

Guilherme Augusto Biondo

**Produção de Prostaglandinas e
Leucotrienos por *Paracoccidioides
brasiliensis***

Botucatu

2008

Guilherme Augusto Biondo

Produção de Prostaglandinas e Leucotrienos por
Paracoccidioides brasiliensis

Orientadora:

Prof^a Adjunta Ângela Maria Victoriano de Campos Soares

Dissertação apresentada ao curso de
Pós-Graduação em Doenças Tropicais
da Faculdade de Medicina de Botucatu
– UNESP, para obtenção do Título de
Mestre em Doenças Tropicais.

Botucatu

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Biondo, Guilherme Augusto.
Produção de prostaglandinas e leucotrienos por *Paracoccidioides brasiliensis* / Guilherme Augusto Biondo. – Botucatu: [s.n.], 2008.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2008.
Orientadora: Ângela Maria Victoriano de Campos Soares
Assunto CAPES: 21201030

1. Microbiologia 2. *Paracoccidioides brasiliensis*

CDD 589.2

Palavras-chave: Ácido araquidônico; Eicosanóides; Leucotrieno; *Paracoccidioides brasiliensis*; Prostaglandina

Trabalho realizado nos Laboratórios do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências – UNESP, Botucatu, com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

**"Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha,
porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra.**

**Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha,
mas não vai sozinha e nem nos deixará só,
porque leva um pouco de nós e deixa um pouco de si.**

**Há os que levam muito e deixam pouco,
há os que levam pouco e deixam muito.**

**“Essa é a mais bela responsabilidade da vida e
a prova de que não nos encontramos por acaso.”**

Pedra

O distraído nela tropeçou...

O bruto a usou como projétil.

O empreendedor, usando-a, construiu.

O camponês, cansado da lida, dela fez assento.

Para meninos, foi brinquedo.

Drummond a poetizou.

**Já, David matou Golias, e Michelangelo extraiu-lhe a mais bela
escultura...**

**E em todos esses casos, a diferença não esteve na pedra, mas no
homem!**

**Não existe "pedra" no seu caminho que você não possa aproveitá-la
para o seu próprio crescimento.**

Dedicatória

A meus pais, Newton Eduardo Biondo e Sueli de Fátima Luz Biondo. A vocês sou grato pelo apoio em minhas escolhas, pela educação a mim dada que me possibilitou vencer os obstáculos impostos pela vida com dignidade e honestidade e pelo exemplo de vida.

A meus irmãos, Eduardo Luis Biondo e Aline Biondo pela amizade e pela disposição em me ajudar sempre que precisei.

À Karina Paschoal de Paula. Pelo companheirismo, amizade, paciência e amor. Tenho certeza que foi Deus que a colocou nos caminhos de minha vida.

À Maria Eduarda Castilho Biondo, que me trouxe muita felicidade e alegria em momentos muito difíceis de minha vida.

À minha orientadora Profª Drª Ângela M. V. C. Soares. A você sou grato pela orientação científica e por acreditar em mim e me acompanhar até o fim desta jornada.

Agradecimentos

A Deus, pela sua presença, bênçãos, força e paciência me dadas nos momentos certos de minha vida.

Aos meus avós Joaquim Sebastião da Luz (*in memorian*), Edhegal Aparício Biondo (*in memorian*), Elisa Pitoli da luz e Teresa de Faveri Biondo que são um exemplo de vida pra mim.

Aos meus tios, tias, primos e primas que me apoiaram e me incentivaram muito nesta fase de minha vida.

Aos meus amigos da Farmácia Coração de Jesus, Nilton, Andréia, Adrieli, Nilson, Adriano, Bruno, Camilo, Rafael, Silvana, Adriana, Vanessa, José Antonio, Osmar, Luis e Alexandre.

À Maria José Paschoal e Tadeu Paschoal de Paula pela amizade e carinho.

Às amigas de laboratório Ana Paula, Michele e Elisandra que foram fundamentais para o desenvolvimento de meu trabalho e muito contribuíram para o meu crescimento.

Aos amigos do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Helan, Douglas, Claudio, Juliana, Luciane, Érika, Camila, Fabiane, Renata e todos que colaboraram com este trabalho.

Aos Professores, Dr. Silvio, Drª Terezinha, Dr. Maurício, Dr. Ramon, Drª Alexandrina, Dr. João Candeias, Dr. Eduardo, Drª Lurdinha e Dr. João Pessoa.

Aos Professores do curso de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, pelos valiosos conhecimentos transmitidos.

À professora Terezinha Serrão Peraçoli pelas sugestões no exame de qualificação.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Sônia, Nice, Lula e Luis pela disposição em sempre ajudar.

Aos Funcionários da Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, Natanael, Regina, Janete, Lilian, pela dedicação e auxílio.

Ao Prof. Dr. Paulo Câmara Marques Pereira, coordenador do Curso de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, e à Solange, secretária da Pós-Graduação do Departamento de Doenças Tropicais.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	23
3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1. CULTIVO DE <i>P. brasiliensis</i>	27
4.2. TESTE DE VIABILIDADE E OBTENÇÃO DAS SUSPENSÕES DE <i>P. brasiliensis</i>	27
4.3. CULTURA DE CÉLULAS FÚNGICAS DE <i>P. brasiliensis</i>	27
4.4. AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DE FUNGOS VIÁVEIS.....	28
4.5. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PGE ₂ E LTB ₄	29
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
6. RESULTADOS.....	31
6.1. PRODUÇÃO DE PGE ₂ POR DIFERENTES CEPAS DE <i>P. brasiliensis</i>	31

6.2. PRODUÇÃO DE PGE ₂ POR DIFERENTES CEPAS DE <i>P. brasiliensis</i> UTILIZANDO FONTE EXÓGENA DE ÁCIDO ARAQUIDÔNICO.....	36
6.3. ASSOCIAÇÃO ENTRE PRODUÇÃO DE PGE ₂ E VIABILIDADE DE <i>P.</i> <i>brasiliensis</i>	41
6.4. PRODUÇÃO DE LTB ₄ POR DIFERENTES CEPAS DE <i>P. brasiliensis</i>	46
6.5. PRODUÇÃO DE LTB ₄ POR DIFERENTES CEPAS DE <i>P. brasiliensis</i> UTILIZANDO FONTE EXÓGENA DE ÁCIDO ARAQUIDÔNICO.....	51
6.6. ASSOCIAÇÃO ENTRE PRODUÇÃO DE LTB ₄ E VIABILIDADE DE <i>P.</i> <i>brasiliensis</i>	56
7. DISCUSSÃO.....	62
8. CONCLUSÃO.....	68
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
10. RESUMO.....	83
11. ABSTRACT.....	85

1. INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma infecção fúngica sistêmica, cujo agente etiológico foi descrito em 1908 por Adolpho Lutz¹, e caracterizado morfológica e biologicamente por Alfonso Splendore² em 1912 e Floriano Paulo de Almeida³ em 1930, sendo posteriormente denominado *Paracoccidioides brasiliensis*⁴.

O *P. brasiliensis* é um fungo imperfeito e termodimórfico, que nos tecidos do hospedeiro ou quando cultivado a 37°C em meios de cultura enriquecidos se desenvolve como levedura, enquanto que à temperatura ambiente, com variação de 4 a 28°C apresenta-se na forma de micélio⁵.

A relação entre *P. brasiliensis* e o meio ambiente ainda não está totalmente esclarecida, mas acredita-se que o micélio seja a forma sapróbia do fungo na natureza, que sob certas condições produz os conídios, estrutura de reprodução assexuada de propagação da espécie. Possivelmente, os conídios cresçam no solo, água e em plantas à temperatura ambiente, sendo as formas infectantes^{5,6}. O isolamento de *P. brasiliensis* de órgãos de tatus capturados nas matas do estado do Pará, Brasil, realizado por Naiff et al⁷ foi de extrema importância, por ter sido a primeira vez que se documentou um reservatório animal do parasita na natureza. Bagagli et al⁸ confirmaram esse achado na região endêmica de Botucatu, São Paulo, Brasil, ao isolar três amostras fúngicas de tatus, que apresentam dimorfismo termo-dependente e expressam a glicoproteína de 43kDa (gp43), considerada o antígeno imunodominante do *P. brasiliensis*⁹⁻¹¹.

A doença atinge principalmente homens adultos, com uma proporção homem/mulher de 13:1 em algumas áreas endêmicas¹²⁻¹³. Esta menor incidência da doença em mulheres deve-se ao envolvimento de fatores hormonais na resistência ao fungo^{12, 14,15}.

A porta de entrada do *P. brasiliensis* no organismo humano é a via respiratória¹⁶⁻²⁰ pela qual esporos do fungo alcançam os bronquíolos terminais e alvéolos pulmonares. Assim, as lesões primárias da PCM ocorrem com maior frequência nos pulmões. O estabelecimento da infecção pulmonar marca a

transformação da forma miceliana do fungo para a forma de levedura, que é patogênica²¹⁻²².

Uma vez no hospedeiro, o *P. brasiliensis* induz lesões granulomatosas crônicas que comprometem especialmente os tecidos pulmonares, as mucosas e o sistema fagocítico mononuclear, podendo disseminar-se para vários órgãos. A doença apresenta uma gama de sinais e sintomas agrupados em dois padrões principais que definem as suas formas aguda e crônica²³. A forma aguda ou subaguda, também chamada juvenil, ocorre principalmente em crianças, adolescentes e adultos jovens. Apresenta história clínica de curta duração, em geral de 1 a 2 meses e sinais compatíveis com o envolvimento do sistema fagocítico mononuclear, caracterizado por adenopatias e hepato e/ou esplenomegalia²⁴. Nos pacientes que apresentam essa forma clínica da doença, as lesões de mucosa são frequentes, ocorrendo em 15 a 20% dos casos e o acometimento pulmonar é raro, estando presente apenas em 5 a 11% dos pacientes^{24, 25}. A forma crônica da PCM acomete em geral adultos com idade superior a 30 anos que apresentam quadro clínico de duração prolongada, com envolvimento pulmonar e mucoso na maioria dos casos. Comprometimento de linfonodos pode ser observado menos frequentemente nessa forma clínica²⁴⁻²⁶.

O estabelecimento da doença, sua disseminação e gravidade dependem de fatores ligados ao fungo, como virulência e composição antigênica, das condições ambientais e principalmente dos fatores ligados ao hospedeiro, como idade, sexo, estado nutricional, patrimônio genético e principalmente a sua capacidade em desenvolver uma resposta imune^{12, 15, 25, 27, 28}. Dentre os mecanismos envolvidos nesta resposta, os representados pelas células fagocitárias desempenham papel central na resistência contra esses patógenos, destacando-se a participação na reação inflamatória e na atividade fungicida. Estas funções, no entanto, dependem de mecanismos de ativação dessas células, gerados pela interação com o próprio fungo ou com fatores da resposta imune inespecífica e específica, como as citocinas^{29, 30}. Outros fatores como prostaglandinas (PGs) e leucotrienos (LTs) podem participar ativamente da modulação dessa atividade celular. No entanto, são raros os trabalhos que tiveram o objetivo de avaliar o papel desses fatores, potencialmente moduladores, como as PGs e LTs.

