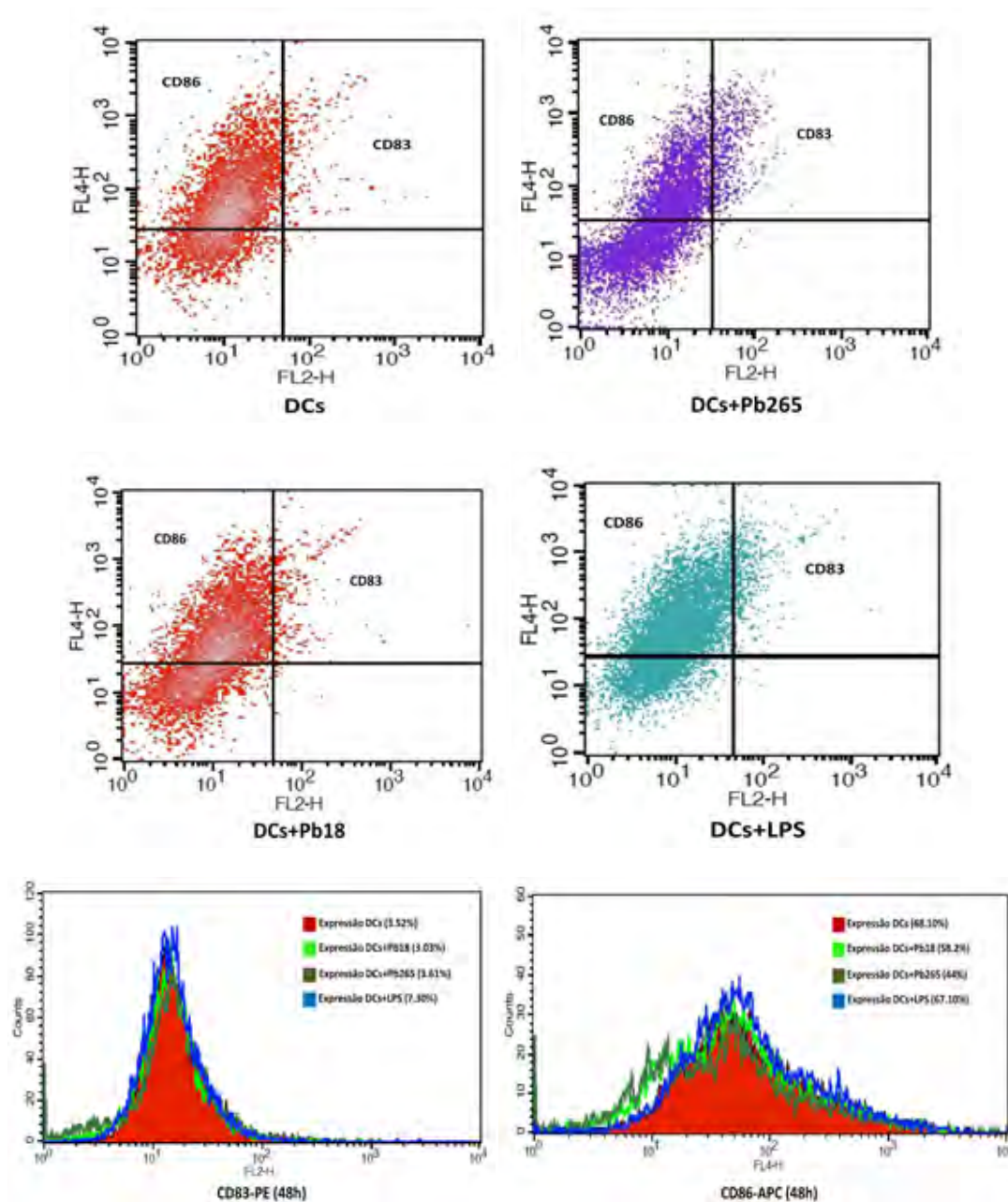
Média de Intensidade de Fluorescência (MIF). Os valores são expressos em média  $\pm$  desvio padrão de resultados obtidos com células de 4 indivíduos.

\*  $p < 0.05$  x outros tratamentos

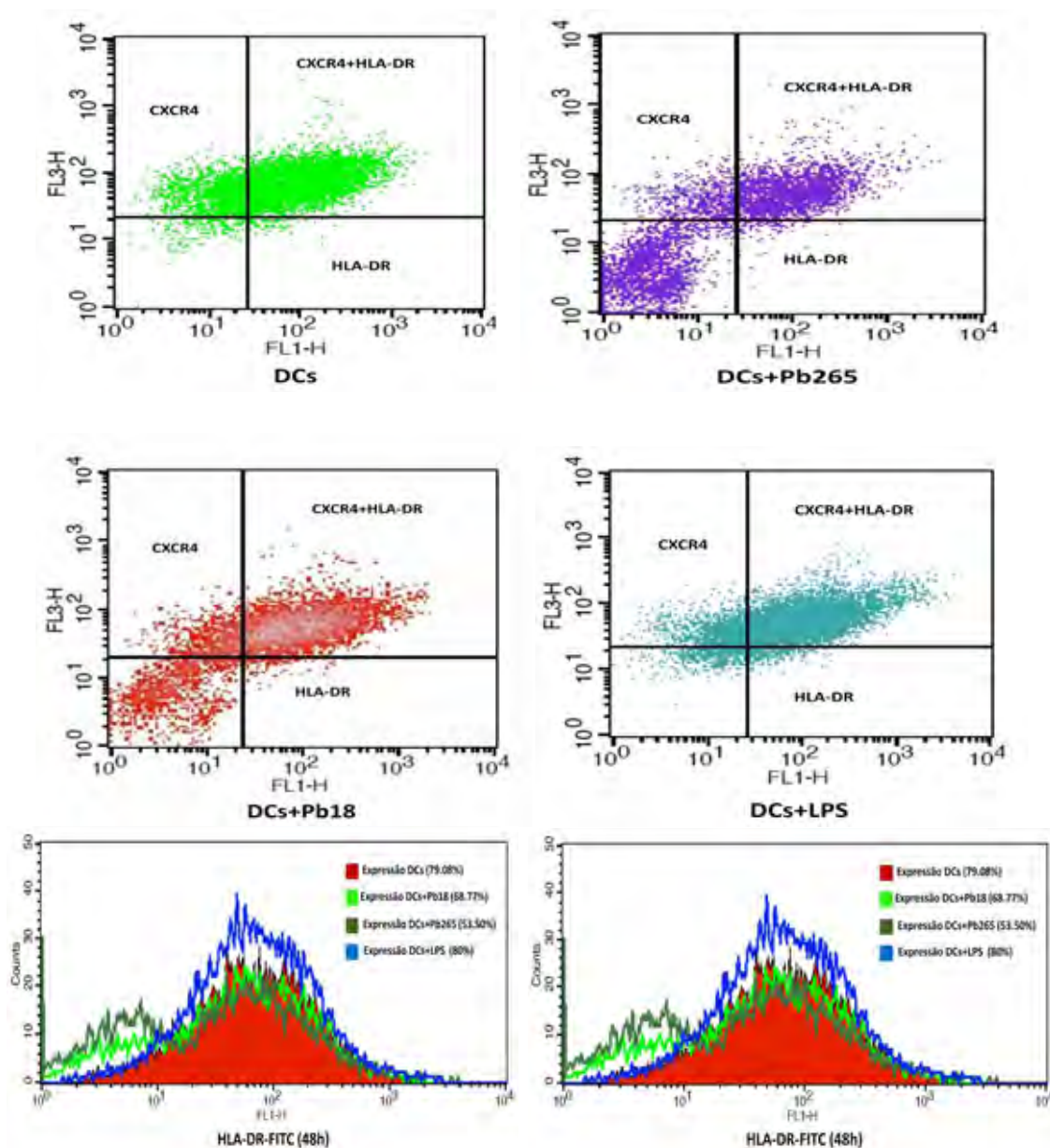
o  $p < 0.05$  x DCs x LPS



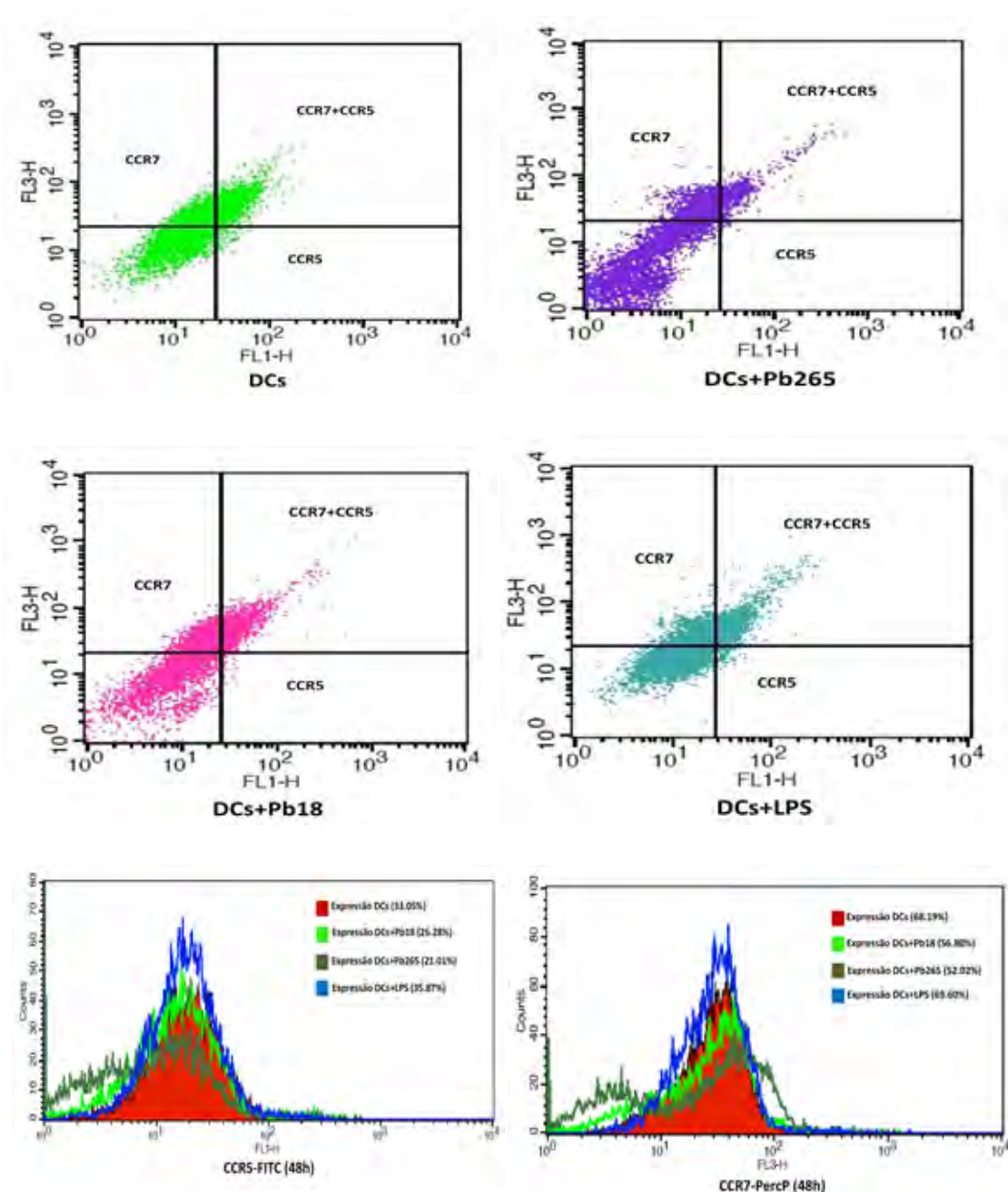
**FIGURA 12:** “Dot plots” e histogramas mostrando a porcentagem de MO-DCs controle (não desafiadas) ou desafiadas com Pb18 ou Pb265 (Proporção DCs:Pb – 5:1) ou LPS (5 ug/mL) por 48 h que expressaram CD40 e CD80. Os gráficos são representativos de um experimento de 4 experimentos independentes com DCs de diferentes doadores.



**FIGURA 13:** “Dot plots” e histogramas mostrando a porcentagem de MO-DCs controle (não desafiadas) ou desafiadas com Pb18 ou Pb265 (Proporção DCs:Pb – 5:1) ou LPS (5 ug/mL) por 48 h que expressaram CD83 e CD86. Os gráficos são representativos de um experimento de 4 experimentos independentes com DCs de diferentes doadores.



**FIGURA 14:** “Dot plots” e histogramas mostrando a porcentagem de MO-DCs controle (não desafiadas) ou desafiadas com Pb18 ou Pb265 (Proporção DCs:Pb – 5:1) ou LPS (5 ug/mL) por 48 h que expressaram HLA-DR e CXCR4. Os gráficos são representativos de um experimento de 4 experimentos independentes com DCs de diferentes doadores.

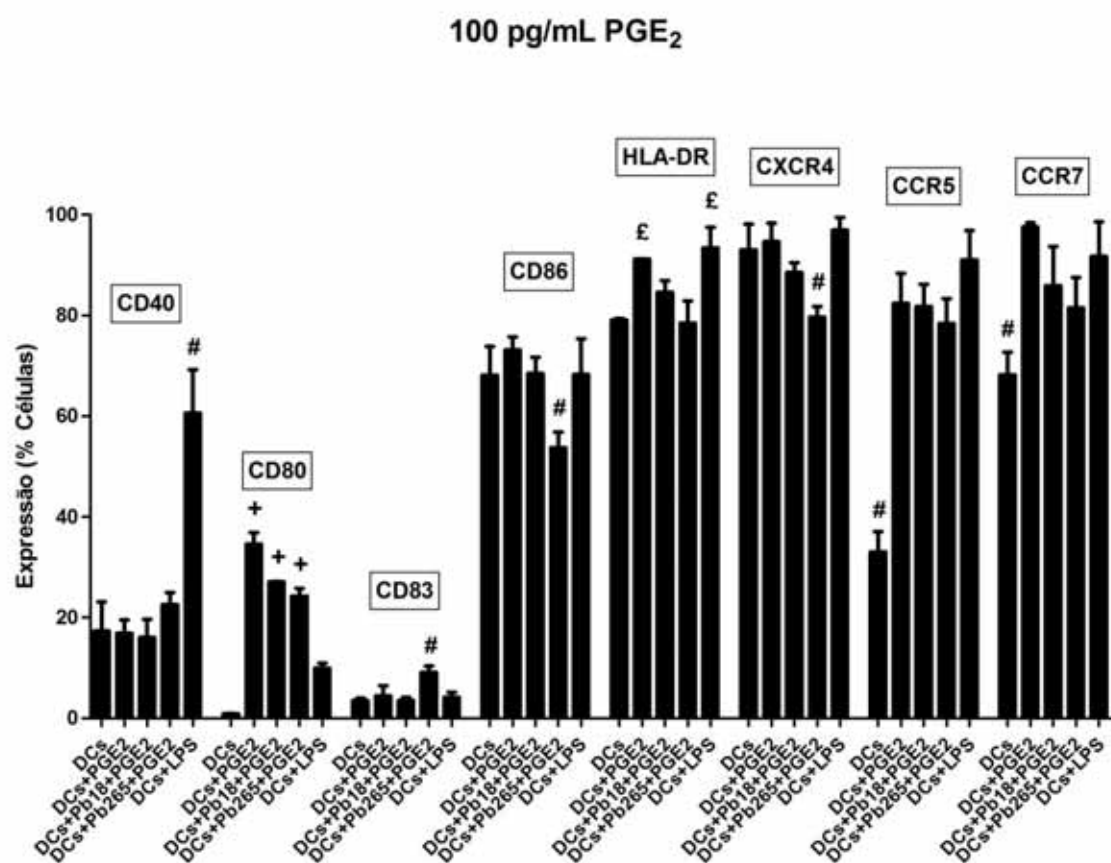


**FIGURA 15:** “Dot plots” e histogramas mostrando a porcentagem de MO-DCs controle (não desafiadas) ou desafiadas com Pb18 ou Pb265 (Proporção DCs:Pb – 5:1) ou LPS (5 ug/mL) por 48 h que expressaram CCR5 e CCR7. Os gráficos são representativos de um experimento de 4 experimentos independentes com DCs de diferentes doadores.