As PGs são mediadores lipídicos, gerados a partir da grande família de produtos gerados a partir da oxidação do ácido araquidônico, que por sua vez, se originam de fosfolipídios da membrana celular. O ácido araquidônico liberado pelas fosfolipases é oxidado por ação de enzimas conhecidas como cicloxigenases (COXs), dando origem às PGs (PGE₂, PGD₂ e PGF₂). Existem duas isoformas de COXs, sendo que há diferenças significantes na distribuição tecidual e nos níveis de expressão entre as mesmas. A COX-1 é expressa constitutivamente em muitos tipos de células, particularmente no estômago, intestino, rins e plaquetas³¹. A COX-2 é uma isoforma induzível, condicionada a estímulos inflamatórios e, pode ser expressa em uma grande variedade de células e tecidos em resposta a citocinas, pirógenos, forbol éster, traumas e infecções por vírus³².

Por outro lado, drogas antiinflamatórias são capazes de inibir as COXs. A indometacina (INDO) é uma droga utilizada classicamente para a inibição da síntese de PGs. Este antiinflamatório, em altas doses atua sobre as duas isoformas da COX, contudo, em baixas doses apresenta seletividade pela COX-2.

As PGs, particularmente as PGE₂, exercem diversos efeitos sobre a regulação e atividade das células T, particularmente as CD₄⁺, atuando na modulação da proliferação dessas células, apoptose e produção de citocinas. A inibição da proliferação das células T pela PGE₂ pode ser devido, em parte, à inibição da síntese de poliaminas³³, à inibição tanto da liberação de cálcio intracelular como da proteína tirosina quinase^{34, 35} ou ainda via inibição da liberação de IL-2³⁶. A indução de apoptose de células T por PGE₂ é dependente do estado de maturação e ativação dessas células. De uma forma geral, PGE₂ induz apoptose de células maduras, em repouso, mas inibe esse processo em células ativadas³⁷⁻³⁹.

Um dos mais importantes efeitos da PGE₂ é sobre a produção de citocinas por células T. Embora existam trabalhos mostrando que a PGE₂ aumenta a síntese de IFN- γ por células Th₁ estimuladas por antígenos⁴⁰, seu efeito preponderante sobre as células parece ser o de supressão. Esse mediador inibe de uma forma bastante acentuada, a produção de citocinas liberadas por Th₁, como IFN- γ e IL-12, mas aumenta a produção de citocinas de padrão de resposta Th₂, como a IL-4, IL-5 e IL-10^{41, 42}. A PGE₂ também

inibe a proliferação das células CD_8^{+43} e diminui a produção de IFN- γ por essas células⁴⁴.

A PGE_2 exerce também um importante efeito sobre células apresentadoras de Ag, como células dendríticas e macrófagos. Em relação as primeiras, os resultados são conflitantes uma vez que, trabalhos têm demonstrado que a PGE_2 aumenta a produção de IL-12 por essas células na ausência de estimulação por LPS⁴⁵. No entanto, esse mediador inibe a produção de IL-12 por células dendríticas da medula óssea⁴⁶ e aumenta a produção de IL-10⁴⁷. Assim, a presença de PGE_2 no primeiro contato das células TCD_4^{+} com o antígeno induz a diferenciação dessas células em Th_2 . A PGE_2 atua ainda sobre células NK, inibindo a produção de IFN- γ , induzida por IL-12 e IL-18⁴⁸.

A PGE_2 regula também, de forma bastante acentuada, a produção de citocinas por macrófagos ativados, inibindo a produção de TNF- α , IL-1 β e IL-12, assim como a expressão de receptores para essas citocinas, aumentando, no entanto, a produção de IL-10^{49, 50}.

Os efeitos das PGs citados acima, particularmente os que demonstram uma inibição da atividade de células T, têm levado os pesquisadores a desenvolver trabalhos com o objetivo de estudar o papel desses mediadores nos mecanismos de imunossupressão desenvolvidos por algumas infecções. Em camundongos infectados com *Mycobacterium intracellulare*, as PGs suprimem a produção de IFN- γ pelos linfócitos com consequente inibição da atividade microbicida de macrófagos⁵¹.

Camundongos infectados com *Leishmania major*⁵² ou *Mycobacterium leprae*⁵¹ produzem elevados níveis de PGs associados à depressão da resposta imune e doença mais grave. Camundongos BALB/c infectados com *Leishmania major*, susceptíveis à infecção, desenvolveram resposta imune preferencialmente mediada por Th_2 ⁵³. O glicocalyx de *Staphylococcus epidermidis* ativa a produção de PGE_2 por monócitos, contribuindo para a inibição da proliferação de células T⁵⁴.

Schleifer e Mansfield⁵⁵ demonstraram, que a ativação de macrófagos durante a infecção por *Trypanosoma brucei rhodesiense* leva à liberação de NO e PGs que inibem a resposta proliferativa de células T durante a infecção.

Pinge-Filho et al⁵⁶, demonstraram que grandes quantidades de PGE₂, TNF- α e NO são produzidas durante a infecção por *Trypanossoma cruzi* e que esses mediadores participam de um circuito que inibe as respostas de linfoproliferação e de citocinas à infecção por esse microrganismo. Assim, o TNF- α estimula a síntese de PGs e NO que inibe a síntese de TNF- α . A inibição combinada de PGs e NO restaura a capacidade proliferativa das células.

A PGE₂ também participa da patogênese da tuberculose pulmonar em camundongos, uma vez que durante a fase inicial da infecção, foram detectadas baixas concentrações de PGE₂ associadas à expressão da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), permitindo o controle do crescimento do bacilo. Já, durante uma fase mais tardia altas concentrações de PGE₂ estiveram associadas com diminuição da expressão de IFN- γ , TNF- α , iNOS e alta expressão de IL-4, permitindo a progressão da doença⁵⁷.

Barros-Mazon et al⁵⁸, demonstraram que a IL-10 está envolvida na supressão da resposta em pacientes com a forma cardíaca da doença de chagas, enquanto que as PGs regulam a linfoproliferação de células tanto de pacientes com forma cardíaca, como indeterminada da doença.

Quantidades significantes de PGE₂ são produzidas pelas cercárias de *Schistosoma mansoni*. Adicionalmente, esses parasitas são capazes de induzir a produção de PGE₂ e IL-10 por queratinócitos humanos e de camundongos, mecanismo responsável pela inibição da resposta imune do hospedeiro⁵⁹.

Estudos semelhantes aos descritos acima foram realizados em modelo experimental de PCM⁶⁰. Os autores demonstraram que durante a infecção ocorre uma grande liberação de PGE₂, que medeia a imunossupressão em fases precoces da infecção por um mecanismo dependente de IL-4 e IL-10.

Em nossos laboratórios, detectamos que monócitos humanos quando em contato com o *P. brasiliensis* liberam PGs que inibem a atividade fungicida dessas células. Devido a esse efeito inibidor, as células para desenvolverem atividade fungicida significativa contra o fungo devem ser pré-ativadas com IFN- γ e, durante o desafio, liberar altas concentrações de TNF- α . A ativação das células com essas citocinas compensaria os efeitos inibitórios das PGs

sobre os mecanismos efetores das células responsáveis pela destruição do fungo⁶¹. Em trabalhos posteriores demonstramos que as PGs modulam a atividade fungicida inibindo a produção de TNF- α e H₂O₂, os metabólitos envolvidos no mecanismo efetor dessas células⁶².

Leucotrienos (LTs) são mediadores lipídicos derivados dos metabólitos do ácido araquidônico, pela via da 5-lipoxigenase (5-LO), em conjunto com uma proteína auxiliadora, a 5-LO-activating protein (FLAP). Eles são formados a partir de um hidroperóxido (5-HPETE) o qual é transformado em leucotrieno A₄ (LTA₄) com formação de um grupamento epóxido, que é um oxigênio ligando os carbonos 5 e 6 da molécula. Este, por sua vez, é instável e pode sofrer hidrólise enzimática gerando leucotrieno B₄ (LTB₄) ou então receber um resíduo de glutathione gerando o leucotrieno C₄ (LTC₄). A retirada enzimática do ácido glutâmico do LTC₄ dá origem ao leucotrieno D₄ (LTD₄) e com a retirada da glicina do LTD₄ forma-se o leucotrieno E₄ (LTE₄). Estes LTs são conhecidos coletivamente como cisteinil leucotrienos ou leucotrienos peptídicos⁶³.

O LTB₄ foi descoberto em 1979 por Samuelsson⁶⁴ e em 1980 Ford-Hutchinson et al⁶⁵, demonstraram que esta molécula tem capacidade quimiotática para neutrófilos. Além da atividade quimiotática, o LTB₄ também propicia aumento de neutrófilos em tecidos através da inibição da apoptose⁶⁶.

O LTB₄ estimula várias funções de leucócitos, incluindo aderência, fagocitose⁶⁷, secreção de espécies reativas do oxigênio e liberação de enzimas lisossomais⁶⁸. Outros estudos revelaram que, macrófagos alveolares produzem LTs e esses aumentam a atividade microbicida destas células por mecanismos dependentes da produção de NO⁶⁹⁻⁷¹, enzimas lisossomais⁷², defensinas⁷³ e ativação da enzima NADPH oxidase^{71, 74-75}.

A ação do LTB₄ é mediada através da interação com seus receptores acoplados a proteína G (GPCRs). Dois GPCRs foram identificados, o BLT1 e o BLT2⁷⁶⁻⁷⁷ e os efeitos descritos acima são mediados principalmente pelo receptor BLT1. Os LTs são moléculas que apresentam importante papel tanto na resposta imune como na patogênese de doenças inflamatórias, tais como asma, artrite, glomerulonefrite, participa na fibrose cística, doenças pulmonares crônicas obstrutivas, esclerose múltipla, psoríase⁷⁸. Eles são potentes quimioatraentes para neutrófilos e eosinófilos, e liberados após a ativação celular por patógenos ou mediadores solúveis.

Estas ações na ativação celular e regulação da atividade microbicida de fagócitos sugerem a importância dos LTs na proteção do hospedeiro contra diferentes agentes infecciosos.

With e Kierszenbaum⁷⁹ observaram que tanto LTB₄ como o LTC₄, aumentam a fagocitose do *Trypanossoma cruzi* por macrófagos peritoneais de camundongos.

Bailie et al⁸⁰ demonstraram um aumento na produção de LTs e do número de neutrófilos nos pulmões de camundongos infectados por *Klebsiella pneumoniae*. Por outro lado, animais knockout para 5-LO exibiram acentuada bacteremia após o desafio com a bactéria, com consequente morte desses animais.

Serezani et al⁸¹ demonstraram que o LTB₄ aumenta significativamente a atividade microbicida dos macrófagos alveolares infectados com *Klebsiella pneumoniae*, sendo essa atividade dependente da ativação da enzima NADPH oxidase.

Talvani et al⁶⁹, descreveram que a adição de LTs nas culturas de macrófagos peritoneais murinos, induzem produção de NO, aumento da síntese de TNF- α e da atividade microbicida contra o *Trypanossoma cruzi*. Camundongos resistentes a *Leishmania amazonensis* produzem maiores níveis de LTB₄ quando comparados a cultura de células dos animais suscetíveis que não produzem LTB₄ e não desenvolvem atividade microbicida⁸².

Em adição aos efeitos diretos dos LTs sobre as funções de fagócitos, esses mediadores também atuam indiretamente na resposta imune inata, através da estimulação de outros mediadores inflamatórios como citocinas. O LTB₄ induz a produção de TNF- α ⁸³ por monócitos, IL-8 por neutrófilos⁸⁴ e de IL-5 e TNF- α por mastócitos⁸⁵.

Além da atuação dos LTs sobre a produção de citocinas, outros estudos também mostram os efeitos destas substâncias na ativação celular para a produção desses mediadores. Macrófagos de camundongos deficientes para a produção de GM-CSF, exibem níveis reduzidos da síntese de LTs⁸⁶ e a adição de CSFs mostram o aumento da biossíntese de LT *in vitro*⁸⁷⁻⁸⁸ e *in vivo*⁸⁹⁻⁹⁰.

A adição de LTs em culturas de neutrófilos humanos desafiados com *M. bovis*, aumentou a capacidade de destruição da micobactéria por essas células. Além disso, a ativação dos PMN com a citocina G-CSF aumentou tanto a síntese de LTs pelos neutrófilos PMN como a atividade antimicrobiana⁹¹.

Peres et al⁹² estudaram o papel dos LTs na regulação da resposta protetora Th₁ na infecção *in vivo* com *Mycobacterium tuberculosis*, demonstrando que esses produtos da 5-LO tem papel protetor na resposta do hospedeiro aumentando a atividade micobactericida.

Alguns trabalhos demonstraram que inibidores da ativação da 5-LO e antagonistas de LTs bloqueiam a ativação de proteínas quinases associadas ao receptor dos LTs, impedindo a fosforilação da fosfolipase A2 citosólica e a liberação de ácido araquidônico. O MK886 é um potente inibidor da síntese de LTs, tanto *in vivo* como *in vitro*, não tendo efeito em outras vias do ácido araquidônico. Sua ação se dá na translocação da 5-LO e bloqueio de sua subsequente ativação, evitando assim a biossíntese celular deste metabólito⁹³.

Mancuso et al⁶⁷, demonstraram, que macrófagos murinos produzem LTB₄, LTC₄ e 5-HETE, durante o processo de fagocitose de *Klebsiella pneumoniae*. A inibição da síntese de LTs por MK-886 diminuiu a fagocitose de *Klebsiella pneumoniae* opsonizada, por macrófagos em aproximadamente 50%. Outro estudo demonstrou que o MK-886 diminui o número de eosinófilos sanguíneos nos tecidos durante todas as fases de infecção de *Toxocara canis*, sugerindo que o bloqueio dos LTs evita a eosinofilia no decorrer da infecção⁹⁴.

Em estudos com camundongos infectados com *Histoplasma capsulatum* observaram que LTs tem um papel essencial no controle da resposta inflamatória e eliminação da infecção. O tratamento dos animais com MK886 aumentou o recrutamento de leucócitos e a síntese de TNF- α , IL-1 e IL-6 bem como o número de fungos no parênquima pulmonar desses animais, e inibiu a produção de IL-12, IL-15, IL-2 e IFN- γ ⁹⁵.

Com relação aos efeitos dos LTs na PCM, Ribeiro & Calich⁹⁶ verificaram, que a infecção *in vitro* ou *in vivo* com *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 gravidade da PCM pulmonar. Assim, os autores sugerem que os LTs são importantes mediadores da reação inflamatória aguda na infecção pelo *P. brasiliensis*, alterando a recuperação fúngica e o influxo celular em animais susceptíveis à doença. Em adição, os LTs atuam na resposta de macrófagos após a interação com o fungo, como importante modulador da resposta destas células em murinos.

Em conjunto, os trabalhos citados mostram que tanto PGs como LTs podem ser gerados em resposta a estímulos de microrganismos, incluindo o *P. brasiliensis*, podendo desempenhar um importante papel modulador sobre a resposta do hospedeiro à infecção.

Dentro do estudo desse efeito modulador, surge a questão de que cepas de alta e baixa virulência do *P. brasiliensis* podem induzir as células fagocíticas a liberarem quantidades diferentes desses mediadores. No entanto, trabalhos na literatura têm demonstrado que apesar das células do hospedeiro constituir uma importante fonte de eicosanóides, outra fonte em potencial para a produção desses mediadores, seriam os próprios fungos. Nesse sentido, Noverr et al⁹⁷, observaram, que tanto *Cryptococcus neoformans* como *Candida albicans*, secretam PGs e LTs. Os autores discutem que a descoberta de que fungos patogênicos produzem e respondem aos eicosanóides imunomoduladores, revela um mecanismo de virulência que tem potencialmente grandes implicações para o entendimento dos mecanismos das infecções fúngicas.

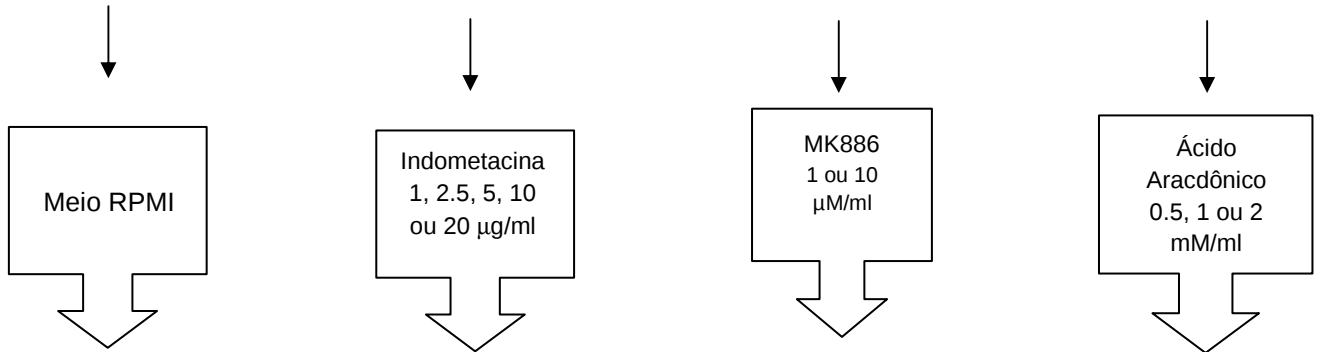
Neste contexto, os trabalhos na literatura sobre a PCM devem ser dirigidos no sentido de avaliar a capacidade do *P. brasiliensis* induzir as células do hospedeiro a produzir eicosanóides imunomoduladores, assim como ter o seu próprio potencial nessa produção.

2. OBJETIVOS

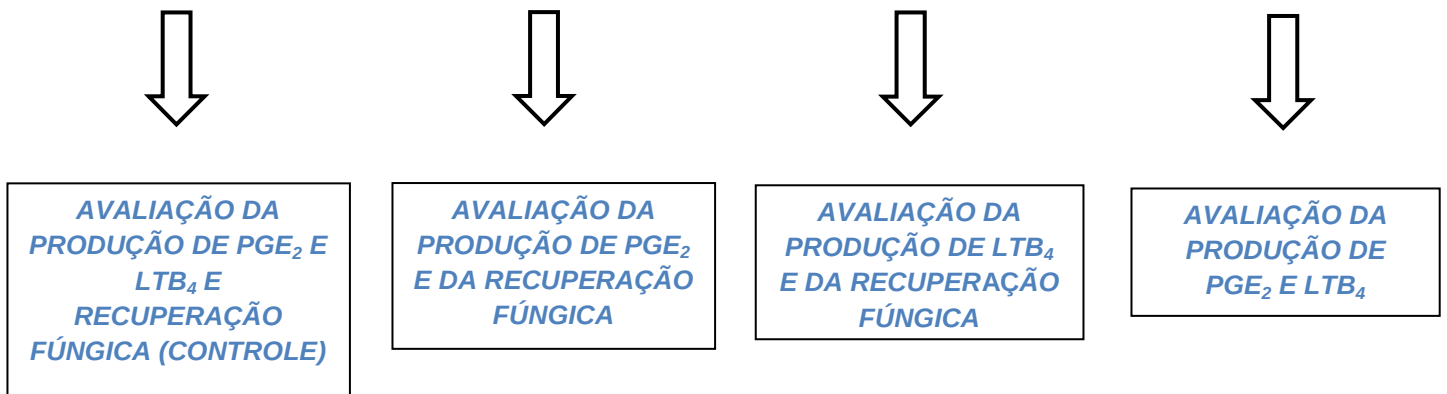
1. Avaliar se cepas de *P. brasiliensis* de diferentes virulências tem capacidade de produzir PGE₂ e LTB₄.
2. Avaliar as vias enzimáticas de produção desses mediadores.
3. Avaliar se o fungo pode utilizar fontes exógenas de ácido araquidônico para a produção desses mediadores.
4. Avaliar se a produção desses mediadores está relacionada com a sobrevivência do *P. brasiliensis*.

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Culturas de *P. brasiliensis* das cepas Pb18, Pb265, Pb192 ou BT79



Incubação por 4 e 8 a 37°C em atmosfera constante de 5% de CO₂



4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CULTIVO DO *P. brasiliensis*.

Foram utilizadas as cepas Pb18, Pb265, BT79 e Pb192 do *P. brasiliensis* mantidas em nosso laboratório através de cultivo em meio GPY, (2% glicose, 1% peptona e 0,5% extrato de levedura) a 37°C, em tubos de 20 x 20 mm, com subcultivos semanais. As culturas foram usadas após 5 ou 6 dias de cultivo.

4.2. TESTE DE VIABILIDADE E OBTENÇÃO DAS SUSPENSÕES DE *P. brasiliensis*.

Células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram cultivadas conforme descrito no item 4.1. Após o crescimento, essas células foram removidas da superfície de cultivo com auxílio de alça de platina e transferidas para tubos estéreis contendo pérolas de vidro de 4 mm de diâmetro e aproximadamente 10 mL de meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, Mo), suplementado com 2nM de L-glutamina, 40µg de gentamicina, para homogeneização em agitador de tubos tipo Vortex por 30 segundos. Uma amostra desta suspensão foi coletada para verificação da viabilidade das leveduras através da observação em microscópio com contraste de fase. Foram consideradas como células viáveis as que apresentarem aspecto brilhante (refringente), uma vez que as células mortas apresentam-se com coloração escura. Foram utilizadas suspensões com viabilidade maior ou igual a 95%⁶¹.

4.3. CULTURA DE CÉLULAS FÚNGICAS DO *P. brasiliensis*.

Para a realização das culturas de *P. brasiliensis*, as células leveduriformes das cepas Pb18, Pb265, BT79 e Pb192 obtidas conforme o item 4.2, foram contadas em câmara hemocitométrica tipo Neubauer e a concentração ajustada para 4×10^4 células leveduriformes/ml, em RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, Mo), suplementado com 2Nm de L-glutamina,

40µg de gentamicina. As suspensões fúngicas foram distribuídas em placas de microcultura com 96 orifícios (0,1ml/orifício) e incubadas por 4 ou 8 horas na presença ou ausência de INDO nas concentrações de 1, 2.5, 5, 10 ou 20 µg/ml (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, Mo) ou na presença ou ausência de MK886 nas concentrações de 1 ou 10 µM (Merck Frosst, Canada Inc.), em estufa de tensão de 5% de CO₂ à 37°C, para os ensaios de recuperação fúngica e dosagem de PGE₂ ou LTB₄.

Para realização dos ensaios referentes ao uso de fontes exógenas de AA pelas diferentes cepas do *P. brasiliensis*, as culturas foram incubadas na presença ou ausência de AA (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, Mo), nas concentrações 0.5, 1 ou 2 Mm por 4 e 8 horas em estufa de tensão de 5% de CO₂ à 37°C, e posteriormente foram avaliadas as produções de PGE₂ ou LTB₄.