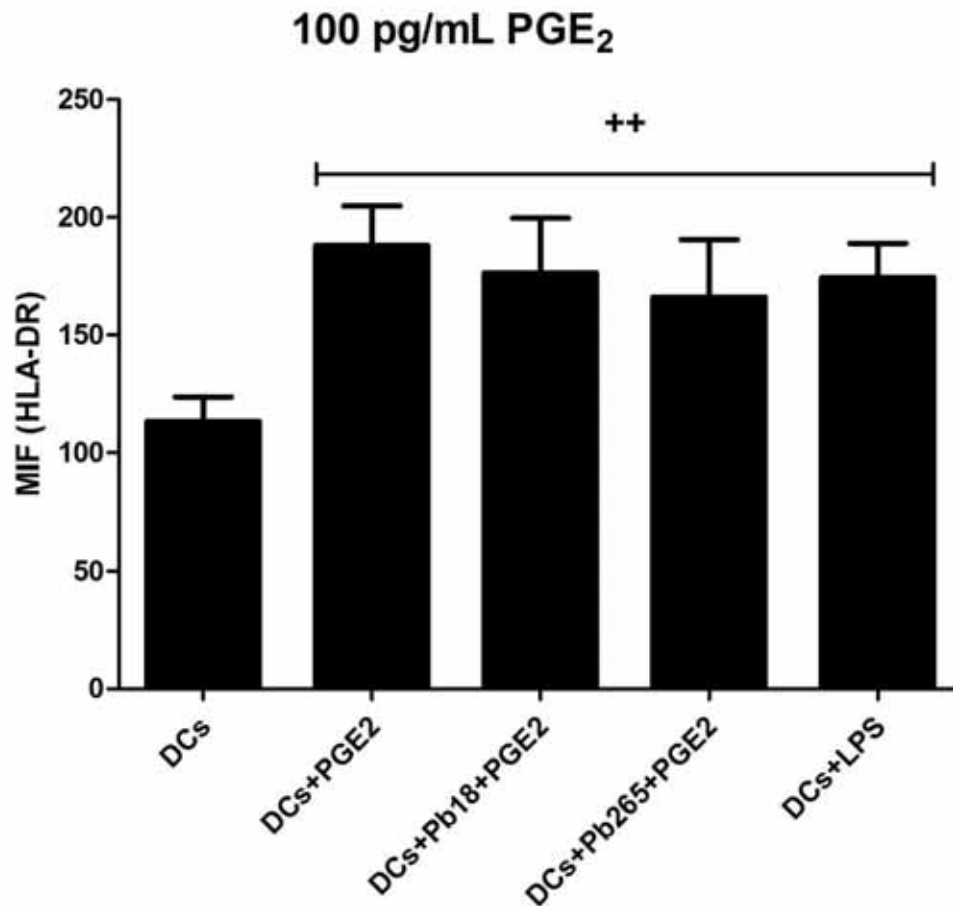
### 3.6. Efeito do tratamento com PGE<sub>2</sub> exógena sobre a maturação fenotípica de DCs não desafiadas ou desafiadas com Pb18 ou Pb265

Os resultados até o momento mostraram uma associação entre inibição da produção de PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> pelo fungo e sua incapacidade de induzir maturação de células dendríticas. Para efetivamente demonstrarmos que o fungo por inibir a produção de PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> não induz maturação dessas células utilizamos uma abordagem experimental na qual as culturas foram tratadas com PGE<sub>2</sub> exógena e avaliadas quanto a expressão dos diversos marcadores fenotípicos. Na Fig.16a, são mostrados os resultados relativos à porcentagem de células que expressaram tais marcadores. Podemos observar que a incubação das células com PGE<sub>2</sub> exógena não alterou de forma significativa a expressão das moléculas CD40 e CD83. No entanto, uma alteração significativa foi detectada em relação às outras moléculas. No caso da CD80, CCR5 e CCR7, após a incubação com PGE<sub>2</sub> as culturas não desafiadas ou desafiadas com as duas cepas do fungo mostram um aumento significativo na expressão dessas moléculas. Esse perfil de resposta foi bastante diferente do detectado quando as células foram incubadas somente com as duas cepas do fungo (Fig. 14) no qual detectamos expressão muito baixa de CD80 em todas as culturas e expressão diminuída de CD86, HLA-DR, CXCR4, CCR5 e CCR7 nas células desafiadas com o fungo em relação às DCs controles. Na fig.16b, está expresso a média de intensidade de fluorescência (MIF) da molécula HLA-DR. Observamos aumento significativo do número dessas moléculas quando as DCs foram tratadas com PGE<sub>2</sub> exógena. Esses resultados mostram que a adição de PGE<sub>2</sub> exógena aumentou a expressão da grande maioria das moléculas envolvidas na maturação das DCs, compensando os efeitos de inibição da produção desse mediador induzida pelo fungo, além de aumentar de modo significativo a MIF da molécula HLA-DR, sugerindo fortemente que a não indução de maturação das DCs pelo *P.brasiliensis* pode estar relacionada com a sua capacidade de inibir a produção desses mediadores. Nas figuras 17, 18, 19 e 20 são mostrados os dots plots e histogramas representativos da avaliação das porcentagens de células que expressam CD40 e CD80, CD83 e CD86, HLA-DR e CXCR4 e CCR5 e CCR7, respectivamente.

a)



b)



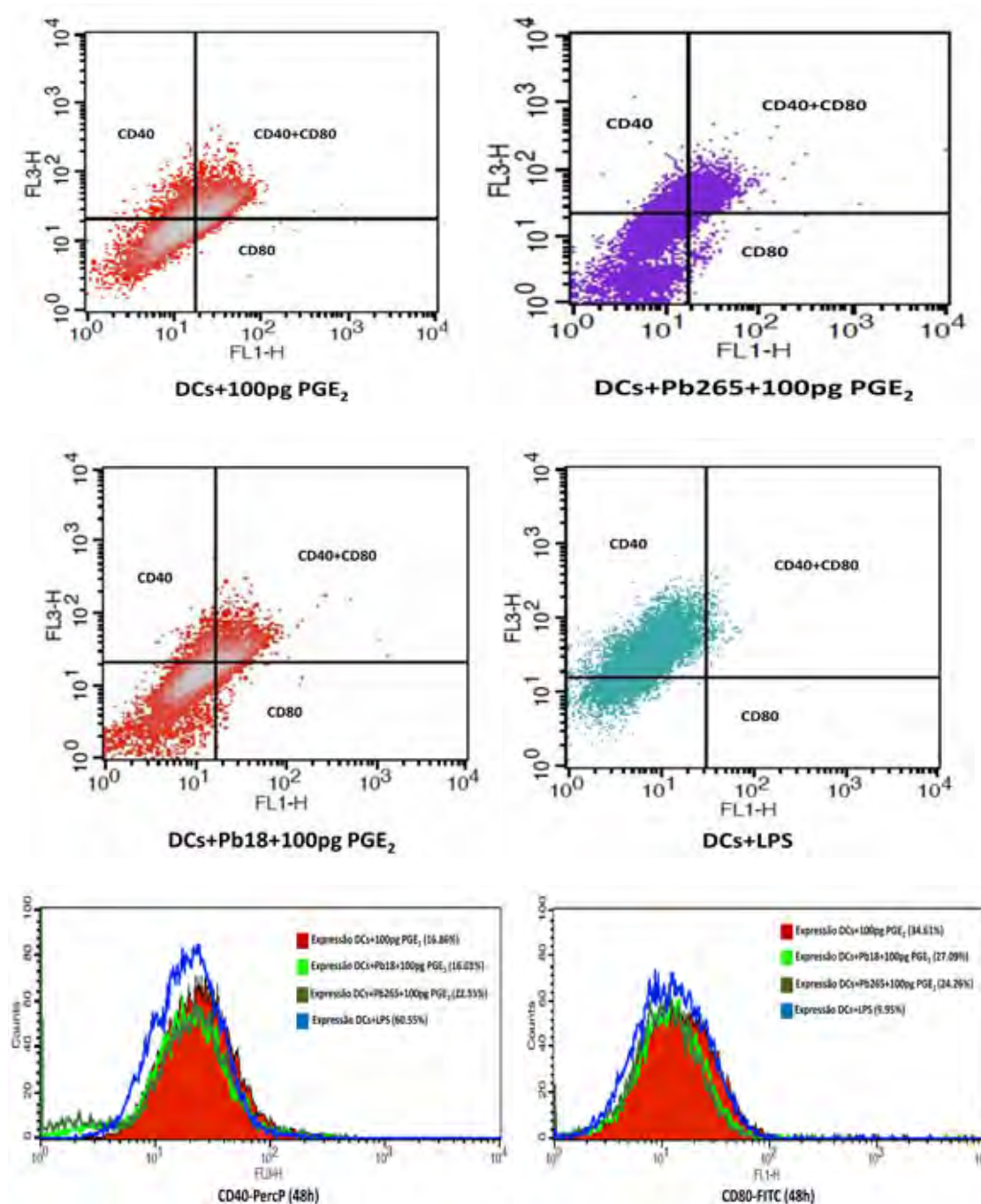
**FIGURA 16:** a) Efeito do tratamento com PGE<sub>2</sub> exógena sobre a porcentagem de DCs controles ou desafiadas com Pb18 ou Pb265 que expressaram CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR, CXCR4, CCR5 e CCR7. b) Efeito do tratamento com PGE<sub>2</sub> exógena sobre a MIF da molécula HLA-DR. Os valores são expressos em média  $\pm$  desvio padrão de resultados obtidos com células de 4 indivíduos.