4.4. AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DE FUNGOS VIÁVEIS.

Após o período de incubação de 4 ou 8 horas com INDO ou MK 886 (como descrito no item 4.3), os sobrenadantes das culturas de células leveduriformes das diferentes cepas cultivadas em placas de 96 orifícios foram coletados e a seguir os orifícios foram lavados por 3 vezes com meio RPMI-1640 para remoção de todas as células fúngicas. As suspensões obtidas através deste processo foram adicionadas aos sobrenadantes já coletados completando um volume final de 2 ml. Essas suspensões, contendo fungos viáveis ou não foram plaqueadas em triplicata de 100µl em placas contendo meio de cultura BHI – ágar (OXOID LTD., England), na concentração de 47g/L, acrescido de 4% de soro de cavalo, 50 µg/mL de gentamicina e 5% de extrato aquoso. O extrato aquoso foi preparado a partir de filtrado de cultura de células leveduriformes do fungo (cepa 192)⁹⁸, cultivadas em meio GPY a 37°C e com agitação (120 RPM) durante 7 dias. A recuperação fúngica foi detectada através da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) após 10 dias de semeadura.

4.5. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PGE₂ E LTB₄.

Após o período de incubação de 4 ou 8 horas com os tratamentos descritos no item 4.3, os sobrenadantes das culturas de células leveduriformes das diferentes cepas cultivadas em placas de 96 orifícios foram coletados e os níveis de PGE₂ (R&D Systems, McKinley Place, Minneapolis, USA) e LTB₄ (Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan, USA) produzidos foram avaliados com a utilização de kits comerciais específicos de ELISA.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software GraphPad InStat (San Diego, California, USA)⁹⁹. Diferenças significativas entre os diversos grupos foram determinadas pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) para amostras dependentes, e as médias comparadas pelo teste de Correlações Múltiplas de Tukey-Kramer, com a significância sendo definida como $P < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. PRODUÇÃO DE PGE₂ POR DIFERENTES CEPAS DE *P. brasiliensis*.

Como um dos objetivos de nosso trabalho foi avaliar a capacidade de diferentes cepas de *P. brasiliensis* produzirem PGE₂, assim como a via enzimática utilizada pelo mesmo para a produção desses mediadores, culturas de fungos foram incubadas durante 4 e 8 horas na ausência ou presença de INDO (1, 2.5, 5, 10 ou 20 µg/mL) um inibidor da enzima COX. Os resultados obtidos para as cepas Pb18, Pb265, BT79 e Pb192 são mostrados nas figuras 1, 2, 3 e 4 respectivamente. Na Figura 1, observamos que a cepa Pb18 do fungo tem capacidade de produzir concentrações elevadas de PGE₂ durante as primeiras 4 horas de cultura que, no entanto diminuem significativamente no período de 8 horas de cultivo. Após a incubação com INDO observamos uma diminuição dose dependente na produção de PGE₂, tanto para as culturas de 4 como 8 horas com resultados estatisticamente significativos nas doses de 2.5, 5, 10 e 20 µg/mL. A análise das figuras 2, 3 e 4 mostram que as demais cepas apresentaram um perfil de resposta muito semelhante ao descrito para a cepa Pb18, com diferenças, no entanto, relacionadas às concentrações de INDO com as quais os resultados mostraram-se estatisticamente diferentes em relação às culturas não tratadas. No caso da cepa Pb265, as diferenças foram entre as doses de INDO de 5, 10 e 20µg/mL, para as culturas de 4 horas e 2.5, 5, 10 e 20 para as de 8 horas. Para a cepa BT79, essas diferenças foram detectadas entre as culturas de 4 e as doses de 1 a 20µg/mL e as de 8 horas e as doses de 2.5 a 20µg/mL. Nos experimentos com a cepa Pb192, as diferenças foram entre as culturas de 4 horas e as doses de 5, 10 e 20µg/mL e as de 8 horas e as doses de 10 e 20µg/mL. A análise global dos resultados obtidos revela ainda, que além de um perfil de resposta semelhante, as concentrações de PGE₂, produzidas pelas diferentes cepas, foram bastante semelhantes.

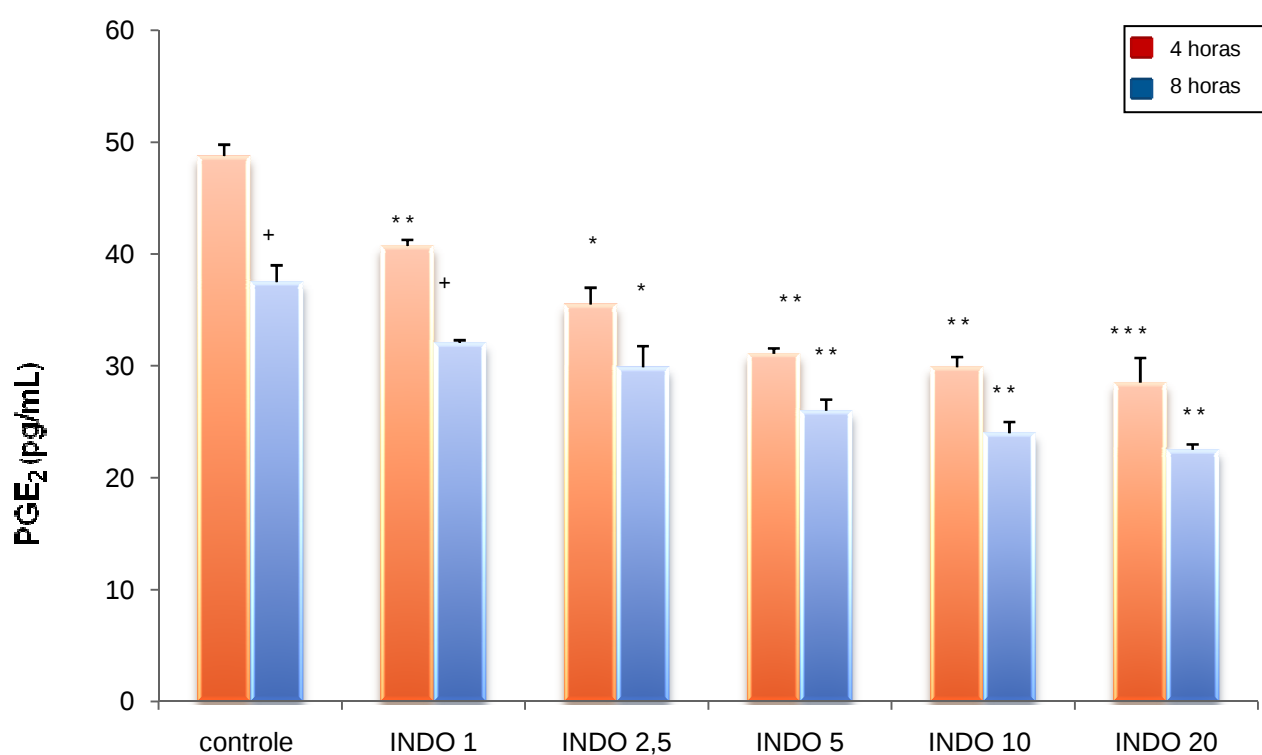


Fig. 1: Produção de PGE_2 pela cepa Pb18 do *P. brasiliensis* cultivada por 4 ou 8 horas somente em meio de cultura (controle) ou meio de cultura acrescido de INDO nas concentrações de 1, 2.5, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão.

* $p < 0,05$ x controle 4h

** $p < 0,01$ x controle

*** $p < 0,001$ x controle

+ $p < 0,05$ x 4 horas

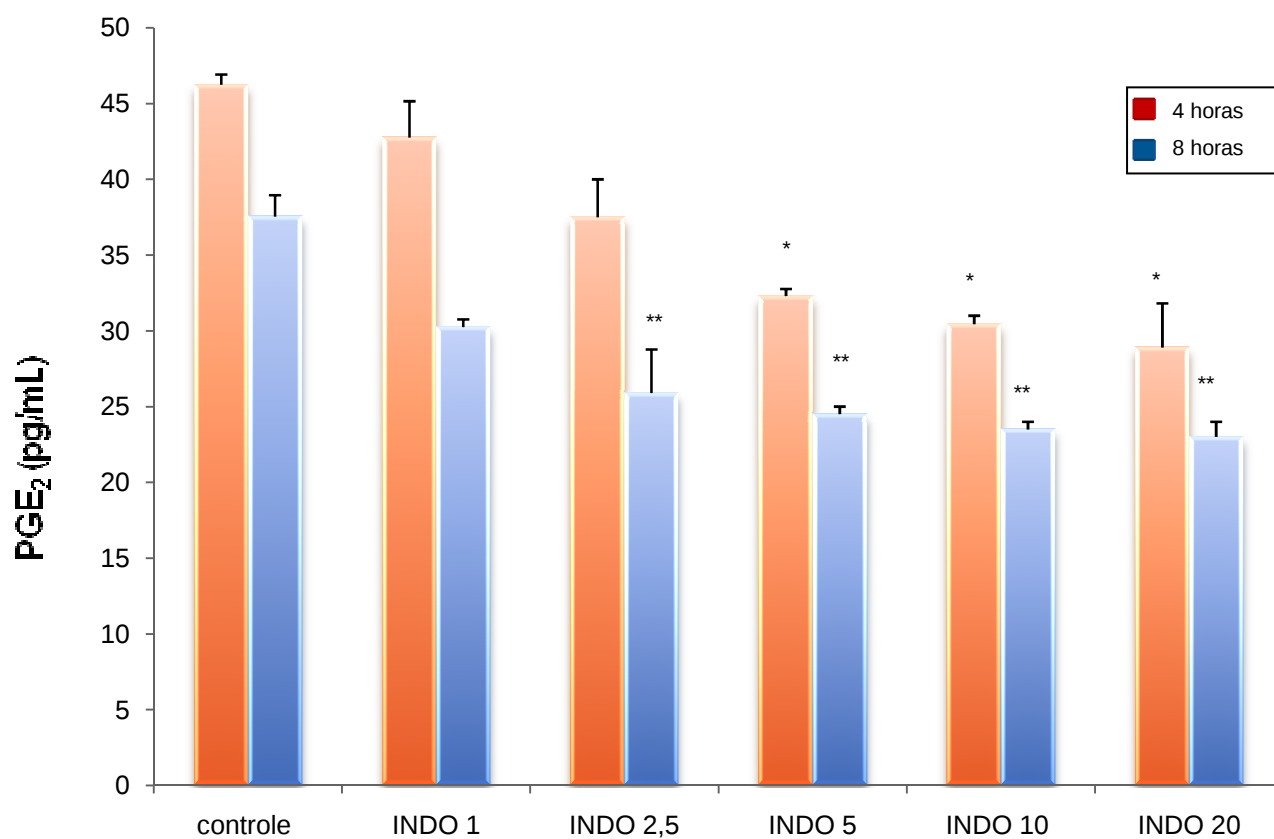


Fig. 2: Produção de PGE_2 pela cepa Pb265 do *P. brasiliensis* cultivada por 4 ou 8 horas somente em meio de cultura (controle) ou meio de cultura acrescido de INDO nas concentrações de 1, 2.5, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão.

* $p < 0.05$ x controle

** $p < 0,01$ x controle

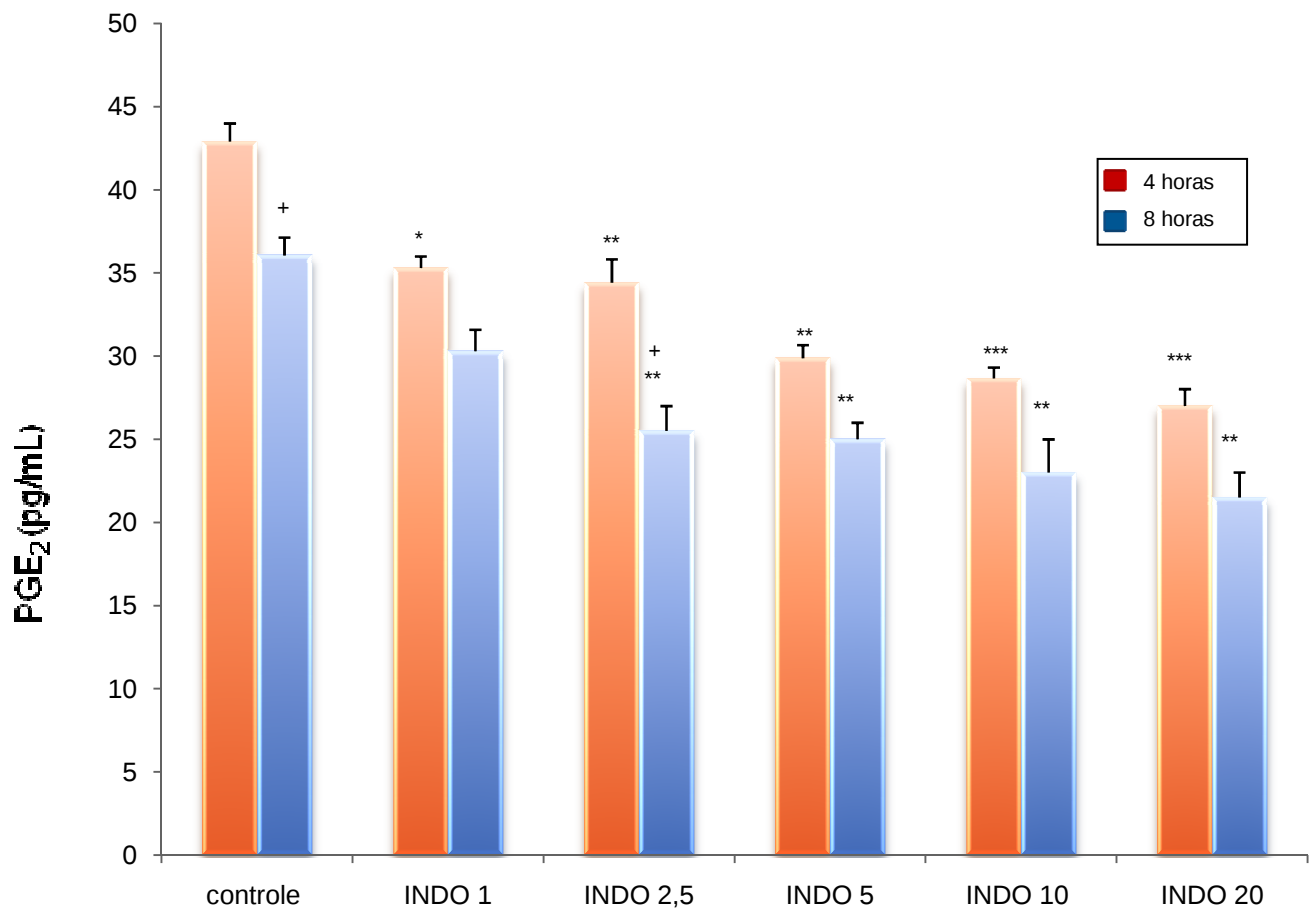


Fig. 3: Produção de PGE_2 pela cepa BT79 do *P. brasiliensis* cultivada por 4 ou 8 horas somente em meio de cultura (controle) ou meio de cultura acrescido de INDO nas concentrações de 1, 2.5, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão.

* $p < 0.05$ x controle
** $p < 0.01$ x controle
*** $p < 0.001$ x controle
+ $p < 0.05$ x 4 horas

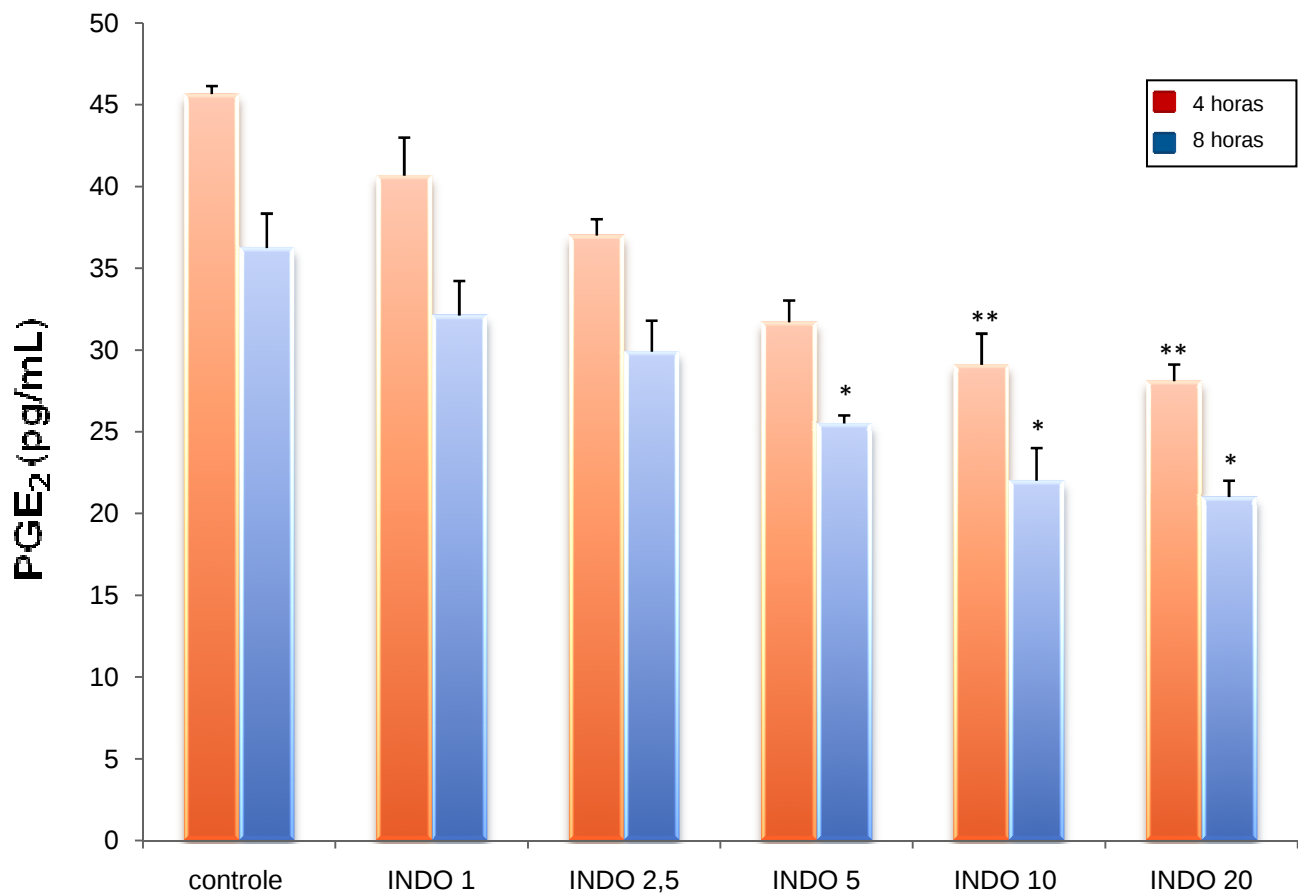


Fig. 4: Produção de PGE₂ pela cepa Pb192 do *P. brasiliensis* cultivada por 4 ou 8 horas somente em meio de cultura (controle) ou meio de cultura acrescido de INDO nas concentrações de 1, 2.5, 5, 10 e 20 µg/mL. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão.

*p<0.05xcontrole

**p<0.01xcontrole

6.2. PRODUÇÃO DE PGE₂ POR DIFERENTES CEPAS DE *P. brasiliensis* UTILIZANDO FONTE EXÓGENA DE ÁCIDO ARAQUIDÔNICO.

Uma vez comprovado que as diferentes cepas do *P. brasiliensis* são capazes de produzir PGE₂, tivemos como objetivo avaliar se o fungo é capaz de utilizar fontes exógenas de ácido araquidônico para a produção desses mediadores.

Para essa análise, as diferentes cepas do fungo foram cultivadas durante 4 e 8 horas em meio RPMI suplementado com diferentes concentrações de ácido araquidônico (0.5, 1 ou 2 mM/ml) sendo posteriormente avaliadas quanto à produção de PGE₂. Os resultados são mostrados nas figuras 5, 6, 7 e 8.

Os resultados obtidos para a cepa Pb18 (Figura 5) mostram claramente que nos meios de cultura suplementados com ácido araquidônico, independente da dose utilizada, os níveis de PGs foram significativamente maiores do que os detectados para as culturas cultivadas em meio sem suplementação. O mesmo perfil de resposta foi obtido para as demais cepas do fungo (Figuras 6, 7 e 8 para as cepas Pb265, BT79 e Pb192 respectivamente) não sendo detectadas diferenças importantes entre elas.