#  $p < 0.05$  x todos os tratamentos

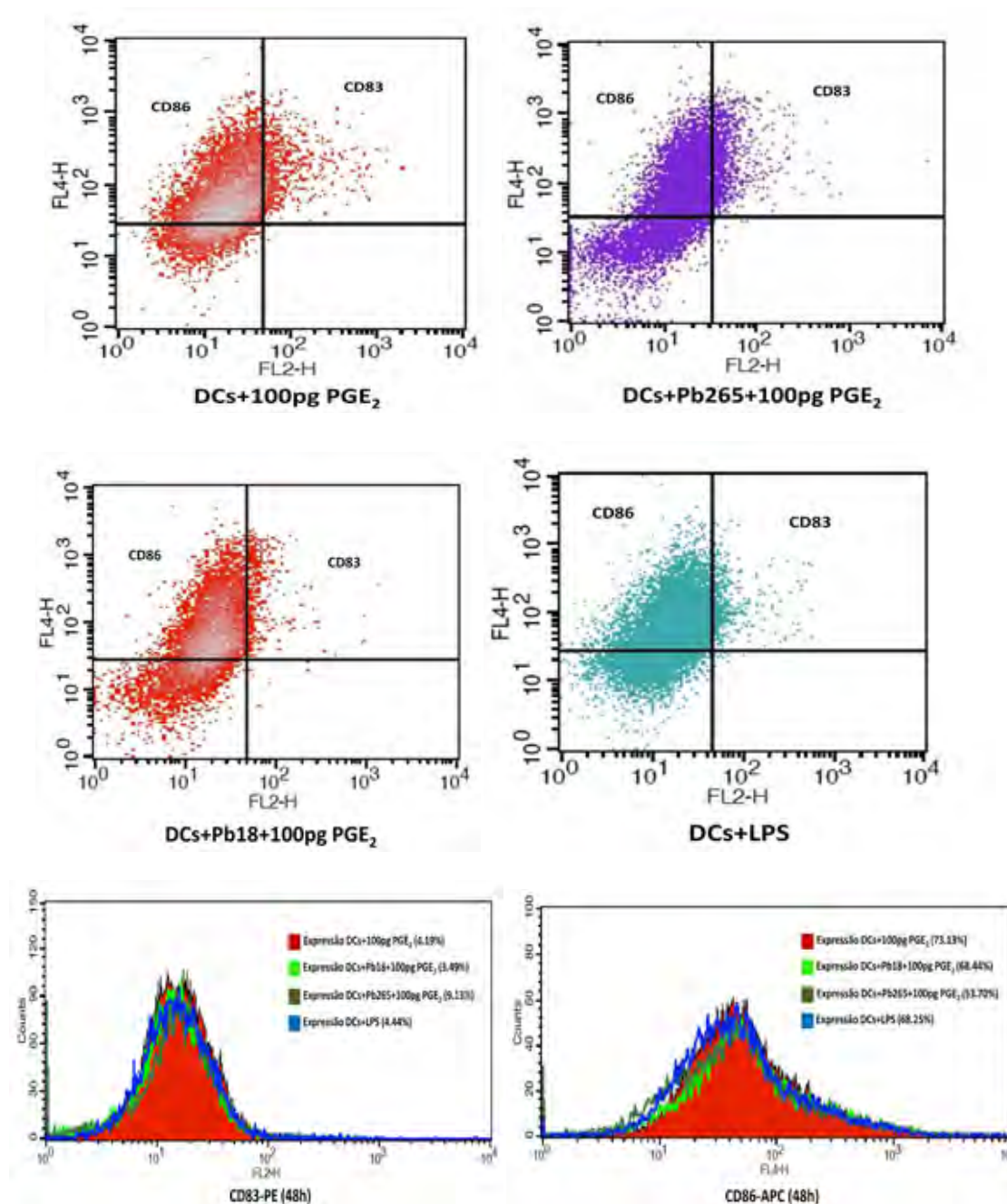
+  $p < 0.05$  x DCs e DCs + LPS

£  $p < 0.05$  x DCs

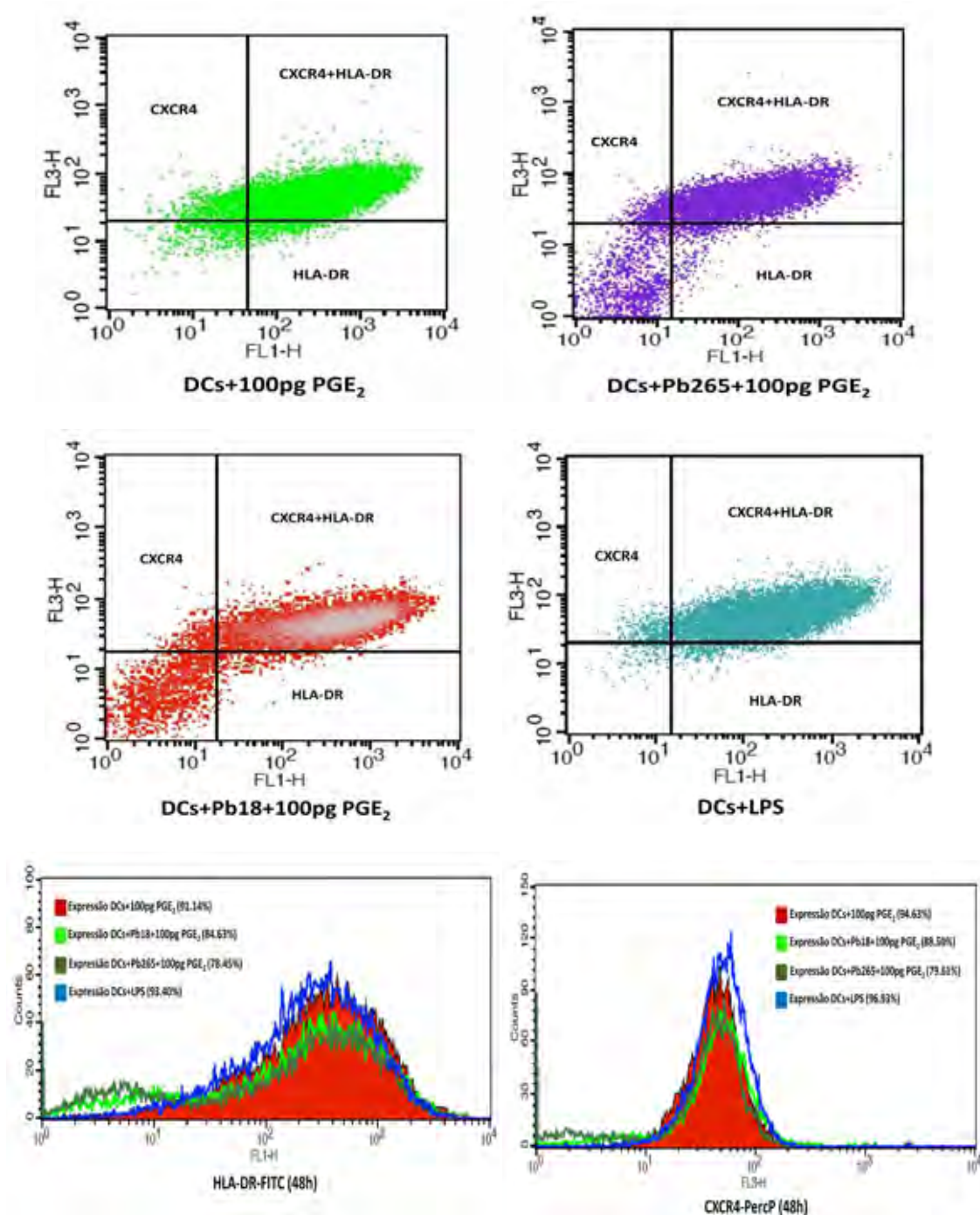
++  $p < 0.05$  x DCs



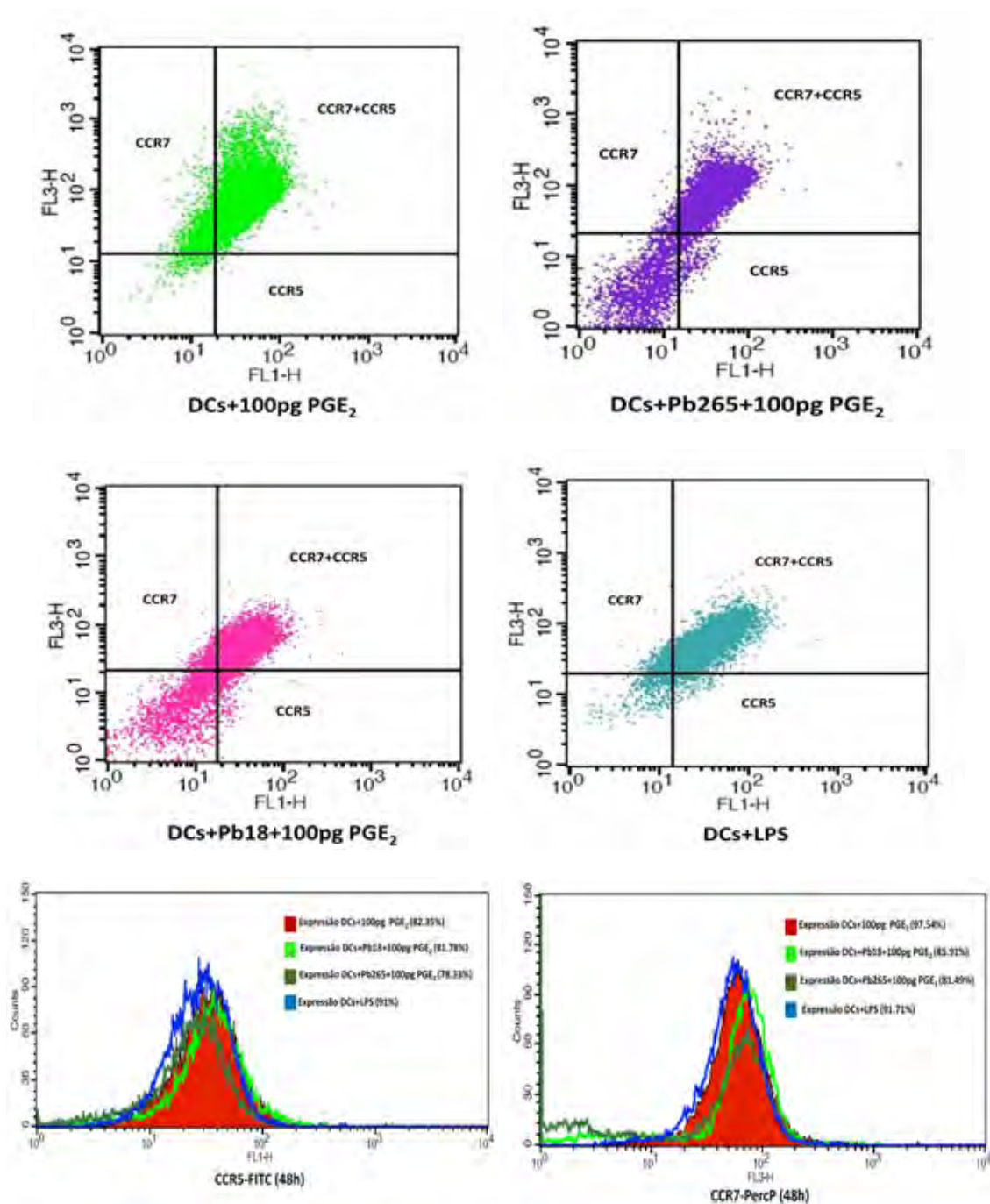
**FIGURA 17:** “Dot plots” e histogramas mostrando a porcentagem de MO-DCs controle (não desafiadas e tratadas com 100 pg PGE<sub>2</sub>) ou desafiadas com Pb18 ou Pb265 e tratadas com 100 pg PGE<sub>2</sub> (Proporção DCs:Pb – 5:1) ou LPS (5 ug/mL) por 48 h que expressaram CD40 e CD80. Os gráficos são representativos de um experimento de 4 experimentos independentes com DCs de diferentes doadores.



**FIGURA 18:** “Dot plots” e histogramas mostrando a porcentagem de MO-DCs controle (não desafiadas e tratadas com 100 pg PGE<sub>2</sub>) ou desafiadas com Pb18 ou Pb265 e tratadas com 100 pg PGE<sub>2</sub> (Proporção DCs:Pb – 5:1) ou LPS (5 ug/mL) por 48 h que expressaram CD83 e CD86. Os gráficos são representativos de um experimento de 4 experimentos independentes com DCs de diferentes doadores.



**FIGURA 19:** “Dot plots” e histogramas mostrando a porcentagem de MO-DCs controle (não desafiadas e tratadas com 100 pg PGE<sub>2</sub>) ou desafiadas com Pb18 ou Pb265 e tratadas com 100 pg PGE<sub>2</sub> (Proporção DCs:Pb – 5:1) ou LPS (5 ug/mL) por 48 h que expressaram HLA-DR e CXCR4. Os gráficos são representativos de um experimento de 4 experimentos independentes com DCs de diferentes doadores.

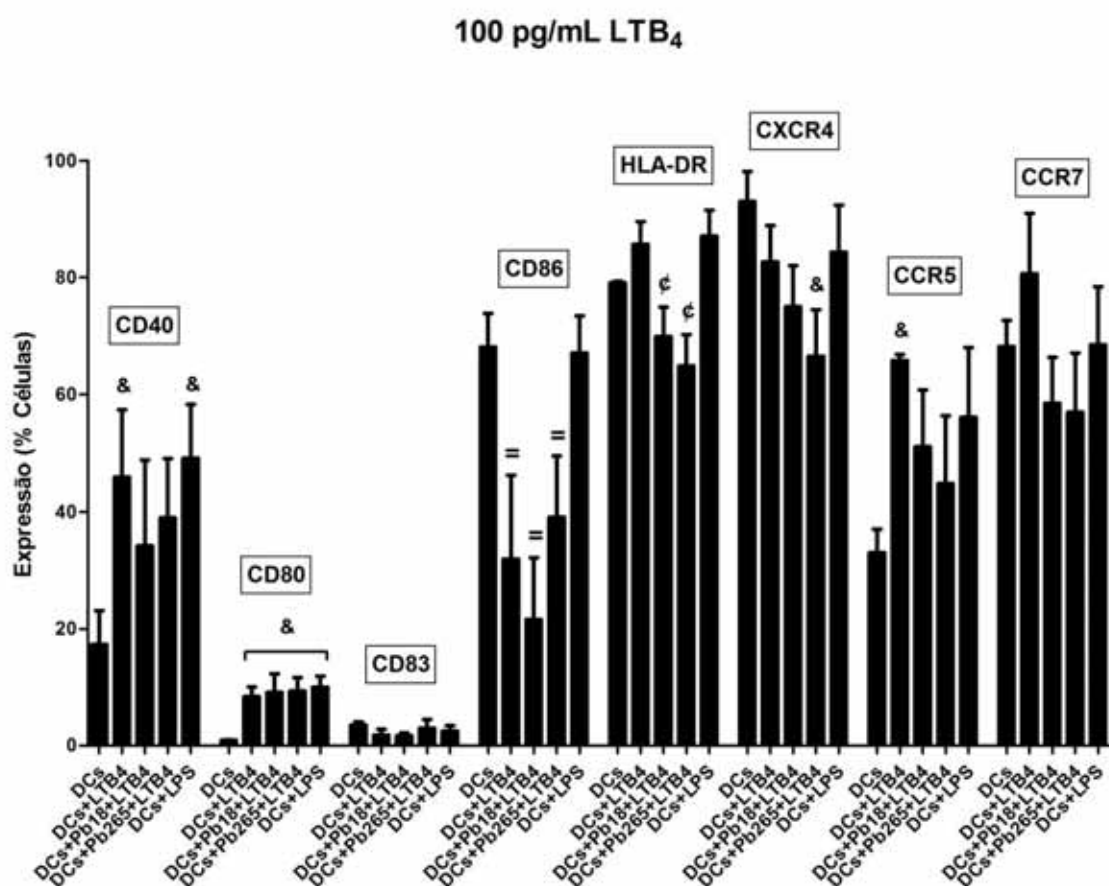


**FIGURA 20:** “Dot plots” e histogramas mostrando a porcentagem de MO-DCs controle (não desafiadas e tratadas com 100 pg PGE<sub>2</sub>) ou desafiadas com Pb18 ou Pb265 e tratadas com 100 pg PGE<sub>2</sub> (Proporção DCs:Pb – 5:1) ou LPS (5 ug/mL) por 48 h que expressaram CCR5 e CCR7. Os gráficos são representativos de um experimento de 4 experimentos independentes com DCs de diferentes doadores.

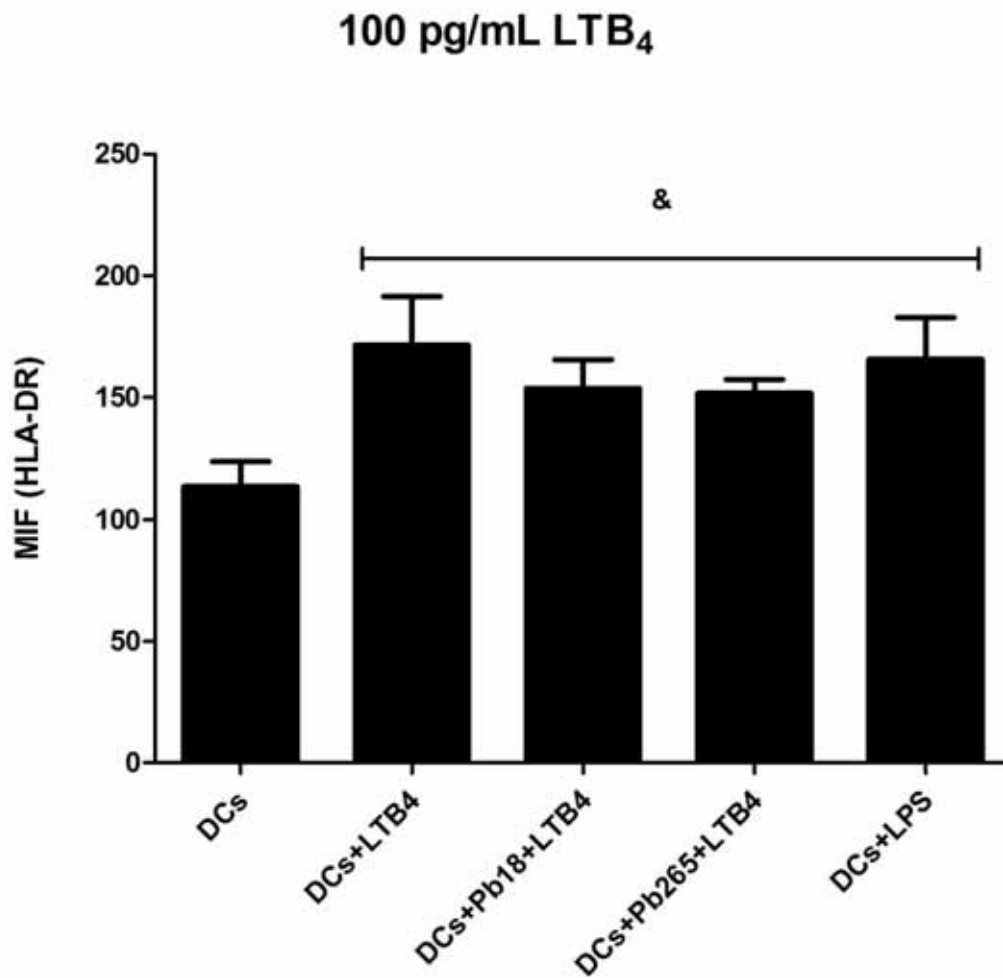
### 3.7. Efeito do tratamento com LTB<sub>4</sub> exógeno sobre a maturação fenotípica de DCs não desafiadas ou desafiadas com Pb18 ou Pb265

Da mesma forma que a PGE<sub>2</sub>, testamos o efeito do tratamento com LTB<sub>4</sub> exógeno. Resultados importantes foram detectados em relação às moléculas CD40, CD80 e CCR5 cujas porcentagens de DCs controle e desafiadas com o fungo que expressam essas moléculas aumentaram ou tenderam a aumentar após o tratamento. Além do aumento da porcentagem de células, detectamos um aumento significativo na MIF da molécula HLA-DR (Fig. 21 b) mostrando um perfil de resposta bastante diferente da detectada com as células somente desafiadas (Fig. 11) nas quais houve uma diminuição da expressão dessas moléculas. Assim da mesma forma que o discutido para a PGE<sub>2</sub>, podemos considerar que a não maturação das DCs pelo fungo envolve a inibição da produção de LTB<sub>4</sub>. Nas figuras 22, 23, 24 e 25 são mostrados dot plots e histogramas representativos da avaliação das porcentagens de células que expressam CD40 e CD80, CD83 e CD86, HLA-DR e CXCR4, e CCR5 e CCR7, respectivamente.

a)



b)

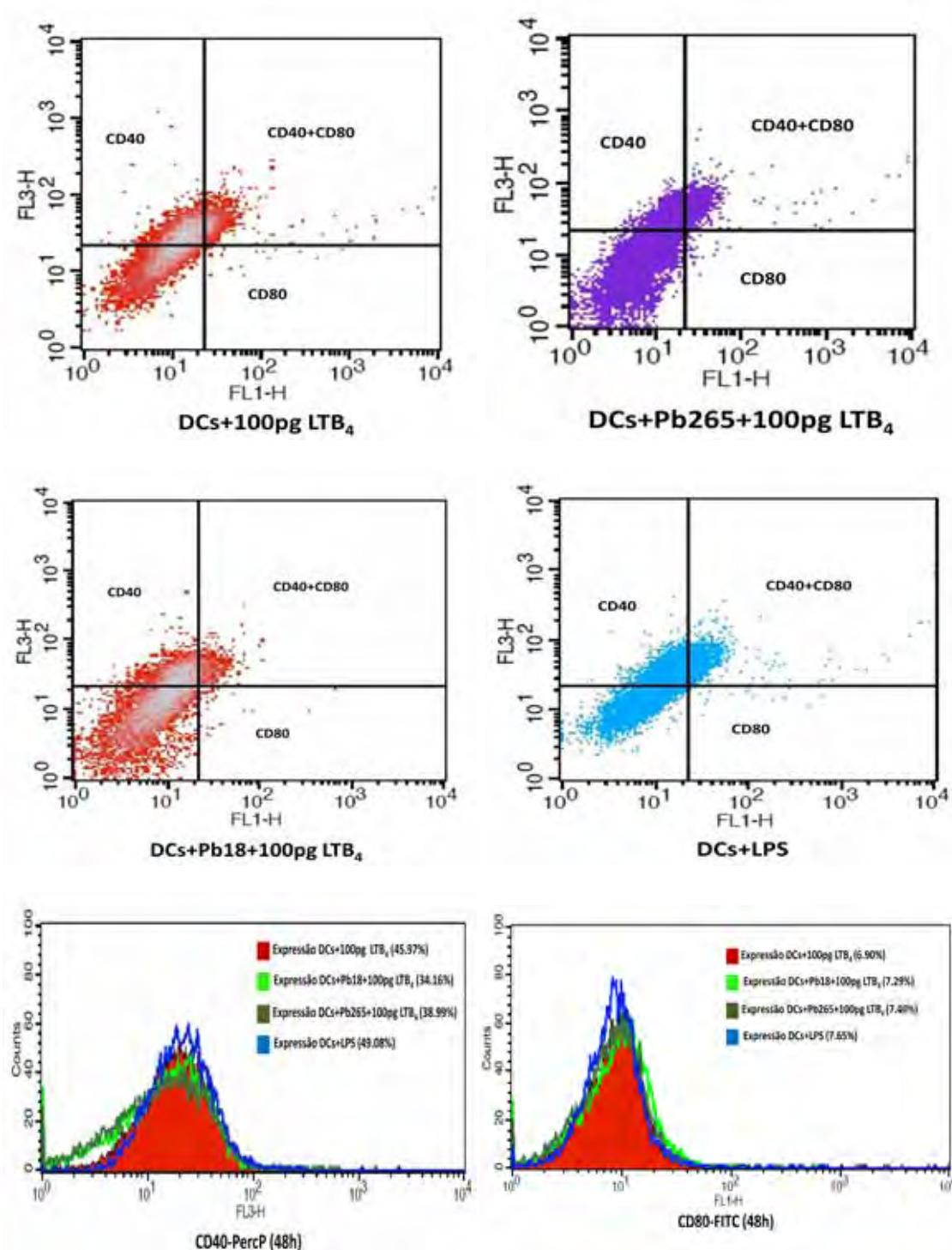


**FIGURA 21:** a) Efeito do tratamento com LTB<sub>4</sub> exógeno sobre a porcentagem de DCs controles ou desafiadas com Pb18 ou Pb265 que expressaram CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR, CXCR4, CCR5 e CCR7. b) Efeito do tratamento com LTB<sub>4</sub> exógeno sobre a MIF da molécula HLA-DR. Os valores são expressos em média  $\pm$  desvio padrão de resultados obtidos com células de 4 indivíduos.

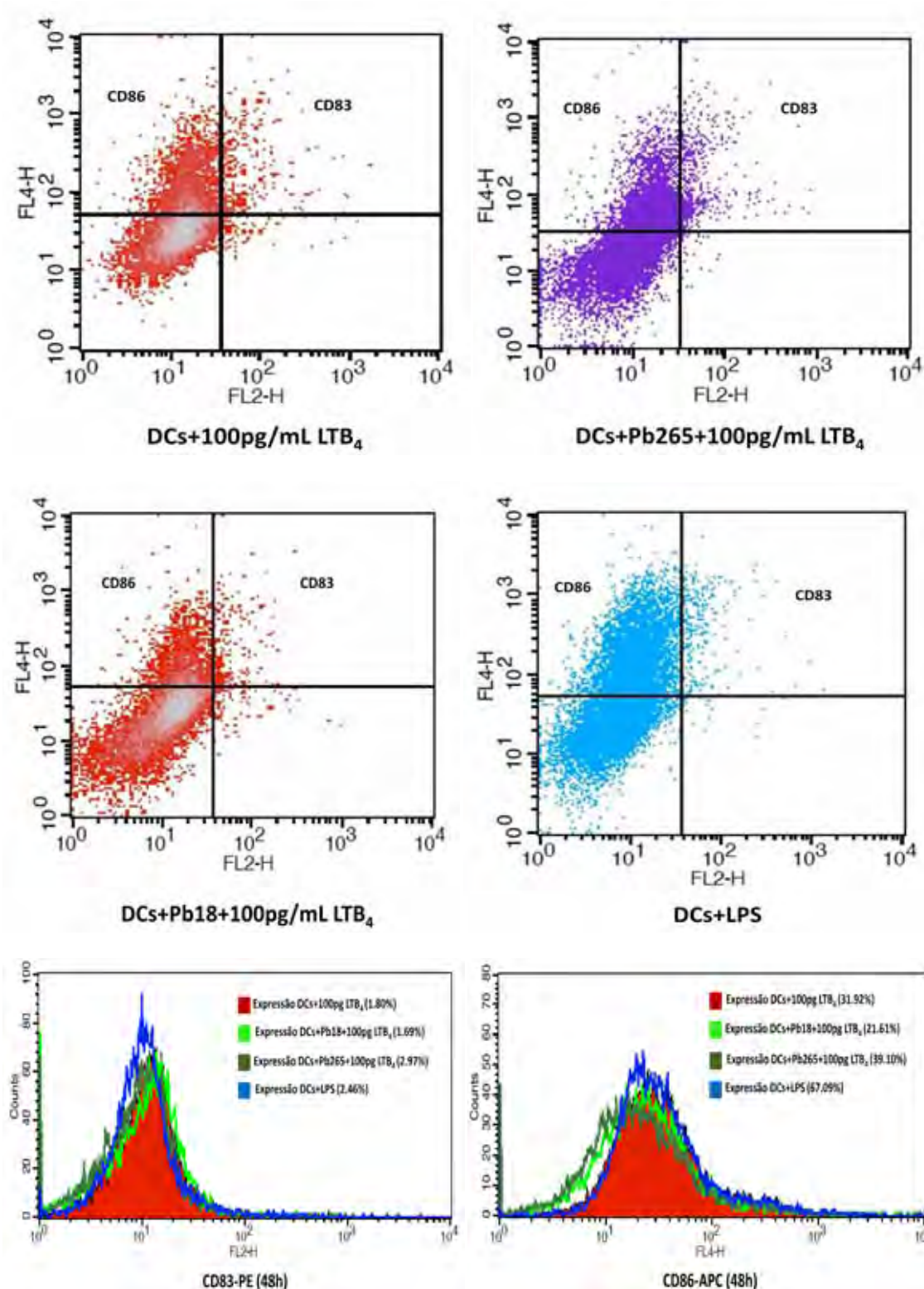
&  $p < 0.05$  x DCs

=  $p < 0.05$  x DCs x DCs+LPS

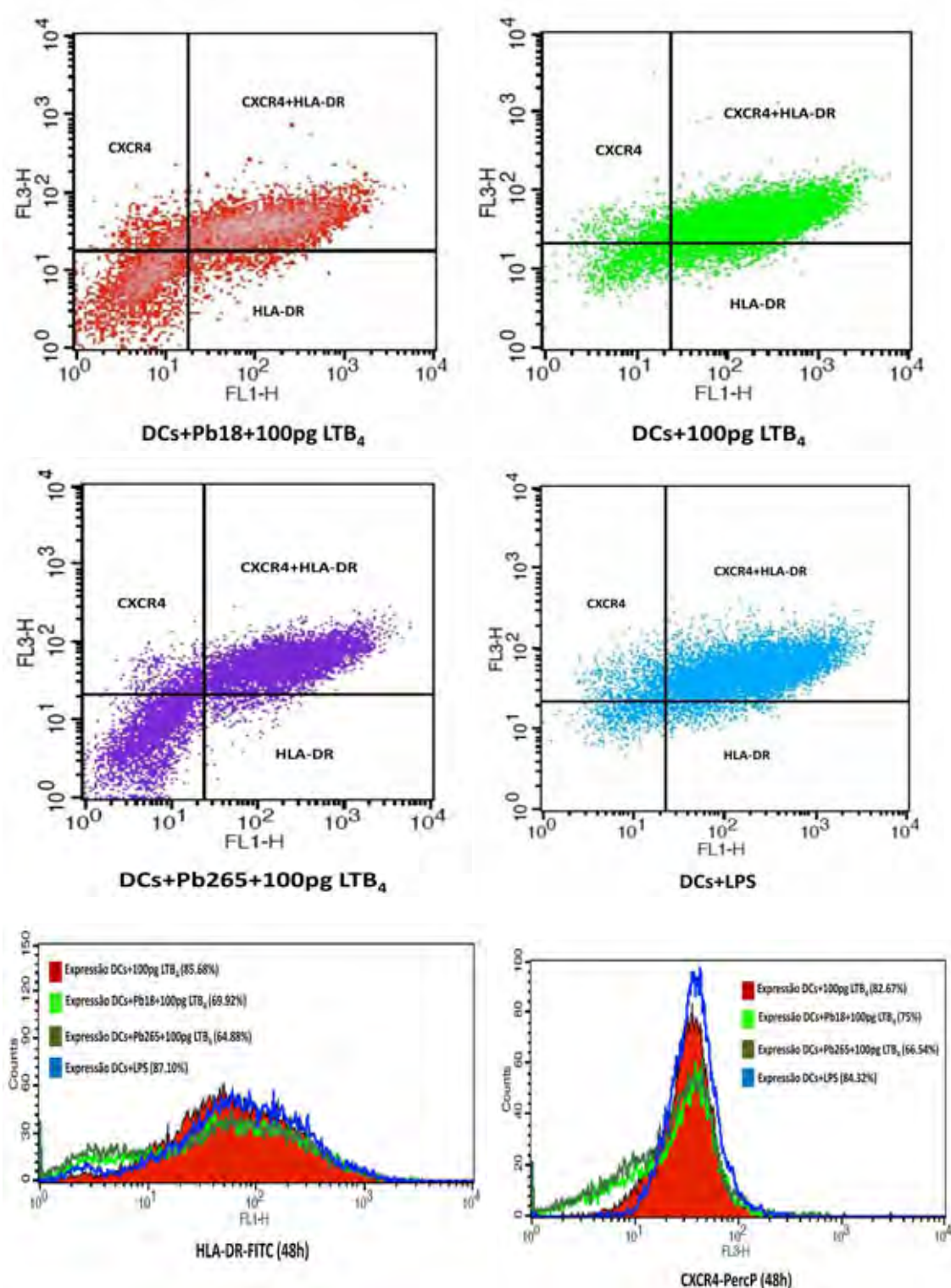
¢  $p < 0.05$  x DCs+LPS



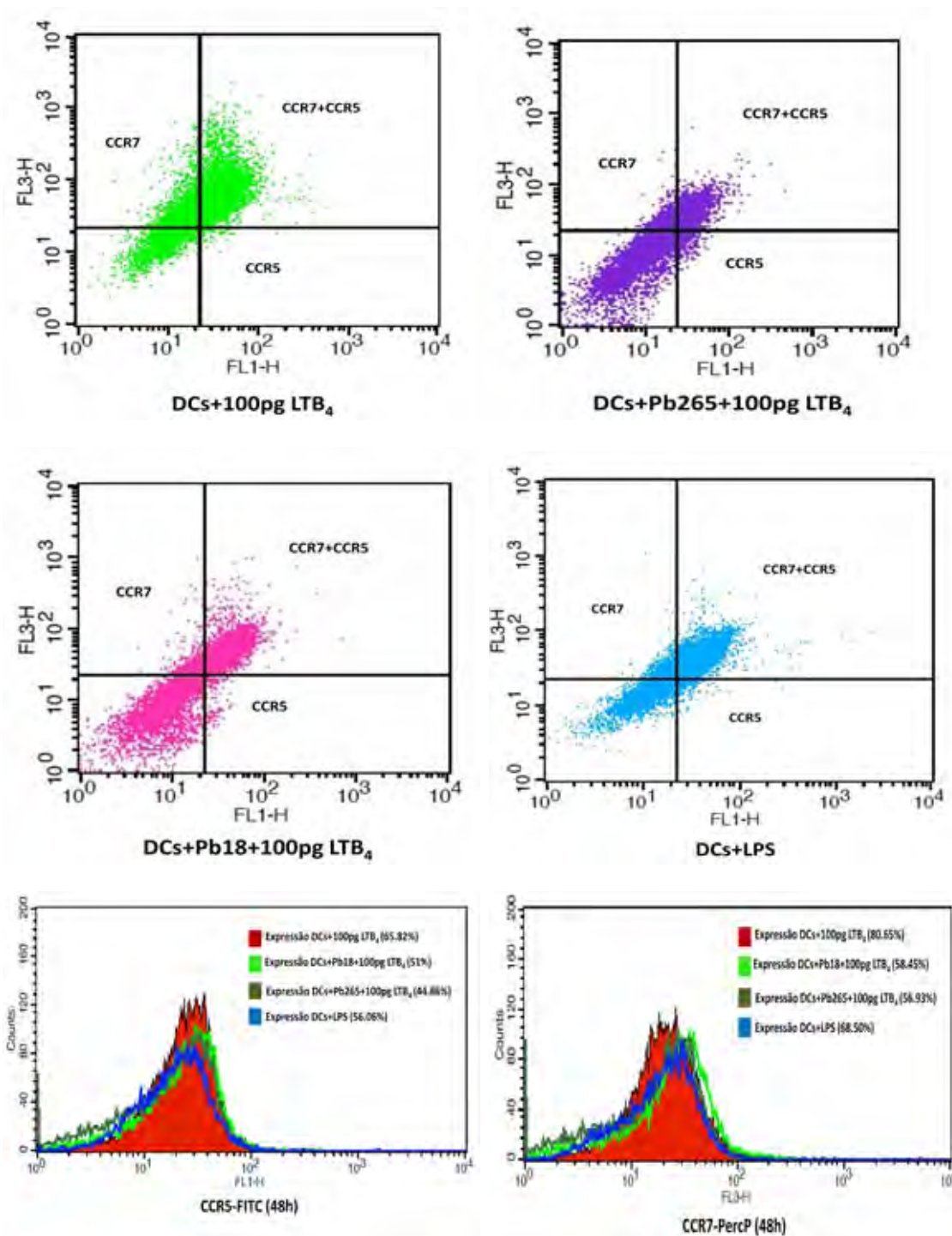
**FIGURA 22:** “Dot plots” e histogramas mostrando a porcentagem de MO-DCs controle (não desafiadas e tratadas com 100 pg LTB<sub>4</sub>) ou desafiadas com Pb18 ou Pb265 e tratadas com 100 pg LTB<sub>4</sub> (Proporção DCs:Pb – 5:1) ou LPS (5 ug/mL) por 48 h que expressaram CD40 e CD80. Os gráficos são representativos de um experimento de 4 experimentos independentes com DCs de diferentes doadores.



**FIGURA 23:** “Dot plots” e histogramas mostrando a porcentagem de MO-DCs controle (não desafiadas e tratadas com 100 pg LTB<sub>4</sub>) ou desafiadas com Pb18 ou Pb265 e tratadas com 100 pg LTB<sub>4</sub> (Proporção DCs:Pb – 5:1) ou LPS (5 ug/mL) por 48 h que expressaram CD83 e CD86. Os gráficos são representativos de um experimento de 4 experimentos independentes com DCs de diferentes doadores.



**FIGURA 24:** “Dot plots” e histogramas mostrando a porcentagem de MO-DCs controle (não desafiadas e tratadas com 100 pg LTB<sub>4</sub>) ou desafiadas com Pb18 ou Pb265 e tratadas com 100 pg LTB<sub>4</sub> (Proporção DCs:Pb – 5:1) ou LPS (5 ug/mL) por 48 h que expressaram HLA-DR e CXCR4. Os gráficos são representativos de um experimento de 4 experimentos independentes com DCs de diferentes doadores.

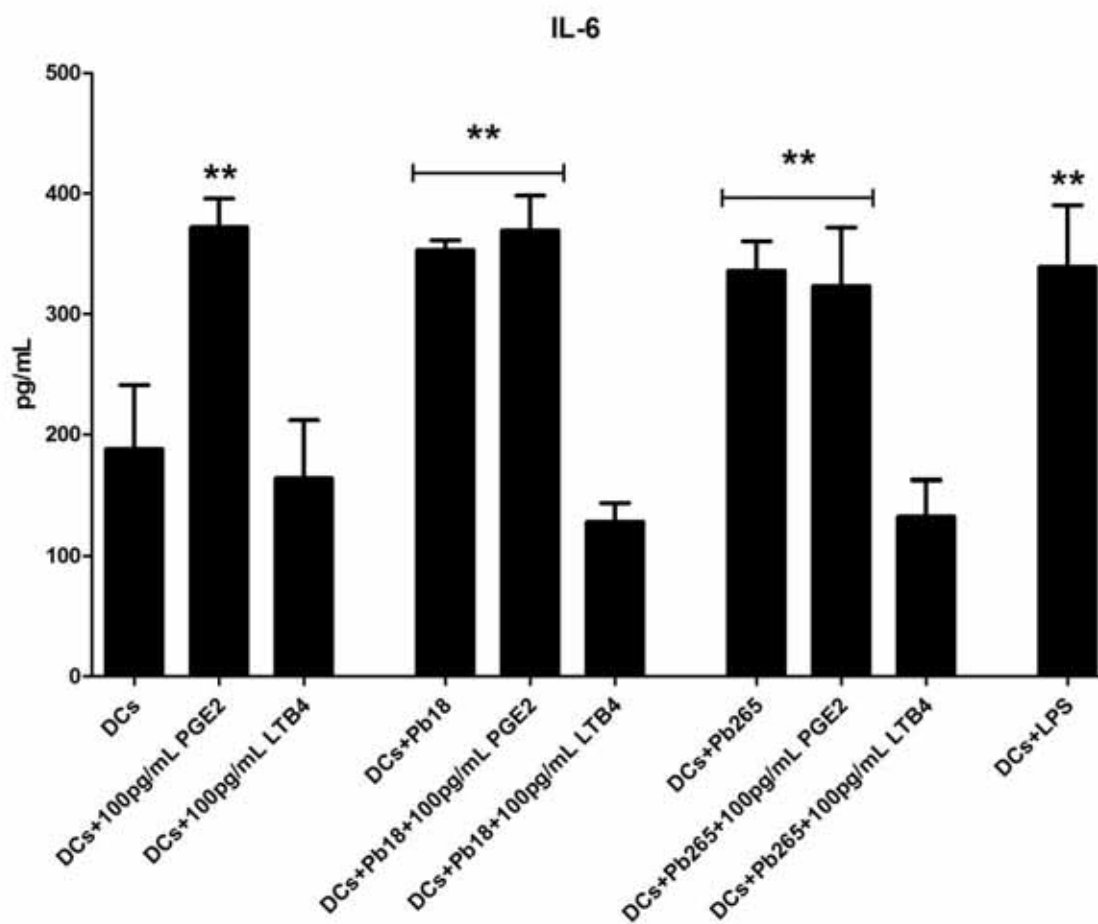


**FIGURA 25:** “Dot plots” e histogramas mostrando a porcentagem de MO-DCs controle (não desafiadas e tratadas com 100 pg LTB<sub>4</sub>) ou desafiadas com Pb18 ou Pb265 e tratadas com 100 pg LTB<sub>4</sub> (Proporção DCs:Pb – 5:1) ou LPS (5 ug/mL) por 48 h que expressaram CCR5 e CCR7. Os gráficos são representativos de um experimento de 4 experimentos independentes com DCs de diferentes doadores.