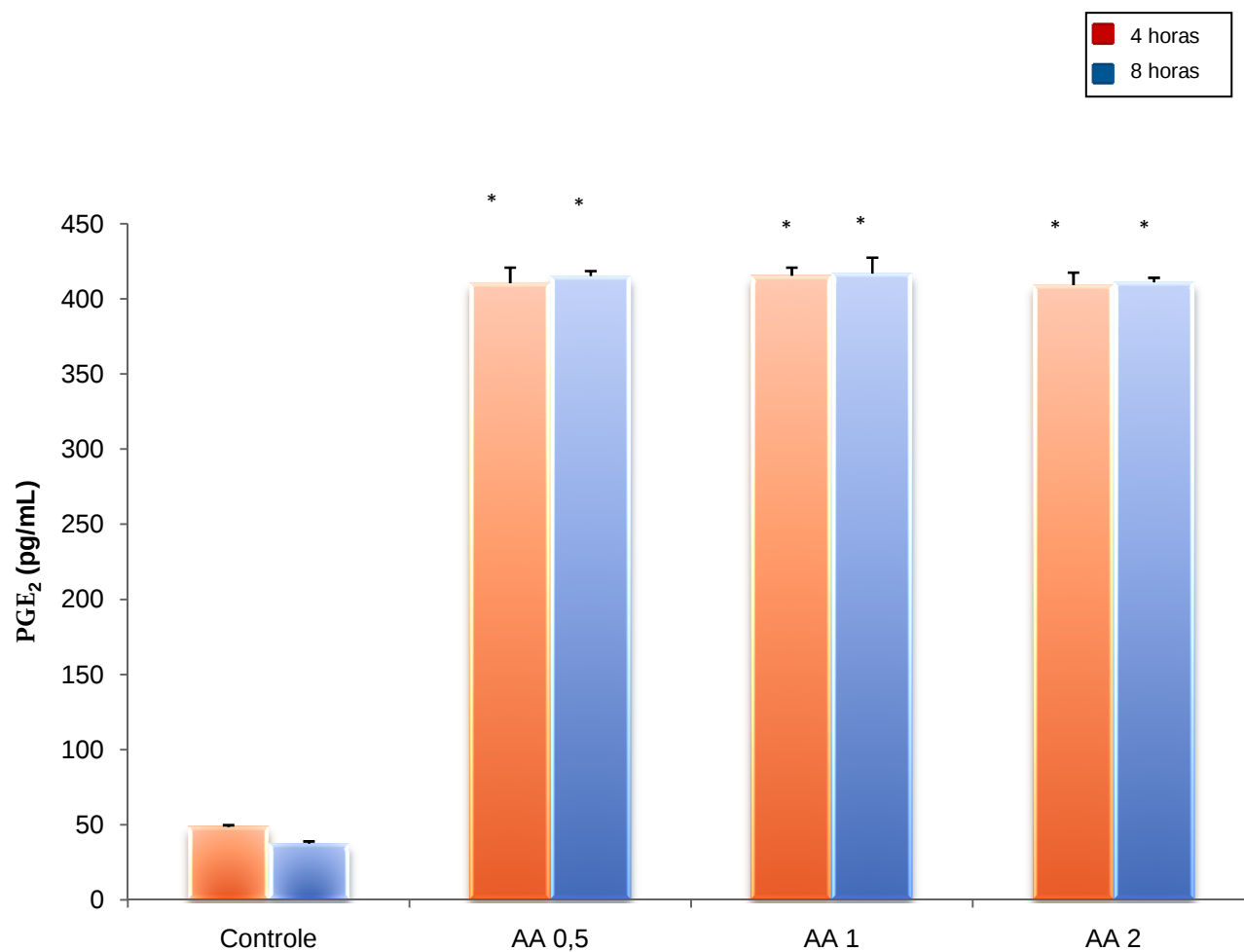


Fig. 5: Produção de PGE₂ pela cepa Pb18 do *P. brasiliensis* cultivada por 4 ou 8 horas somente em meio de cultura (controle) ou meio de cultura acrescido de AA nas concentrações de 0,5, 1 e 2 mM/mL. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão.

* $p < 0.001$ x controle

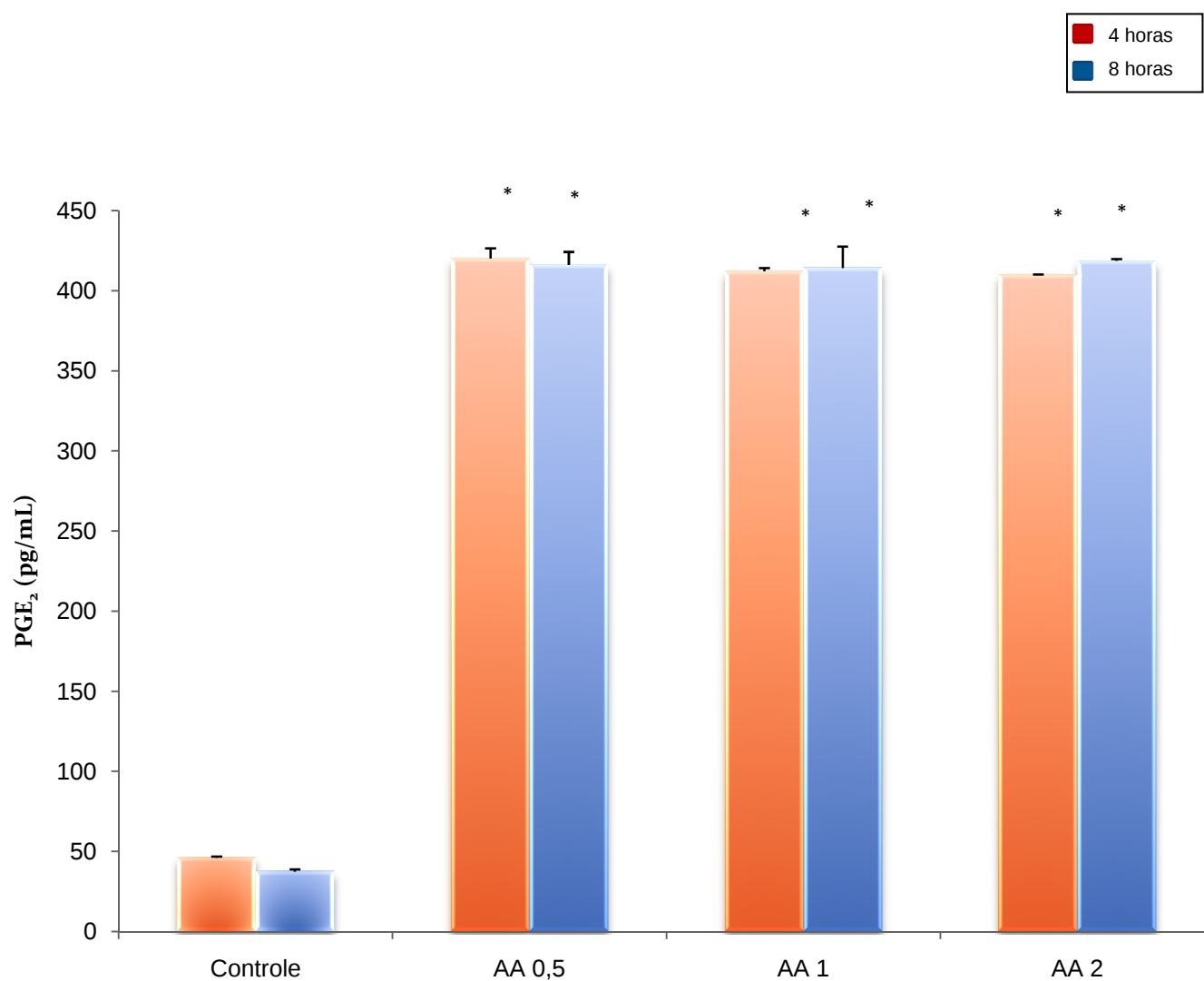


Fig. 6: Produção de PGE₂ pela cepa Pb265 do *P. brasiliensis* cultivada por 4 ou 8 horas somente em meio de cultura (controle) ou meio de cultura acrescido de AA nas concentrações de 0.5, 1 e 2 mM/mL. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão.

* $p < 0.001$ x controle

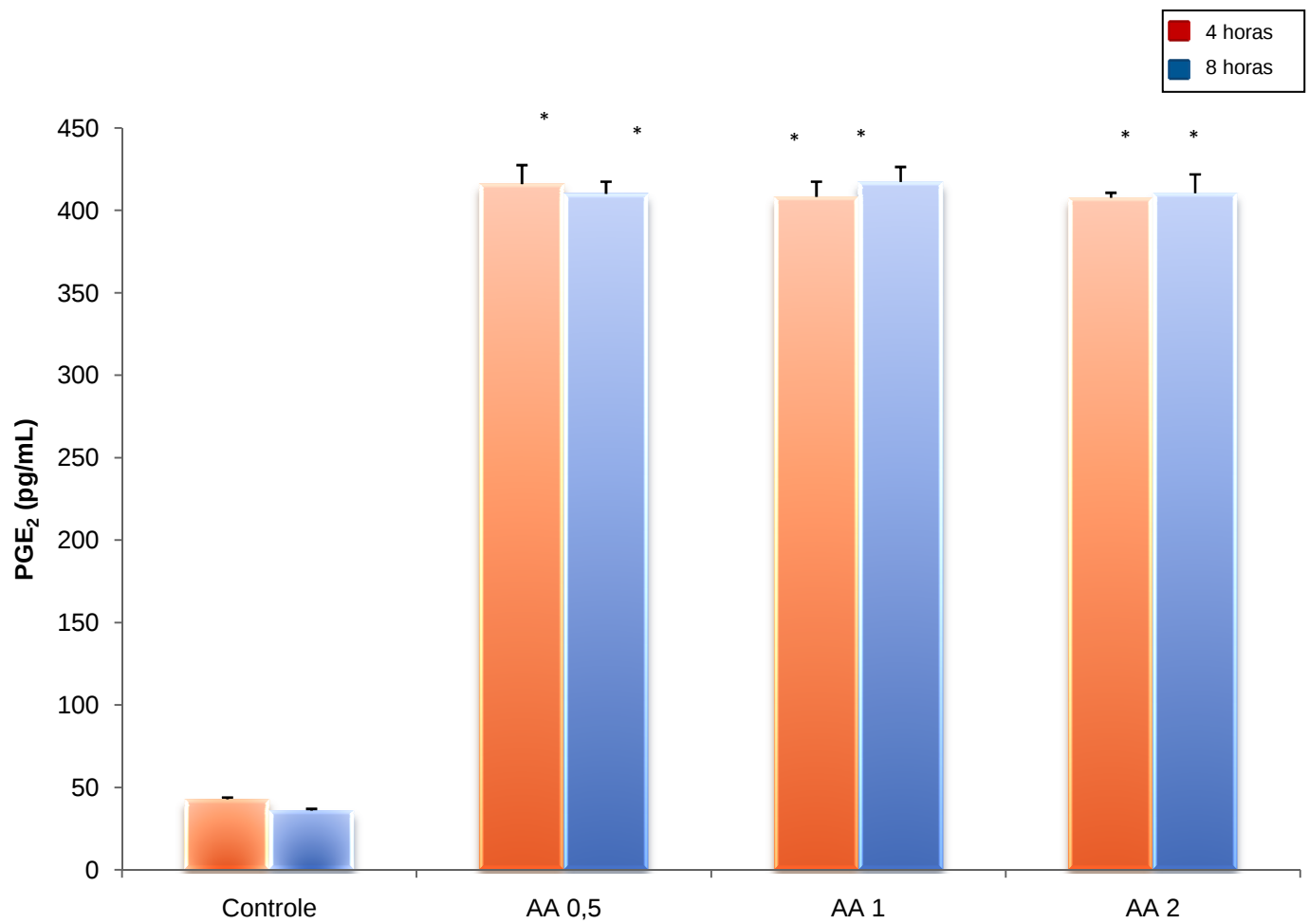


Fig. 7: Produção de PGE₂ pela cepa BT79 do *P. brasiliensis* cultivada por 4 ou 8 horas somente em meio de cultura (controle) ou meio de cultura acrescido de AA nas concentrações de 0.5, 1 e 2 mM/mL. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão.

* $p < 0.001$ x controle

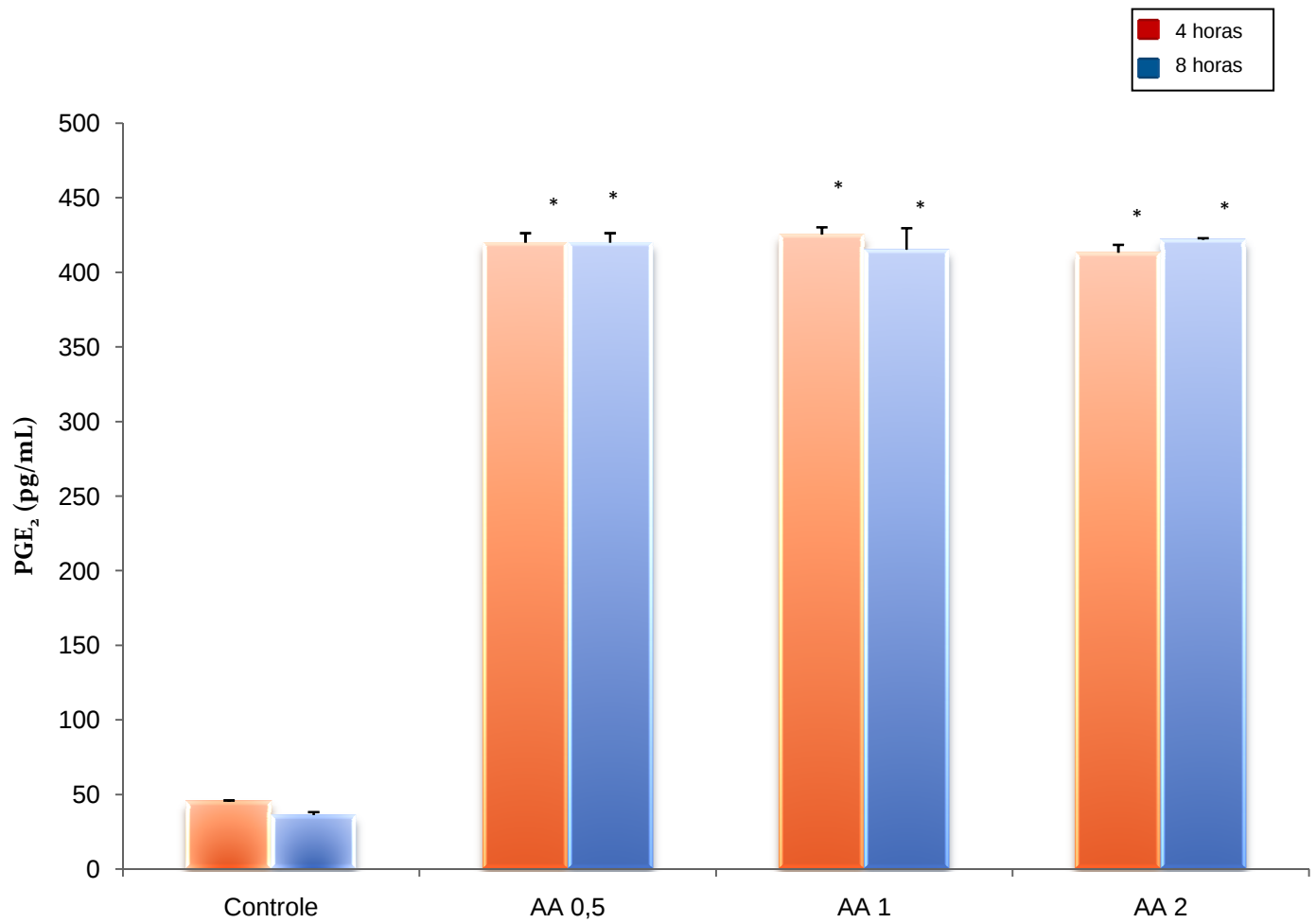


Fig. 8: Produção de PGE₂ pela cepa Pb192 do *P. brasiliensis* cultivada por 4 ou 8 horas somente em meio de cultura (controle) ou meio de cultura acrescido de AA nas concentrações de 0,5, 1 e 2 mM/mL. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão.

* p < 0.001x controle

6.3. ASSOCIAÇÃO ENTRE PRODUÇÃO DE PGE₂ E VIABILIDADE DO *P. brasiliensis*.

Para essa análise, os fungos foram cultivados por 4 e 8 horas na ausência ou presença de INDO sendo posteriormente avaliados quanto a sua viabilidade. Os resultados são mostrados nas figuras 9, 10, 11 e 12.

Os resultados obtidos com a cepa Pb18 (Figura 9) mostram que após 8 horas de cultura, ocorre uma diminuição na viabilidade fúngica detectada por um menor número de unidades formadoras de colônias recuperadas. No entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Detectou-se também uma diminuição no número de unidades após a incubação com diferentes concentrações de INDO, tanto para as culturas de 4, como de 8 horas. No entanto, os resultados foram estatisticamente significativos com as doses de 10 e 20 µg/mL para as culturas de 4 horas e de 2.5, 5, 10 e 20 para as de 8 horas.

Os resultados referentes às demais cepas mostram um perfil de resposta semelhante ao detectado para a cepa Pb18, com diferenças, no entanto relacionadas às concentrações de INDO nas quais os resultados mostraram-se estatisticamente diferentes em relação às culturas não tratadas. No caso da cepa Pb265 e BT79, essas diferenças foram detectadas entre as culturas de 4 ou 8 horas e os seus respectivos tratamentos com as doses de INDO 10 e 20 µg/mL. Para a cepa Pb192, as diferenças foram significativas para todas as doses de INDO, tanto nas culturas de 4 como 8 horas.

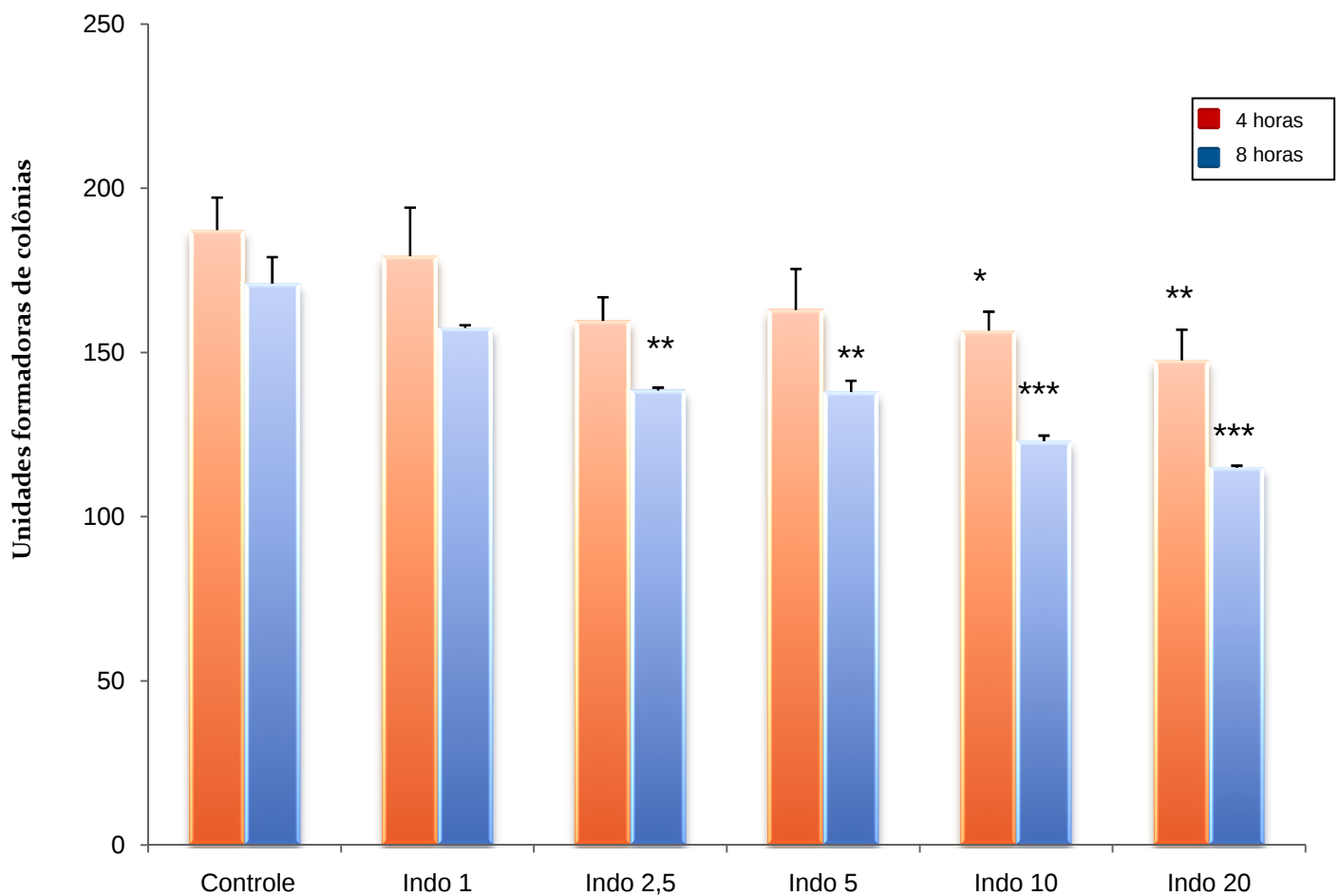


Fig. 9: Recuperação de unidades formadoras de colônias (UFC) da cepa Pb18 do *P. brasiliensis* cultivada por 4 ou 8 horas somente com meio de cultura (controle) ou meio de cultura acrescido de INDO nas concentrações 1, 2.5, 5, 10 e 20 µg/mL. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão.