### 3.8. Produção de citocinas IL-6, IL-10, IL-12, IL-23 e TNF- $\alpha$ pelas DCs

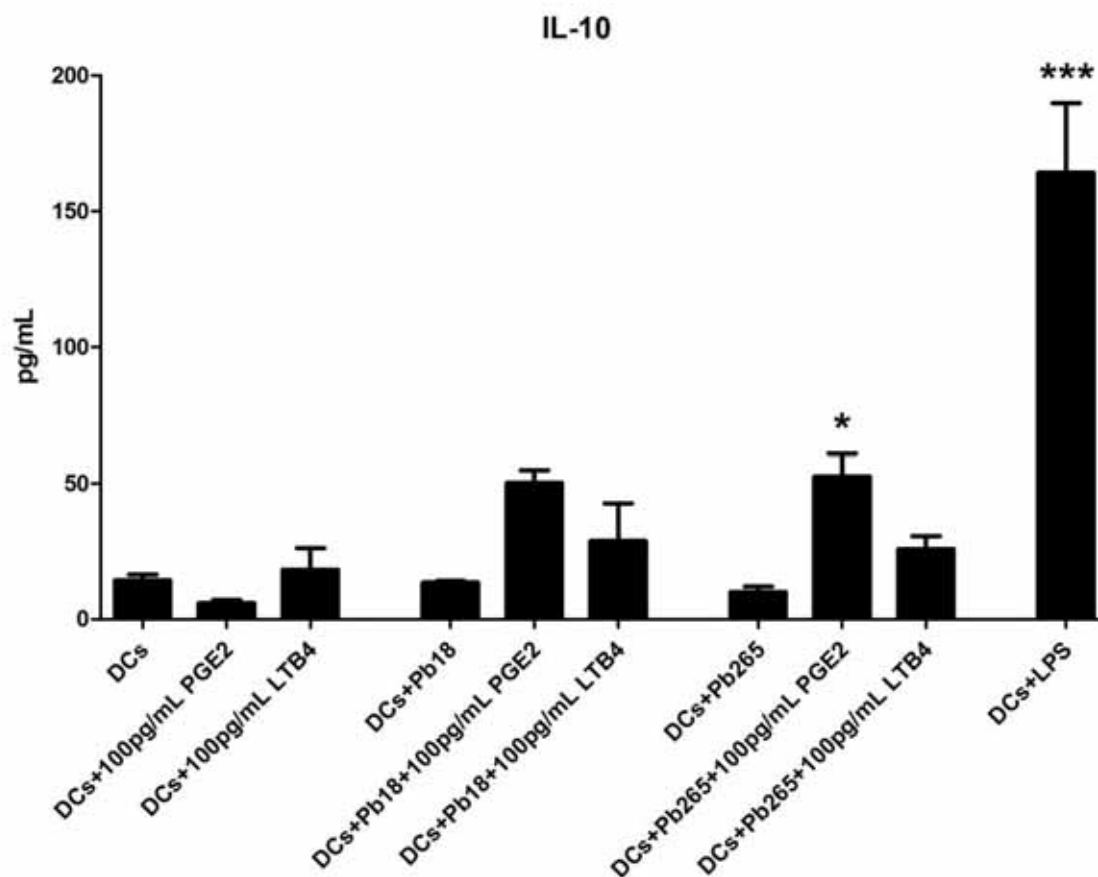
Após detectado que as duas cepas do fungo inibem a produção de PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> e consequentemente interfere na maturação das MO-DCs por meio da inibição ou não indução da expressão de várias moléculas de superfície, nosso próximo objetivo foi avaliar a consequência dessa inibição na produção de citocinas pelas DCs. Em nossos experimentos não constatamos a presença de IL-12p70 e IL-23 nas DCs desafiadas ou não com Pb18 e Pb265 e nas DCs tratadas ou não com PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> no período de 48h. Por outro lado, detectamos a produção de IL-23 quando as DCs foram desafiadas com LPS no mesmo período (resultados não mostrados).

Apesar disso, a produção de IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  (fig. 26, 27 e 28, respectivamente) foi detectada em várias situações. As DCs apresentaram níveis basais de IL-6 e quando tratadas com PGE<sub>2</sub> ou desafiadas com ambas as cepas ou LPS, ou ainda desafiadas com o fungo e tratadas com PGE<sub>2</sub>, aumentaram de modo significativo a produção desta citocina. Ao contrário, quando as DCs foram tratadas com LTB<sub>4</sub> não houve aumento da produção nem mesmo quando as DCs foram desafiadas com o fungo, que como nós mostramos é capaz de induzir a liberação desta citocina. Nesse caso, o LTB<sub>4</sub> apresentou um papel inibidor da IL-6 nas DCs que receberam o desafio, tanto com a cepa 18 quanto com a 265 (Fig. 26). Quanto à produção de IL-10, também foram detectados níveis basais na DCs controle e quando essas células foram tratadas com PGE<sub>2</sub> ou LTB<sub>4</sub>, ou então desafiadas com ambas as cepas, não detectamos aumento da produção desta citocina. Diferentemente, quando as DCs foram desafiadas com a cepa Pb18 e tratadas com PGE<sub>2</sub> houve uma tendência a aumentar a produção de IL-10 e um aumento significativo da produção quando as DCs foram desafiadas com a cepa Pb265 e tratadas com PGE<sub>2</sub>. O LPS também induziu produção significativa desta citocina (Fig. 27). A produção basal de TNF- $\alpha$  pelas DCs controle foi muito baixa, mas após desafiadas com Pb18 ou Pb265 ou LPS houve aumento bastante significativo na produção desta citocina. Podemos observar também, que as DCs que foram desafiadas com ambas as cepas e tratadas com PGE<sub>2</sub> ou LTB<sub>4</sub> aumentaram de modo muito significativo a produção de TNF- $\alpha$ , níveis superiores aos das DCs somente desafiadas com o fungo e comparáveis aos níveis das DCs que receberam desafio com LPS (Fig. 28).



\*\*  $p < 0.001$  x DCs x todos os tratamentos

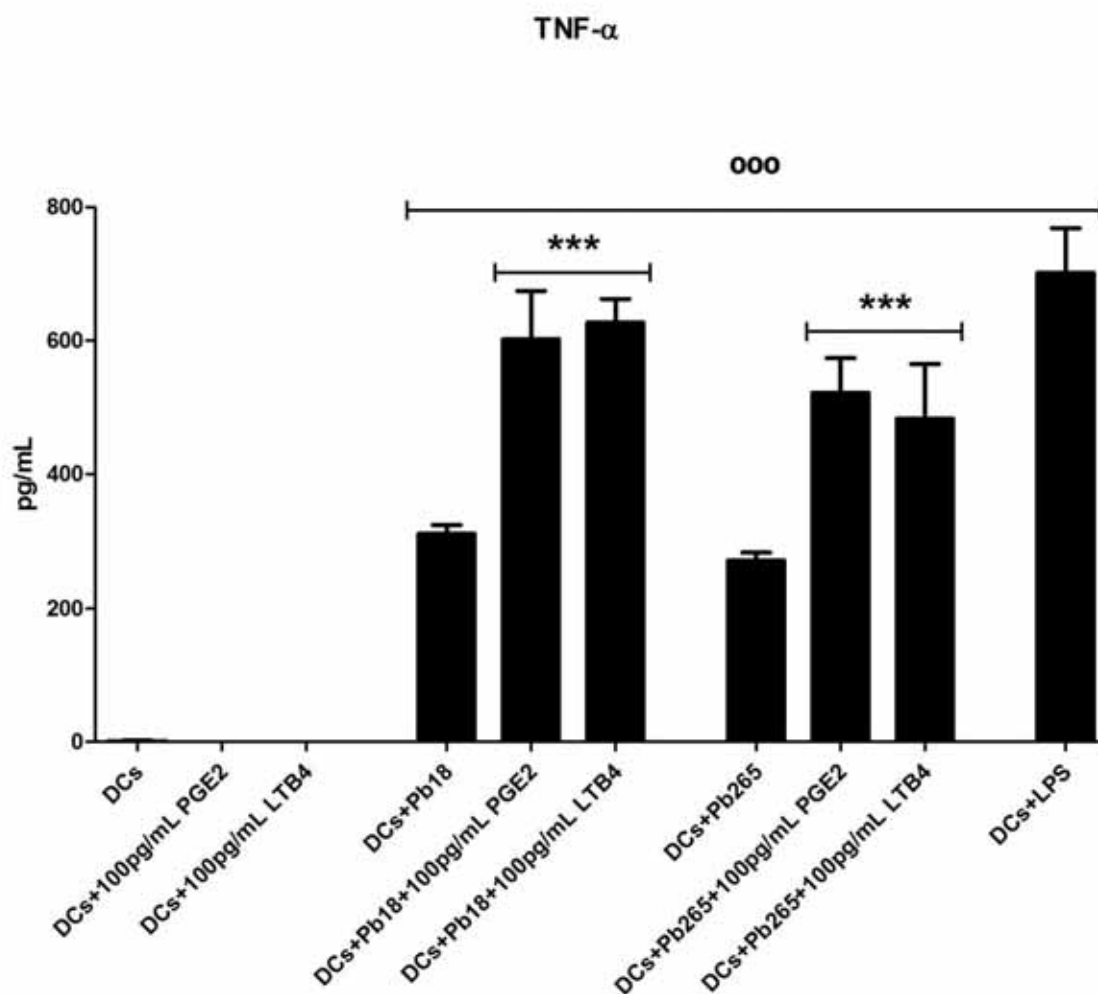
**FIGURA 26:** Produção de IL-6 por DCs tratadas ou não com PGE<sub>2</sub> ou LTB<sub>4</sub> exógenos (não desafiadas) ou desafiadas com Pb18 ou Pb265 (relação DCs:Pb de 5:1) e tratadas ou não com PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> exógenos por 48h. Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de resultados obtidos com células de 4 indivíduos.



\*  $p < 0.05$  x DCs x DCs+LTB<sub>4</sub>

\*\*\*  $p < 0.0001$  x todos os tratamentos

**FIGURA 27:** Produção de IL-10 por DCs tratadas ou não com PGE<sub>2</sub> ou LTB<sub>4</sub> exógenos (não desafiadas) ou desafiadas com Pb18 ou Pb265 (relação DCs:Pb de 5:1) e tratadas ou não com PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> exógenos por 48h. Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de resultados obtidos com células de 4 indivíduos.



\*\*\*  $p < 0.0001$  x DCs+Pb18 x DCs+Pb265

000  $p < 0.0001$  x DCs x DCs+tratamentos

**FIGURA 28:** Produção de TNF- $\alpha$  por DCs tratadas ou não com PGE<sub>2</sub> ou LTB<sub>4</sub> exógenos (não desafiadas) ou desafiadas com Pb18 ou Pb265 (relação DCs:Pb de 5:1) e tratadas ou não com PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> exógenos por 48h. Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de resultados obtidos com células de 4 indivíduos.

#### 4. DISCUSSÃO

Estudos sobre o papel modulador das PGs e LTs sobre a resposta de várias células do sistema imune ao *P. brasiliensis* são escassos, particularmente em relação às DCs. Nesse contexto, o presente estudo foi delineado tendo como objetivos avaliar se as DCs humanas produzem PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> em resposta ao desafio com cepas de alta ou baixa virulência do *P. brasiliensis*, a participação de PRRs nesse processo, assim como o papel modulador desses eicosanóides sobre a maturação fenotípica dessas células.

Os objetivos desse estudo foram justificados em função de resultados anteriores em nosso laboratório mostrando que as cepas Pb18 e Pb265 induzem a produção de PGs e LTs por monócitos, que de uma forma autócrina, inibem e ativam respectivamente, as atividades antifúngicas dessas células<sup>(30, 33, 34, 35)</sup>. Assim, discute-se que o fungo estaria induzindo a produção de PGE<sub>2</sub> por monócitos como um mecanismo de escape da destruição por essas células.

No entanto, no presente estudo, os resultados mostraram claramente, ao contrário do esperado, que tanto a cepa 18 como a 265 inibem a produção endógena de PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> pelas DCs. Adicionalmente, após o desafio com o fungo as células não apresentaram fenótipo de DCs maduras, isto é, não houve aumento significativo de moléculas importantes no processo de apresentação de antígenos por essas células como o HLA-DR, moléculas coestimulatórias como a CD40, CD80, CD83 e CD86 e receptores para quimiocinas importantes para a sua migração como CXCR4 e CCR7. Esta avaliação foi possível com base na porcentagem de DCs que expressaram essas moléculas e na média de intensidade de fluorescência (MIF) que permite avaliar se houve aumento ou não no número dessas moléculas em cada célula.

As moléculas CD40, CD80, CD83 e CD86 são moléculas coestimulatórias que estão expressas nas DCs de modo basal e o aumento destas é diretamente proporcional ao processo de maturação dessas células<sup>(36)</sup>. CD40 é uma molécula coestimulatória essencial na ativação de linfócitos T<sup>(37)</sup>, participando também dessa ativação CD80, CD86 e principalmente HLA-DR, a molécula pela qual a célula fagocítica apresenta o antígeno<sup>(38, 39)</sup>. A molécula CD83, além de participar da ativação de células T é o principal marcador de maturação das DCs<sup>(40)</sup>.

Esses resultados permitem sugerir que *in vivo*, após o contato com o fungo, essas células não tenham capacidade de migrar aos órgãos linfóides secundários, ativar linfócitos T e iniciar o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa. Assim, no caso das DCs, apesar de termos identificado um mecanismo contrário ao dos monócitos, nos quais o fungo aumenta a produção dos eicosanóides e suprime a resposta dessas células, podemos também sugerir que se trata de um mecanismo de escape do fungo uma vez que resulta em inibição das atividades dessas células.

Apesar de termos detectado uma clara associação entre a não indução de maturação e inibição dos dois eicosanóides necessitávamos comprovar que a não maturação era devido a falta de PGE<sub>2</sub> e/ou LTB<sub>4</sub>. Os ensaios de incubação das células com PGE<sub>2</sub> exógena mostraram que moléculas importantes como a CD80, CCR5 e CCR7 tiveram aumento de expressão em relação às células não tratadas, além de aumentar de modo significativo a MIF da molécula HLA-DR. Outras moléculas não tiveram aumento significativo da expressão e nem mesmo na MIF em relação às células controles, mas apresentaram expressão maior em relação às células desafiadas com o fungo, mas não tratadas com PGE<sub>2</sub> exógena. Assim, os resultados confirmaram que a PGE<sub>2</sub> desempenha um importante papel na maturação fenotípica das células dendríticas. Na literatura, os efeitos da PGE<sub>2</sub> sobre a maturação das DCs são altamente controversos. No entanto, alguns dados corroboram com nossos achados mostrando que a PGE<sub>2</sub> é importante para a indução de DCs maduras capazes de migrarem aos linfonodos e serem altamente efetivas na ativação de células T “naives”. Nesse sentido, a adição de PGE<sub>2</sub> a uma mistura de citocinas como IL-1-β e TNF-α aumenta consideravelmente a maturação das DCs e eleva a expressão de moléculas coestimulatórias. Como relatado no presente estudo, outros trabalhos têm mostrado que esse eicosanóide aumenta a expressão de CCR7 pelas DCs. Esse receptor liga-se às quimiocinas CCL19 e CCL21 derivada dos linfonodos. Assim a sua maior expressão nas DCs, aumenta a capacidade dessas células migrarem até esses órgãos<sup>(41, 42)</sup>.

A incubação das células com LTB<sub>4</sub> resultou em um aumento significativo das moléculas CD40, CD80 e a CCR5, além de aumentar de modo significativo a MIF da molécula HLA-DR mostrando a sua participação da maturação das DCs. Não encontramos dados na literatura mostrando a atuação dos leucotrienos sobre essas moléculas. Alguns estudos têm mostrado que o LTB<sub>4</sub> promove a migração das DCs maduras e imaturas aos sítios inflamatórios e aumenta a função e expressão do receptor

para quimiocina CCR7, envolvido no acúmulo e organização dessas células e das células T nos linfonodos <sup>(24)</sup>. No entanto, nos nossos ensaios não detectamos aumento significativo de CCR7 após incubação das células com LTB<sub>4</sub> exógeno.

Outro resultado importante do presente estudo é a identificação do receptor envolvido no processo de inibição dos eicosanóides pelo fungo. Mostramos que o PRR envolvido nesse processo, no caso da PGE<sub>2</sub> é o MMR. O fungo ligando-se a esse receptor induziria a transdução de sinais que culminam com a inibição da produção de PGE<sub>2</sub> por DCs. Outros estudos têm mostrado que o MMR, assim como Dectina-1 e DC-SIGN, exercem um papel importante na fagocitose de várias espécies de fungos devido a presença de  $\beta$ -glucanas e mananas na parede das células fúngicas <sup>(43)</sup>, mas que apesar disso, esse receptor pode também estar envolvido nos mecanismos de escape dos fungos. Nesse contexto, o MMR é capaz de internalizar leveduras de *Candida albicans* independente de Dectina-1 ou outro CLR. No entanto, a entrada de *Candida albicans* via MMR pode ainda resultar na inibição da via NADPH oxidase que é essencial na eliminação desse fungo comensal <sup>(44)</sup>. No nosso estudo podemos também considerar a ligação do fungo ao MMR como um mecanismo de escape, uma vez que esse receptor está envolvido na inibição da maturação das DCs. No entanto, contrários a essa idéia, outros estudos mostraram que esse receptor tem um papel importante na maturação de DCs. Após desafiar essas células com manoproteínas de *Cryptococcus neoformans* e inibir a expressão do MMR, o resultado foi a não maturação das DCs <sup>(45)</sup>.

Entretanto, vários outros estudos têm sugerido que o *P. brasiliensis* pode usar o MMR como mecanismo de escape e que esse receptor está envolvido nos mecanismos de patogenicidade desenvolvidos durante a infecção pelo fungo. Nesse sentido, um estudo em particular, já mostrou que a fração gp43, o antígeno imunodominante de *P. brasiliensis*, se liga ao MMR para inibir a capacidade fagocítica e fungicida de macrófagos peritoneais de camundongos resistentes e susceptíveis. Esta descoberta levou os autores a postular que a secreção de gp43 é um dos mecanismos de escape apresentados pelo *P. brasiliensis* e que essa proteína exerce seus efeitos ligando-se ao MMR <sup>(46)</sup>. Estudo recente em nosso laboratório mostrou que a IL-18 induz um aumento do crescimento do *P. brasiliensis* em monócitos humanos. Esse efeito foi atribuído ao fato dessa citocina aumentar a expressão de MMR. Após a ligação do fungo a esse receptor, seriam emitidos sinais de desativação importantes que culminariam com o crescimento do fungo <sup>(47)</sup>.

No caso da inibição da produção de LTB<sub>4</sub>, não obtivemos associação específica com um receptor em particular. No entanto, ressaltamos novamente que a inibição desse mediador também esteve associada a não maturação das DCs pelo fungo.

Outro aspecto que avaliamos, foram as consequências da inibição dos eicosanóides pelo fungo sobre a produção de citocinas. Como já colocado, as DCs como APCs profissionais tem papel essencial no balanço entre a imunidade inata e adaptativa, o que leva essas células a produzirem várias citocinas tanto próinflamatórias como antiinflamatórias <sup>(39)</sup>. Entre essas citocinas destacam-se a IL-6, IL10, IL12, IL-23 e TNF- $\alpha$  que foram o nosso alvo de avaliação.

A interleucina 6 (IL-6) pode ser considerada um potente mediador próinflamatório com papel importante nas inflamações aguda e crônica e com muitos efeitos sobre vários tipos celulares <sup>(48)</sup> como indução da síntese de proteínas de fase aguda por hepatócitos, produção de anticorpos por células B, diferenciação de monócitos em macrófagos e desenvolvimento de células tronco hematopoiéticas <sup>(49)</sup>. Nesse sentido, vários estudos mostram que essa citocina está envolvida na proliferação de células Th<sub>17</sub> em humanos <sup>(50,51)</sup>. Apesar dos estudos citados acima classificarem a IL-6 como tendo um perfil unicamente próinflamatório, outros estudos a consideram como uma citocina tipo 2, ou seja, envolvida na indução de uma resposta imune de perfil Th<sub>2</sub>, mas também com propriedades próinflamatórias <sup>(49, 52, 53, 54)</sup>. Outros estudos ainda mostraram que a IL-6 pode promover uma resposta de perfil Th<sub>2</sub> e simultaneamente inibir a resposta de perfil Th<sub>1</sub> por meio de dois mecanismos moleculares independentes: transcrição ativa mediada por fator nuclear de células T ativadas (NFAT) que resulta na produção de IL-4 por células T CD4<sup>+</sup> e aumento da expressão da SOCS-1 que inibe a atividade dos fatores de transcrição, evento que modula a expressão de citocinas levando à inibição de IFN- $\gamma$  e consequentemente a inibição de resposta de perfil Th<sub>1</sub> <sup>(52)</sup>. Assim, a IL-6 pode estar envolvida em respostas tanto próinflamatórias como antiinflamatórias <sup>(55)</sup>.

Em nossos resultados observamos que tanto leveduras do *P. brasiliensis* como LPS aumentam a produção de IL-6. Esse efeito, também foi observado em estudo com MO-DCs desafiadas com componentes da parede de *Candida albicans*, com BM-DCs desafiadas com leveduras de *Sporothrix schenckii* que induziram a produção dessa citocina <sup>(56, 57, 58)</sup>. Observamos também que a adição de PGE<sub>2</sub> exógena aumentou a produção de IL-6 pelas células não desafiadas. Esse resultado pode ser considerado discrepante em relação ao detectado com as células desafiadas com o fungo que

liberaram maiores concentração de IL-6 em relação às não desafiadas, apesar do fungo induzir uma diminuição da produção de PGE<sub>2</sub>. Uma explicação para esse resultado seria o envolvimento de outros fatores ligados ao fungo que estimulariam a produção de IL-6 e que compensariam o fato de ocorrer uma diminuição na produção de PGE<sub>2</sub>.

Diferente do detectado nos ensaios de tratamento exógeno com PGE<sub>2</sub>, a adição de LTB<sub>4</sub> exógeno não aumentou a produção de IL-6 pelas DCs controle e ainda inibiu a produção desta citocina induzida pelo fungo. Esse achado mostra que provavelmente os níveis de IL-6 nas culturas desafiadas com o fungo poderiam ser ainda maiores, se o fungo não induzisse uma diminuição na produção de LTB<sub>4</sub>. De uma forma geral, podemos discutir que o *P. brasiliensis* induz as células a produzirem IL-6 e que a liberação desta citocina pode resultar no desenvolvimento de uma resposta não protetora. Na paracoccidioidomicose, os estudos envolvendo o papel da IL-6 são escassos, porém um estudo em particular demonstrou que indivíduos que apresentam a forma disseminada da doença não tratada, produzem níveis elevados de IL-6 quando comparados àqueles tratados. Essa produção esteve associada ao aumento da proliferação de células B e produção de anticorpos <sup>(59)</sup>.

Inicialmente, a interleucina 10 (IL-10) foi caracterizada como produto de células Th<sub>2</sub> e com função essencial na inibição de células Th<sub>1</sub> <sup>(60, 61)</sup>, possibilitando o controle da resposta imunológica após infecção e consequentemente evitando danos ao hospedeiro <sup>(62)</sup>. Além de células Th<sub>2</sub>, várias outras células do sistema imune como populações de linfócitos, DCs, macrófagos e granulócitos podem produzir IL-10 <sup>(60, 61)</sup> que age em vários estágios do sistema imune afetando funções muito importantes de monócitos, macrófagos e DCs, como o processamento e apresentação de antígenos por meio da inibição da produção de citocinas e quimiocinas, da fagocitose, da expressão de moléculas coestimulatórias como CD86 e moléculas apresentadoras de antígenos como MHC-II <sup>(63, 64)</sup>.

Além disso, a IL-10 pode atuar diretamente sobre a proliferação de células Th<sub>17</sub> minimizando o processo inflamatório <sup>(65)</sup> e ainda promove a sobrevivência e atua sobre a função de células T<sub>regs</sub> <sup>(66)</sup>. Outra função importante dessa citocina é a de promover a proliferação e diferenciação de células de perfil Th<sub>2</sub> como as células B <sup>(67)</sup>.

Em relação à produção de eicosanóides, a IL-10 está envolvida na inibição da produção de PGs por meio da modulação da enzima COX <sup>(53)</sup>. Quanto à produção de IL-10, foram relatados que a PGE<sub>2</sub> induz aumento da liberação desta citocina em DCs murinas que resulta em efeitos inibitórios da produção de outras citocinas e nas funções

dessas células <sup>(68)</sup>. O mesmo foi observado em MO-DCs humanas <sup>(69)</sup>. Nesse sentido, DCs tratadas com PGE<sub>2</sub> apresentam atividade muito mais regulatória do que estimulatória <sup>(70)</sup>. Em nosso estudo, observamos que o desafio das células com o fungo não aumentou a produção de IL-10 em comparação às não desafiadas. No entanto o tratamento com PGE<sub>2</sub> na concentração de 100 pg/mL, aumentou a produção dessa citocina por DCs desafiadas com Pb. Assim, podemos discutir que o fato do fungo inibir a produção de PGE<sub>2</sub> resultou na não produção de IL-10 pelas DCs.

Quanto aos LTs, existem achados que mostram que o LTB<sub>4</sub> não tem efeito sobre a liberação de IL-10 por células dendríticas murinas derivadas da medula óssea (BM-DCs) <sup>(68)</sup>. Ao contrário, Josefowski *et al.*, 2005 <sup>(71)</sup>, mostraram que LTB<sub>4</sub> endógeno e exógeno aumentam a liberação de IL-10 por BM-DCs murinas dose dependente. Em nossos achados, o LTB<sub>4</sub> apresentou efeito sobre a produção de IL-10 somente quando associado à PGE<sub>2</sub> na dose de 100 pg/mL (resultados não mostrados). Nesse sentido, acreditamos que sobressaiu o efeito exclusivamente da PGE<sub>2</sub>.

Estudos tem mostrado que o fungo *P. brasiliensis* induz DCs regulatórias que produzem IL-10 em camundongos susceptíveis e contribui com a evolução da infecção <sup>(72)</sup>. Além disso, ocorrem altas concentrações dessa citocina na paracoccidioidomicose experimental e na paracoccidioidomicose humana <sup>(73, 74, 75, 54)</sup>. Neste contexto, podemos discutir que no presente estudo, o fato de as DCs não produzirem IL-10 em resposta ao fungo, descarta de início, o papel dessas células em uma regulação negativa da resposta imune, via liberação de IL-10.

A principal citocina envolvida na modulação da resposta de perfil Th<sub>1</sub> é a interleucina 12 (IL-12) que é considerada próinflamatório e próestimulatória <sup>(76)</sup>. Essa citocina pode ser produzida por DCs, macrófagos e células B <sup>(77, 78)</sup>, essas APCs que por meio da IL-12 modulam a produção de IFN- $\gamma$  por células T e células NK <sup>(79)</sup>. A IL-12 é uma citocina que apresenta uma molécula heterodímera p70 que consiste na composição de duas subunidades diferentes p35 e p40 <sup>(80)</sup>.

Em nossos resultados não detectamos níveis basais de IL-12 pelas DCs no período de 48h e nem mesmo quando essas células foram desafiadas com LPS. Isso pode ser explicado pela concentração utilizada de 5 ug/mL de LPS que provavelmente induziu baixa produção dessa citocina em períodos mais precoces e até 48h os níveis já não foram mais detectáveis, devido a instabilidade da IL-12 p70.

Ao tratar essas células com PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> também não detectamos a presença de IL-12 no período de 48h. A PGE<sub>2</sub> apresenta papel imunossupressor sobre a produção

desta citocina <sup>(81)</sup>, pois DCs ativadas na presença de PGE<sub>2</sub> perdem a capacidade de secretar IL-12 <sup>(13, 42, 53)</sup>. Já o LTB<sub>4</sub> endógeno tem capacidade de ativar reposta de perfil Th<sub>1</sub> por mediar a produção de IL-12 por APCs <sup>(9)</sup>. Estudos com camundongos deficientes de receptor BLT-1 mostraram mínima produção de IL-12 e consequentemente uma produção atenuada de IFN- $\gamma$ , reforçando o papel do LTB<sub>4</sub> na modulação de uma resposta de perfil Th<sub>1</sub> <sup>(25)</sup>. Apesar disso, em nossos resultados não encontramos níveis detectáveis de IL-12 p70 quando as DCs foram tratadas com 100 pg/mL de LTB<sub>4</sub> exógeno.

PAMPs fúngicos interagem com Dectina-1 e DC-SIGN presentes em DCs levando à baixa produção de IL-12 p70 <sup>(82, 83, 84)</sup>. Em concordância com a literatura, em nossos achados pode ter ocorrido muito baixa produção desta citocina quando as DCs foram desafiadas com Pb, por esse motivo não detectamos a produção de IL-12 até a sensibilidade mínima de 7.8 pg/mL (Kit ELISA-BD) no período de 48h. Além disso, Pietrella *et al.*, 2005<sup>(45)</sup>, mostraram a associação da produção de IL-12 com a fagocitose mediada pelo MMR. Esse receptor que de acordo com nossos achados, é utilizado pelo Pb como um mecanismo de escape levando a inibição da produção de PGE<sub>2</sub>. Pelo o que parece, o fungo também poderia estar inibindo a produção de IL-12 via esse receptor. Entretanto, outros estudos envolvendo BM-DCs murinas desafiadas com *P. brasiliensis* ou seu antígeno gp43, determinam que o fungo inibe a produção de IL-12 <sup>(85)</sup>.

Outra citocina heterodímera é a IL-23 que consiste na composição de duas subunidades diferentes p19 e p40 <sup>(86, 87, 88)</sup>, com papel próinflamatório e próestimulatório com capacidade de induzir o desenvolvimento de uma resposta Th<sub>17</sub> <sup>(89, 90)</sup>. A produção dessa citocina ocorre via APCs: DCs ativadas e macrófagos em resposta à estímulos patogênicos <sup>(89, 91)</sup>. Em acordo com nossos resultados que mostra a produção de IL-23 por DCs ativadas com LPS. Embora a produção tenha sido relativamente baixa é provável que em períodos mais precoces essa liberação tenha sido mais elevada e no período de 48h devido à instabilidade da IL-23, os níveis foram pouco detectáveis.

Ao desafiar as DCs com as cepas 18 e 265 do *P. brasiliensis* não detectamos produção de IL-23 no período de 48h. Apesar disso, estudos mostram que componentes da parede fúngica como mananas e  $\beta$ -glucanas induzem altos níveis de produção dessa citocina <sup>(84, 28)</sup>. Nesse sentido, nossos dados mostram o contrário, já que nossas DCs não são ativadas por ambas as cepas e consequentemente não liberariam IL-23. Entretanto, esta citocina exerce papel importante na proteção do hospedeiro contra a evolução da paracoccidiodomicose <sup>(92)</sup>.

No que diz respeito à indução da produção desta citocina por eicosanóides, alguns estudos mostram que a PGE<sub>2</sub> induz a síntese de IL-23 por DCs<sup>(93, 94)</sup>. Em nossos resultados não detectamos a produção de IL-23 pelas DCs tratadas com esse mediador lipídico no período de 48h. Se houve alguma produção, certamente foi em períodos mais precoces e em níveis baixos. Quanto aos leucotrienos não existe na literatura estudos que mostrem o papel de LTB<sub>4</sub> na liberação de IL-23. Apenas um estudo em particular, coloca que o LTC<sub>4</sub> favorece a liberação desta citocina por DCs murinas ativadas com LPS<sup>(28)</sup>. Em nossos achados não observamos a liberação de IL-23 por DCs tratadas com LTB<sub>4</sub> e nem com DCs desafiadas com Pb18 ou Pb265 e tratadas com LTB<sub>4</sub>. Já as DCs desafiadas com LPS apresentaram níveis moderados de IL-23, porém essas DCs não foram tratadas com LTB<sub>4</sub>.

O fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) é a principal citocina próinflamatória que exerce funções fisiológicas e patológicas importantes como: apoptose e necrose de células tumorais, regulação do desenvolvimento embrionário, formação do centro germinativo, defesa do hospedeiro contra infecções virais e bacterianas, participa também como mediador chave de reações inflamatórias aguda e crônica, e desempenha importante papel em doenças autoimune. Entretanto, essa citocina tem sido colocada como um importante fator de risco para tumorigênese, progressão de tumores, invasão e metástases tumorais. No sistema imune apresenta função de estimular a sua própria secreção e ainda estimula a produção de outras citocinas e quimiocinas por várias células<sup>(95)</sup> principalmente macrófagos e DCs<sup>(96, 97)</sup>. Além disso, TNF- $\alpha$  é essencial no recrutamento de células inflamatórias para o sítio da infecção e na formação e manutenção de infecções granulomatosas<sup>(98)</sup>.

Nas infecções fúngicas o TNF- $\alpha$  participa da proteção do hospedeiro contra *Cryptococcus neoformans*<sup>(99)</sup>, *Candida albicans*<sup>(100)</sup>, *Histoplasma capsulatum*<sup>(101)</sup>, *Coccidioides immitis*<sup>(102)</sup>, *Aspergillus fumigatus*<sup>(103)</sup> e *Paracoccidioides brasiliensis*<sup>(73, 104, 105)</sup>. Em nossos achados tanto a cepa 18 como a 265 induziram a produção significativa de TNF- $\alpha$  no período de 48h, quando comparados com o nível de produção basal pelas DCs que foi muito baixo, não havendo diferenças significativas nessa indução entre uma cepa e outra. Quando essas células foram desafiadas e tratadas com PGE<sub>2</sub> observamos um aumento bastante significativo na produção da citocina.

A PGE<sub>2</sub> como alguns estudos mostram, exerce função de inibição na síntese de TNF- $\alpha$  em DCs murinas<sup>(96, 97)</sup>. No entanto, na literatura existem vários estudos que mostram que a adição de PGE<sub>2</sub> e TNF- $\alpha$  exógenos acelera o processo de maturação das

DCs *in vitro* com elevação da expressão de várias moléculas coestimulatórias<sup>(11, 12, 13)</sup>. Nesse aspecto, o aumento da produção de TNF- $\alpha$  estimulado por PGE<sub>2</sub> na presença do fungo, pode estar relacionado a um papel protetor desse eicosanóide estimulando a síntese de uma citocina próinflamatória pelas DCs na tentativa de maturar a célula e conter o agente agressor.

Quanto ao LTB<sub>4</sub>, estudos tem mostrado que esse eicosanóide induz a síntese de TNF- $\alpha$  por monócitos e macrófagos<sup>(9)</sup>. Nesse sentido, o mesmo foi observado em nossos achados, em que LTB<sub>4</sub> induziu a produção de TNF- $\alpha$ , que tem papel importante na maturação e migração das DCs<sup>(24)</sup>. Nesse caso o LTB<sub>4</sub> exerceu função protetora estimulando a produção de citocinas importantes na ativação de iDCs. De uma forma geral, podemos discutir que apesar de as DCs terem produzido TNF- $\alpha$  em resposta ao fungo, essas concentrações poderiam ser ainda maiores se o fungo não inibisse a produção de PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub>.

Em conjunto, os nossos resultados permitem discutir que o *P. brasiliensis* não induz maturação fenotípica das DCs devido ao fato desse fungo inibir a produção de PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> por essas células. Estas células ainda produzem altos níveis de IL-6 em resposta ao fungo, que no entanto, não estiveram associados ao fato de as DCs inibirem a produção dos eicosanóides. Ao contrário, essas DCs não produzem IL-10 em resposta ao fungo, provavelmente devido a inibição da produção de PGE<sub>2</sub>. A inibição desse mediador pode ainda ter sido responsável pela inibição da produção de TNF- $\alpha$ , apesar de termos detectado níveis substanciais dessa citocina em resposta ao fungo. Estudos adicionais devem ser feitos no sentido de melhor entender as consequências de todos esses processos na evolução da paracoccidioidomicose.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Brummer E, Castaneda E, Restrepo A.** 1993. Paracoccidioidomycosis: an update. Clin Microbiol. Rev. **6**:89-117.
2. **San-Blas G, Niño-Vega G, Iturriaga T.** 2002. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. Med. Mycol. **40**:225-42.
3. **Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaioordanou PMO, Blotta MHSL.** 2002. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparisons with infected and non-infected controls. Microbes Infected. **4**:139-44.
4. **Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NG.** 1987. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. **20**:129-32.
5. **Mendes RP.** 1994. The gamut of clinical manifestations. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. (Eds). Paracoccidioidomycosis. Boca Raton. CRC Press.233-58.
6. **Benard G.** 2008. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. Mycopathologia. **16**:209-21.
7. **Kashino SS, Fazioli RA, Cafalli-Favati C, Meloni-Bruneri LH, Vaz CA, Burger E, Singer L M, Calich VL.** 2000. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th<sub>1</sub> immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. J. Interferon Cytokine Res. **20**:89-97.
8. **Kalinski P.** 2012. Regulation of immune responses by prostaglandin E<sub>2</sub>. J. Immunol. **188**:21-8. Review.
9. **Di Gennaro A, Haeggström JZ.** 2012. The leukotrienes: immune-modulating lipid mediators of disease. Adv. Immunol. **116**:51-92.
10. **Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP.** 2002. Prostaglandins as modulators of immunity. Trends Immunol. **23**: 144-150.
11. **Jonuleit H, Kühn U, Müller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk AH.** 1997. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. Eur. J. Immunol. **27**:3135-42
12. **Rieser C, Bock G, Klocker H, Bartsch G, Thurnher M.** 1997. Prostaglandin E<sub>2</sub> and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells. Synergistic activation of interleukin 12 production. J. Exp. Med. **186**:1603-8.
13. **Kaliński P, Schuitemaker JH, Hilken CM, Kapsenberg ML.** 1998. Prostaglandin E<sub>2</sub> induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. J. Immunol. **161**:2804-9.

14. **Kaliński P, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML.** 1999. Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-gamma and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. *J Immunol.* **162**:3231-6.
15. **Gustafsson K, Ingelsten M, Bergqvist L, Nyström J, Andersson B, Karlsson-Parra A.** 2008. Recruitment and activation of natural killer cells in vitro by a human dendritic cell vaccine. *Cancer Res.* **68**:5965-71.
16. **Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Smith MJ.** 1980. Lipoxygenase products and the polymorphonuclear leucocyte. *Agents Actions.* **10**:548-50.
17. **Bomalaski JS, Dundee D, Brophy L, Clark MA.** 1990. Leukotriene B<sub>4</sub> modulates phospholipid methylation and chemotaxis in human polymorphonuclear leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* **47**: 1–12.
18. **Shi ZZ, Han B, Habib GM, Matzuk MM, Lieberman MW.** 2001. Disruption of  $\gamma$ -glutamyl leukotrienase results in disruption of leukotriene D<sub>4</sub> synthesis in vivo and attenuation of the acute inflammatory response. *Mol. Cell. Biol.* **21**:5389-95.
19. **Maekawa A, Austen KF, Kanaoka Y.** 2002. Targeted gene disruption reveals the role of cysteinyl leukotriene 1 receptor in the enhanced vascular permeability of mice undergoing acute inflammatory responses. *J. Biol. Chem.* **277**:20820-4.
20. **Kim ND, Chou RC, Seung E, Tager AM, Luster AD.** 2006. A unique requirement for the leukotriene B<sub>4</sub> receptor BLT1 for neutrophil recruitment in inflammatory arthritis. *J. Exp. Med.* **203**:829–835.
21. **Grespan R, Fukada SY, Lemos HP, Vieira SM, Napimoga MH, Teixeira MM, Fraser AR, Liew FY, McInnes IB, Cunha FQ.** 2008. CXCR2-specific chemokines mediate leukotriene B<sub>4</sub>-dependent recruitment of neutrophils to inflamed joints in mice with antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **58**:2030–2040.
22. **Chou RC, Kim ND, Sadik CD, Seung E, Lan Y, Byrne MH, Haribabu B, Iwakura Y, Luster AD.** 2010. Lipid-cytokine-chemokine cascade drives neutrophil recruitment in a murine model of inflammatory arthritis. *Immunity.* **33**:266–278.
23. **Spanbroek R, Hildner M, Steinhilber D, Fusenig N, Yoneda K, Rådmark O, Samuelsson B, Habenicht AJ.** 2000. 5-lipoxygenase expression in dendritic cells generated from CD34(+) hematopoietic progenitors and in lymphoid organs. *Blood.* **96**:3857-65.
24. **Del Prete A, Shao WH, Mitola S, Santoro G, Sozzani S, Haribabu B.** 2007. Regulation of dendritic cell migration and adaptive immune response by leukotriene B<sub>4</sub> receptors: a role for LTB<sub>4</sub> in up-regulation of CCR7 expression and function. *Blood.* **109**:626-31.
25. **Toda A, Terawaki K, Yamazaki S, Saeki K, Shimizu T, Yokomizo T.** 2010. Attenuated Th<sub>1</sub> induction by dendritic cells from mice deficient in the leukotriene B<sub>4</sub> receptor 1. *Biochimie.* **92**:682-91.

26. **Robbiani DF, Finch RA, Jager D, Muller WA, Sartorelli AC, Randolph GJ.** 2000. The leukotriene C<sub>4</sub> transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3 $\beta$ , ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes. *Cell*. **103**:757-68.
27. **Parameswaran K., Liang H, Fanat A, Watson R, Snider DP, O'Byrne PM.** 2004. Role for cysteinyl leukotrienes in allergen-induced change in circulating dendritic cell number in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **114**:73-9
28. **Alvarez Y, Valera I, Municio C, Hugo E, Padron F, Blanco L, Rodriguez M, Fernandez N, Crespo MS.** 2010. Eicosanoids in the innate immune response: TLR and non-TLR routes. *Mediators of inflammation*. **2010**:1-14
29. **Valera I, Fernández N, Trinidad AG, Alonso S, Brown GD, Alonso A, Crespo MS.** 2008. Costimulation of dectin-1 and DC-SIGN triggers the arachidonic acid cascade in human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* **180**:5727-36.
30. **Soares AM, Calvi SA, Peraçoli, M.T, Fernandez AC, Dias LA, Dos Anjos AR.** 2001. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunology*. **102**:480-5.
31. **Bykovskaia SN, Shurin GV, Graner S, Bunker ML, Olson W, Thomas R, Shurin MR, Marks S, Storkus WJ, Shogan J.** 2002. Differentiation of immunostimulatory stem-cell- and monocyte-derived dendritic cells involves maturation of intracellular compartments responsible for antigen presentation and secretion. *Stem Cells*. **20**:380-93.
32. **Polancec DS, Munic Kos V, Banjanac M, Vrancic M, Cuzic S, Belamaric D, Parnham MJ, Polancec D, Erakovic Haber V.** 2012. Azithromycin drives in vitro GM-CSF/IL-4-induced differentiation of human blood monocytes toward dendritic-like cells with regulatory properties. *J. Leukoc. Biol.* **91**:229-43.
33. **Bordon AP, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Calvi SA, Serrão Peraçoli MT, Victoriano De Campos Soares AM.** 2007. Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human monocytes. *Microbes Infect.* **9**:744-7.
34. **Ferrari C, Bordon-Graciani AP, Acorci-Valério M J, Dias-Melicio LA, Soares AMVC.** 2009. Role of leukotrienes on the human monocyte in fungicidal activity against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Anais XXXIV Congresso Sociedade Brasileira de Imunologia*.
35. **Bordon-Graciani AP, Dias-Melicio LA, Acorci-Valério MJ, Araujo JPJr, De Campos Soares AM.** 2012. Inhibitory effect of PGE<sub>2</sub> on the killing of *Paracoccidioides brasiliensis* by human monocytes can be reversed by cellular activation with cytokines. *Med Mycol.* **50**:726-34
36. **Furgier-Vivier I, Servet-Delprat C, Rivaller P, Rissoan M C, Liu YJ, Rabourdin-Combe C.** 1997. Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic cells and T cells. *J. Exp. Med.* **186**:813-23.
37. **Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ.** 2009. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev.* **229**:152-72. Review
38. **Hart DN.** 1997. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*. **90**:3245-3287.

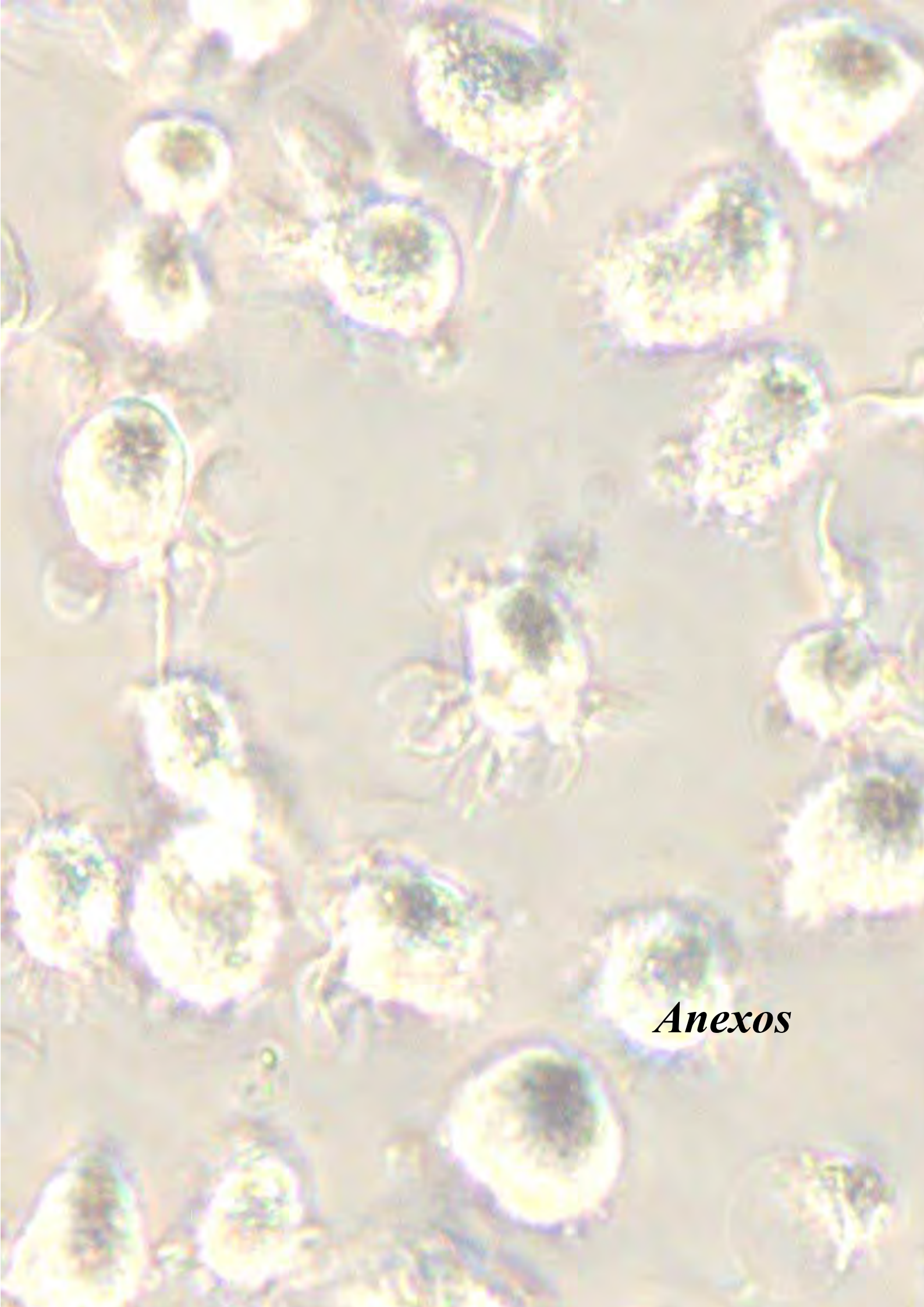
39. **Banchereau J, Steinman RM.** 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. **392**:245–252.
40. **Zhou LJ, Tedder TF.** 1996. CD14<sup>+</sup> blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83<sup>+</sup> dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **93**:2588-92.
41. **Luft T, Jefford M, Luetjens P, Toy T, Hochrein H, Masterman KA, Maliszewski C, Shortman K, Cebon J, Maraskovsky E.** 2002. Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E(2) regulates the migratory capacity of specific DC subsets. *Blood*. **100**:1362-72.
42. **Scandella E, Men Y, Gillessen S, Förster R, Groettrup M.** 2002. Prostaglandin E<sub>2</sub> is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. **100**:1354-6143.
43. **Ramirez-Ortiz ZG, Means TK.** 2012. The role of dendritic cells in the innate recognition of pathogenic fungi (*A. fumigatus*, *C. neoformans* and *C. albicans*). *Virulence*. **3**.
44. **Donini M, Zenaro E, Tamassia N, Dusi S.** 2007. NADPH oxidase of human dendritic cells: role in *Candida albicans* killing and regulation by interferons, dectin-1 and CD206. *Eur. J. Immunol.* **37**:1194-203.
45. **Pietrella D, Corbucci C, Perito S, Bistoni G, Vecchiarelli A.** 2005. Mannoproteins from *Cryptococcus neoformans* promote dendritic cell maturation and activation. *Infect. Immun.* **73**:820-7.
46. **Popi AF, Lopes JD, Mariano M.** 2002. Gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cell Immunol.* **218**:87-94.
47. **Dias-Melicio LA, Fernandes RK, Golim MA, Rodrigues DN, Soares AMVC.** 2011. Interleukin-18 promotes growth of *Paracoccidioides brasiliensis* within human monocytes via mannose receptor modulation. *Inflammation Research*. **60**:S167.
48. **Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T.** 2012. Therapeutic targeting of the interleukin-6 receptor. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **52**:199–219.
49. **Hirano T.** 1998. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int. Rev. Immunol.* **16**:249-84.
50. **Manel N, Unutmaz D, Littman DR.** 2008. The differentiation of human TH-17 cells requires transforming growth factor- $\beta$  and induction of the nuclear receptor ROR $\gamma$ . *Nat. Immunol.* **9**:641–649.
51. **Volpe E, Servant N, Zollinger R, Bogiatzi SI, Hupé P, Barillot E, Soumelis V.** 2008. A critical function for transforming growth factor- $\beta$ , interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human TH-17 responses. *Nat. Immunol.* **9**:650–657.
52. **Diehl S, Rincon M.** The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. 2002. *Mol Immunol.* **39**:531-6.
53. **Harizi H, Gualde N.** 2005. The impact of eicosanoids on the crosstalk between innate and adaptive immunity: the key roles of dendritic cells. *Tissue Antigens*. **65**:507-514.

54. **Mamoni RL, Blotta MHSL.** 2005. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. *Cytokine*. **32**:20-29.
55. **Heuertz RM, Ahmed N, Webster RO.** 1996. Peptides derived from C-reactive protein inhibit neutrophils alveolitis. *J. Immunol.* **156**:3412–3417.
56. **Nisini R, Torosantucci A, Romagnoli G, Chiani P, Donati S, Gagliardi MC, Teloni R, Sargentini V, Mariotti S, Iorio E, Cassone A.** 2007. B-Glucan of *Candida albicans* cell wall causes the subversion of human monocytes differentiation into dendritic cells. *J. Leuk. Bio.* **82**:1136-1142
57. **Gagliardi MC, Teloni R, Mariotti S, Bromuro C, Chiani P, Romagnoli G, Giannoni F, Torosantucci A, Nisini R.** 2010. Endogenous PGE2 promotes the induction of human Th17 responses by fungal  $\beta$ -Glucana. *J. Leukoc. Biol.* **88**:947-954.
58. **Verdan FF, Faleiros JC, Ferreira LS, Monnazzi LG, Maia DC, Tansine A, Placeres MC, Carlos IZ, Santos-Junior RR.** 2012. Dendritic cell are able to differentially recognize *Sporothrix schenckii* antigens and promote Th1/Th17 response in vitro. *Immunobiology.* **217**:788-94
59. **Silva CL, Silva MF, Faccioli LH, Pietro RCL, Cortez SAE, Foss, NT.** 1995. Differential correlation between interleukin patterns in disseminated and chronic human paracoccidioidomycosis. *Clin. Exp. Immunol.* **101**:314-320.
60. **Moore, KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A.** 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **19**:683–765.
61. **Sabat, R. Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, Geginat J.** 2010. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.* **21**:331–344.
62. **Li MO, Flavell RA.** 2008. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor- $\beta$  and interleukin-10. *Immunity.* **28**:468–476.
63. **Pletinckx K, Dohler A, Pavlovic V, Lutz MB.** 2011. Role of dendritic cell maturity/costimulation for generation, homeostasis, and suppressive activity of regulatory T cells. *Front. Immunol.* **2**:39.
64. **Gregori S, Tomasoni D, Pacciani V, Scirpoli M, Battaglia M, Magnani CF, Hauben E, Roncarolo MG.** 2011. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood.* **116**:935–944.
65. **Huber S, Gagliani N, Esplugues E, O'Connor W Jr, Huber FJ, Chaudhry A, Kamanaka M, Kobayashi Y, Booth CJ, Rudensky AY, Roncarolo MG, Battaglia M, Flavell RA.** 2011. Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3<sup>–</sup> and Foxp3<sup>+</sup> regulatory CD4<sup>+</sup> T cells in an interleukin-10-dependent manner. *Immunity.* **34**:554–565.
66. **Murai M, Turovskaya O, Kim G, Madan R, Karp CL, Cheroutre H, Kronenberg M.** 2009. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat. Immunol.* **10**:1178–1184.

67. **Rousset F, Garcia E, Defrance T, Péronne C, Vezzio N, Hsu DH, Kastelein R, Moore KW, Banchereau J.** 1992. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . **89**:1890–1893.
68. **Harizi H, Juzan M, Pitard V, Moreau JF, Gualde N.** 2002. Cyclooxygenase-2-issued prostaglandin E<sub>2</sub> enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. *J. Immunol.* **168**:2255–63.
69. **Kalinski P, Hilkens CM, Snijders A, Snijdwint FG, Kapsenberg ML.** 1997. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E<sub>2</sub>, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J. Immunol.* **159**:28–35.
70. **Schmidt SV, Nino-Castro AC, Schultze JL.** 2012. Regulatory dendritic cells: there is more than Just immune activation. *Frontiers in Immunology.* **3**:1-17.
71. **Józefowski S, Arredouani M, Sulahian T, Kobzik L.** 2005. Disparate regulation and function of the class A scavenger receptors SR-AI/II and MARCO. *J. Immunol.* **175**:8032-41.
72. **Ferreira KS, Bastos KR, Russo M, Almeida SR.** 2007. Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and pulmonary dendritic cells induces interleukin-10 production and toll-like receptor-2 expression: possible mechanisms of susceptibility. *J Infect Dis.* 2007. **196**:1108-15.
73. **Souto JT, Figueiredo F, Furlanetto A, Pfeffer K, Rossi MA, Silva JS.** 2000. Interferon- and tumor necrosis factor- $\alpha$  determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am. J. Pathol.* **156**:1811
74. **Romano CC, Mendes-Giannini MJS, Duarte JSA, Benard, G.** 2002. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. *Cytokine.* **18**:149.
75. **Peraçoli MTS, Kurokawa CS, Calvi SA, Mendes RP, Pereira PCM, Marques SA, Soares AMVC.** 2003. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect.* **5**:413.
76. **Langrish CL, McKenzie BS, Wilson NJ, de Waal Malefyt R, Kastelein RA, Cua DJ.** 2004. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol. Rev.* **202**:96–105.
77. **Ma X, Trinchieri G.** 2001. Regulation of interleukin-12 production in antigen-presenting cells. *Adv. Immunol.* **79**:55–92.
78. **O'Shea JJ, Paul WE.** 2002. Regulation of Th<sub>1</sub> differentiation—controlling the controllers. *Nat. Immunol.* **3**:506–508.
79. **Vignali DAA, Kuchroo VK.** 2012. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature Immunology Review.* **13**:722-728.
80. **O'Garra A, Murphy KM.** 2009. From IL-10 to IL-12: how pathogens and their products stimulate APCs to induce Th<sub>1</sub> development. *Nature Immunology.* **10**:929–932.

81. **Walker W, Rotondo D.** 2004. Prostaglandin E<sub>2</sub> is a potent regulator of interleukin-12- and interleukin-18-induced natural killer cell interferon- $\gamma$  synthesis. *Immunology* **111**:298–305.
82. **Rogers NC, Slack EC, Edwards AD, Nolte MA, Schulz O, Schweighoffer E, Williams DL, Gordon S, Tybulewicz VL, Brown GD, Reis e Sousa, C.** 2005. Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity*. **22**:507–517.
83. **Dillon S, Agrawal S, Banerjee K, Letterio J, Denning TL, Oswald-Richter K, Kasprovicz DJ, Kellar K, Pare J, van Dyke T, et al.** 2006. Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J. Clin. Invest.* **116**: 916–928.
84. **Gerosa F, Baldani-Guerra B, Lyakh LA, Batoni G, Esin S, Winkler-Pickett RT, Consolaro MR, De Marchi M, Giachino D, Robbiano A, Astegiano M, Sambataro A, Kastelein RA, Carra G, Trinchieri G.** 2008. Differential regulation of interleukin 12 and interleukin 23 production in human dendritic cells. *J. Exp. Med.* **205**:1447–61
85. **Ferreira KS, Lopes JD , Almeida, SR.** 2004. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunology Letters*. **94**:107-114.
86. **Collison LW, Vignali DA.** 2008. Interleukin-35: odd one out or part of the family? *Immunol. Rev.* **226**:248–262.
87. **Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, et al.** 2000. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*. **13**:715–725.
88. **Jones LL, Vignali DA.** 2011. Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily. *Immunol. Res.* **51**:5–14.
89. **Hunter CA.** 2005. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat. Rev. Immunol.* **5**:521–531.
90. **Kastelein RA, Hunter CA, Cua DJ.** 2007. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* **25**:221–242.
91. **Dong C.** 2008. IL-23/IL-17 biology and therapeutic considerations. *J. Immunotoxicol.* **5**:43–46.
92. **Moraes-Vasconcelos D, Grumach AS, Yamaguti A, Andrade ME, Fieschi C, de Beaucoudrey L, Casanova JL, Duarte AJ.** 2005. *Paracoccidioides brasiliensis* disseminated disease in a patient with inherited deficiency in the beta1 subunit of the interleukin (IL)-12/IL-23 receptor. *Clin. Infect. Dis.* 2005. **41**:31-7.
93. **Aoki T, Narumiya S.** 2012. Prostaglandins and chronic inflammation. *Trends in Pharmacological Sciences.* **33**:304-311.
94. **Khayrullina T, Yen JH, Jing H, Ganea D.** 2008. In vitro differentiation of dendritic cells in the presence of prostaglandin E2 alters the IL-12/IL-23 balance and promotes differentiation of Th17 cells. *J. Immunol.* **181**: 721–735.

95. **Chu WM.** 2012. Tumor necrosis factor. *Cancer Letters*. **328**:222-225.
96. **Vassiliou E, Jing H, Ganea D.** 2003. Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits TNF production in murine bone marrow-derived dendritic cells. *Cell Immunol*. **223**:120–32.
97. **Harizi H, Gulade N.** 2004. Inhibition of IL-6, TNF- $\alpha$ , and cyclooxygenase-2 protein expression by prostaglandin E<sub>2</sub>-induced IL-10 in bone marrow- derived dendritic cells. *Cell Immunol*. **228**: 99–109.
98. **Algood, HM., Lin PL, Flynn, JL.** 2005. Tumor necrosis factor and chemokine interactions in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis. *Clin. Infect. Dis*. **41**:S189–S193
99. **Kawakami K.** 2008. Immune response and its clinical significance in fungal infection. *Nihon Rinsho*. **66**:2245-53.
100. **van de Veerdonk FL, Kullberg BJ, Netea MG.** 2010. Pathogenesis of invasive candidiasis. **16**:453-9.
101. **Wood KL, Hage CA, Knox KS, Kleiman MB, Sannuti A, Day RB, Wheat LJ, Twigg HL .** 2003. Histoplasmosis after treatment with anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  therapy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. **167**:1279–1282
102. **Mertz LE, Blair JE.** 2007. Coccidioidomycosis in rheumatology patients: incidence and potential risk factors. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. **1111**:343–357
103. **Warris A, Bjorneklett A, Gaustad P.** 2001. Invasive pulmonary aspergillosis associated with infliximab therapy. *N. Engl. J. Med*. **344**:1099–1100
104. **Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ.** 2001. Imbalance of IL-2, IFN- $\gamma$  and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine*. **13**:248-52.
105. **Calvi SA, Peracoli MT, Mendes RP, Marcondes-Machado J, Fecchio D, Marques SA, et al.** 2003. Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. *Microbes Infect*. **5**:107-13.



*Anaxos*



Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.  
CEP: 18.618-970.  
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143  
e-mail: secretaria\_capelluppi@fmb.unesp.br  
e-mail: coordenadoria\_tsardenj@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde  
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 05 de setembro de 2011.

Of. 375/2011

Ilustríssima Senhora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ângela Maria Victoriano de Campos Soares

Departamento de Microbiologia e Imunologia do

Instituto de Biociências de Botucatu

Prezada Prof<sup>a</sup> Ângela,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa -(Protocolo CEP 3961-2011) "**Papel de prostaglandinas e leucotrienos sobre as funções das células dendríticas em resposta ao Paracoccidioides brasiliensis**", a ser conduzido por Reginaldo Keller Fernandes, orientado por Vossa Senhoria, Co-orientada pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciane Alarcão Dias Melício, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 05/09/2011.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Ao final da execução do Projeto, apresentar ao CEP "**Relatório Final de Atividades**".

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi  
Secretário do CEP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



## CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convido o Senhor(a), \_\_\_\_\_,  
RG nº \_\_\_\_\_, telefone (opcional): \_\_\_\_\_, residente  
à \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, **a participar do projeto de pesquisa** "Papel de prostaglandinas e leucotrienos sobre as funções das células dendríticas em resposta ao *Paracoccidioides brasiliensis*". **Entendi que os pesquisadores querem testar o efeito de substâncias inflamatórias sobre a resposta de células de defesa do corpo a um fungo causador de uma micose bastante grave que atinge além da pele e mucosas, alguns órgãos internos, como o pulmão. Entendi também, que para a realização desse estudo é necessário usar 50 ml do meu sangue pois essas células serão isoladas desse sangue, cultivadas no laboratório e posteriormente estudadas.** Concordando em participar, estou ciente de que apenas as células de defesa chamadas de células brancas do meu sangue, serão usadas para a realização dessa pesquisa. Compreendi que a retirada do meu sangue pode resultar em dor local e a formação de uma mancha roxa ocasionada pela picada da agulha, que não haverá necessidade de alterar a quantidade de sangue a ser doado e que o meu nome não aparecerá quando os resultados da pesquisa forem divulgados. **Entendi também que eu não vou ser diretamente beneficiado pelos resultados, mas que as pessoas que tem essa micose poderão ser beneficiadas no futuro.**

O trabalho será desenvolvido pelo mestrando **Reginaldo keller Fernandes**, sob orientação da Prof. Titular **Ângela Maria Victoriano de Campos Soares** do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu.

**Assim considero-me esclarecido(a) e concordo em colaborar com o desenvolvimento do projeto, permitindo o uso das minhas células. Afirmando não ter sido pressionado(a) física ou psicologicamente para colaborar com a pesquisa ou assinar o presente termo, estando ciente que os responsáveis por este trabalho estarão disponíveis para responder a quaisquer perguntas ou dúvidas no**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



**Departamento de Microbiologia e Imunologia. O não consentimento da minha parte não interferirá na qualidade do atendimento de minha saúde em qualquer setor do HC-FMB/UNESP.**

**Observação:** O Senhor(a) receberá uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Dúvidas adicionais poderá ser obtida no Comitê de Ética em Pesquisa por meio do telefone 3811 61 43.

Botucatu, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
**Doador**

\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Ângela M. V. Campos Soares**

**Depto. Microbiologia e Imunologia**

**Instituto de Biociências de Botucatu**

\_\_\_\_\_  
**Reginaldo Keller Fernandes**

**UNESP**

**Depto. Microbiologia e Imunologia**

**Orientadora**

**Instituto de Biociências de Botucatu**

**Pesquisador Responsável**