* $p < 0.05$ x controle

** $p < 0.01$ x controle

*** $p < 0.001$ x controle

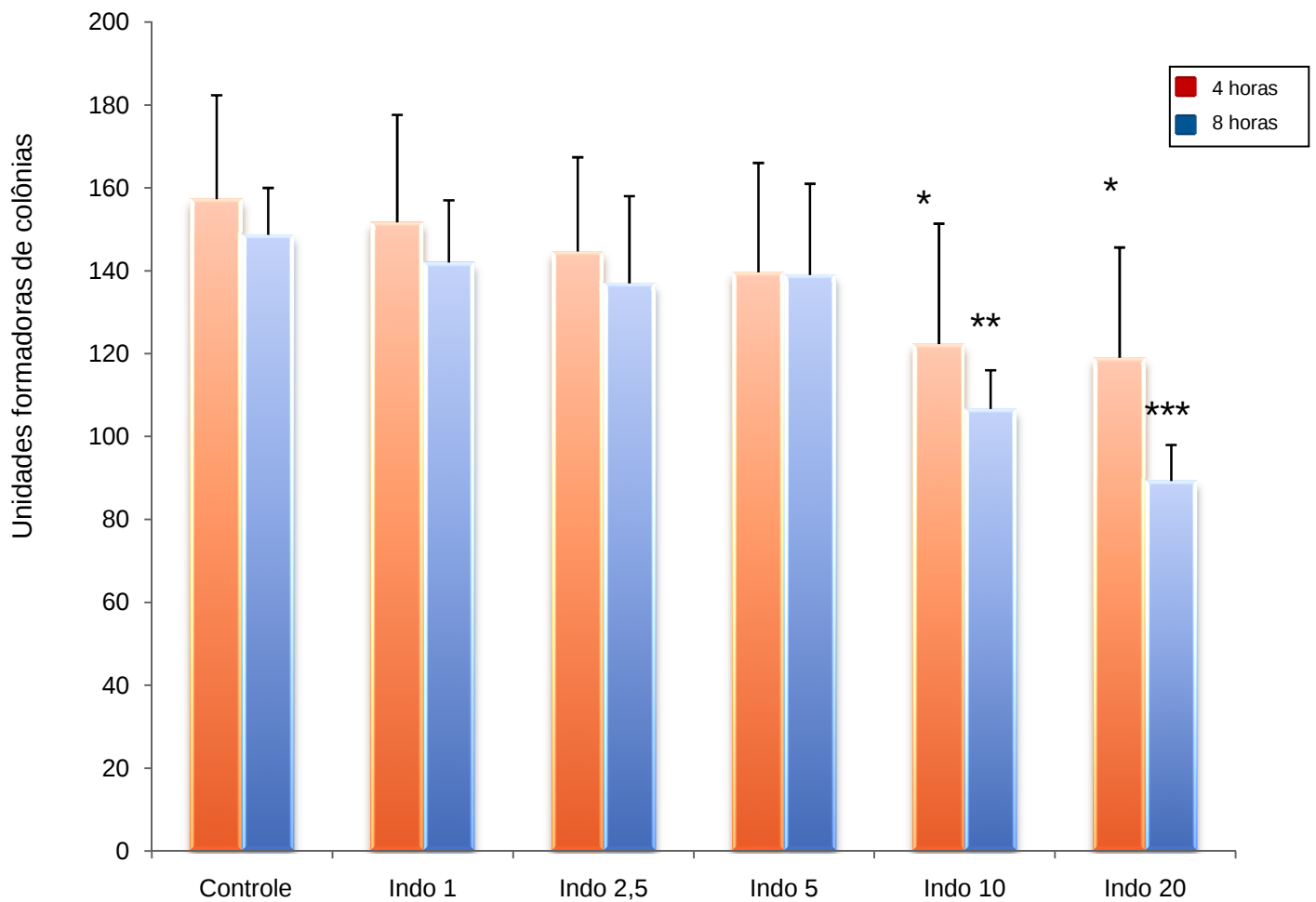


Fig. 10: Recuperação de unidades formadoras de colônias (UFC) da cepa Pb265 do *P. brasiliensis* cultivada por 4 ou 8 horas somente com meio de cultura (controle) ou meio de cultura acrescido de INDO nas concentrações 1, 2.5, 5, 10 e 20 µg/mL. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão.

* $p < 0.05$ x controle

** $p < 0.01$ x controle

*** $p < 0.001$ x controle

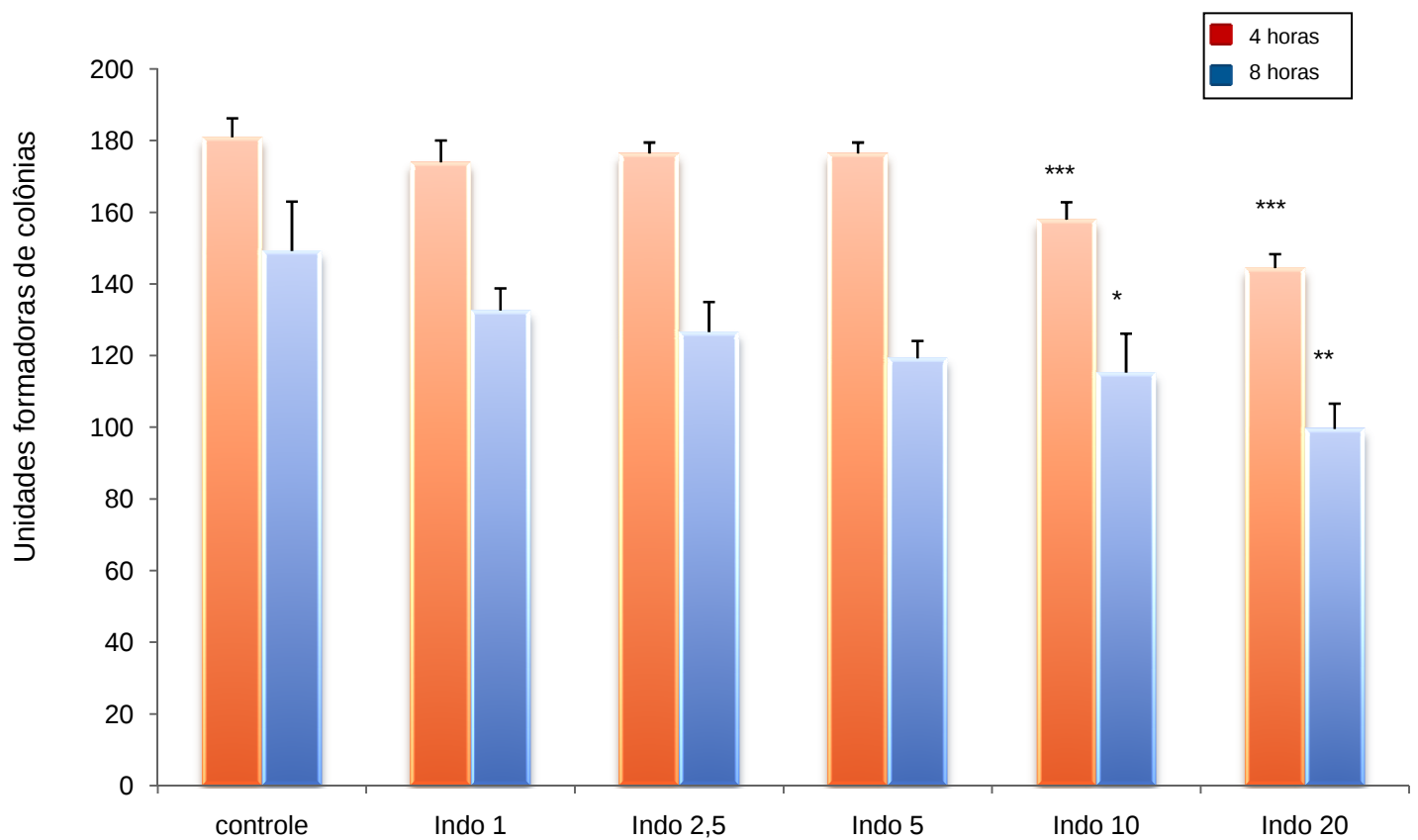


Fig. 11: Recuperação de unidades formadoras de colônias (UFC) da cepa BT79 do *P. brasiliensis* cultivada por 4 ou 8 horas somente com meio de cultura (controle) ou meio de cultura acrescido de INDO nas concentrações 1, 2,5, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão.

* $p < 0.05$ x controle

** $p < 0.05$ x controle

*** $p < 0.05$ x 4 horas

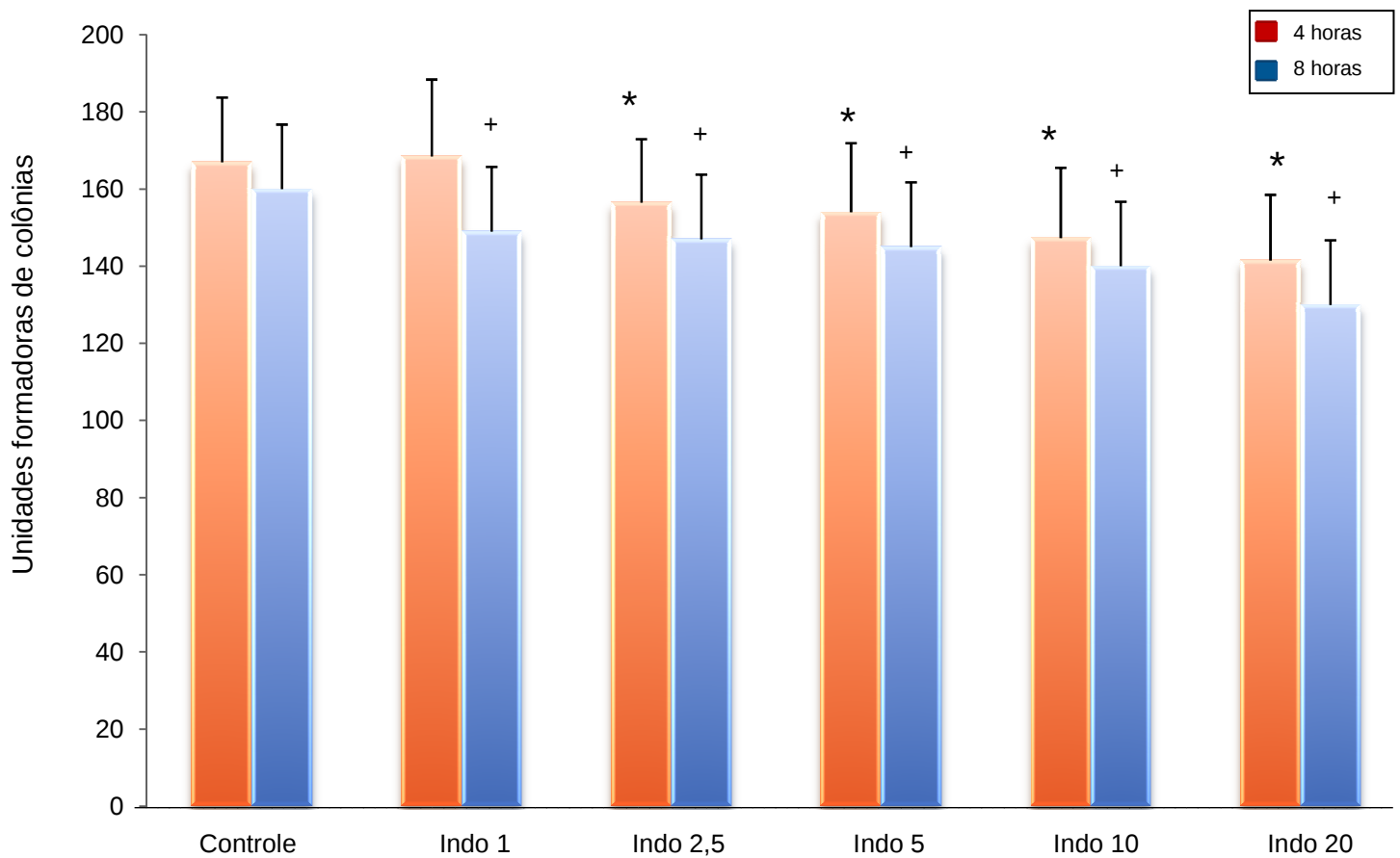


Fig. 12: Recuperação de unidades formadoras de colônias (UFC) da cepa Pb192 do *P. brasiliensis* cultivada por 4 ou 8 horas somente com meio de cultura (controle) ou meio de cultura acrescido de INDO nas concentrações 1, 2.5, 5, 10 e 20 µg/mL. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão.

+ $p < 0,001$ x controle

* $p < 0.001$ x controle

6.4. PRODUÇÃO DE LTB₄ POR DIFERENTES CEPAS DE *P. brasiliensis*.

Além da produção de PGs, objetivamos avaliar a capacidade de diferentes cepas do *P. brasiliensis* produzirem LTB₄, assim como a via enzimática utilizada pelo mesmo para a produção desse mediador. Para isso, culturas de fungos foram incubadas durante 4 e 8 horas na ausência ou presença de MK886 um inibidor da enzima lipoxigenase (LO). Os resultados obtidos para as cepas Pb18, Pb265, BT79 e Pb192 são mostrados nas figuras 13, 14, 15 e 16, respectivamente.

Na figura 13 observamos que a cepa Pb18 do fungo tem capacidade de produzir altos níveis de LTB₄ durante as primeiras 4 horas de cultura que, no entanto diminuem significativamente após 8 horas. Após a incubação com MK 886 nas duas concentrações, observamos uma diminuição significativa na produção do mediador, tanto para as culturas de 4 como de 8 horas. A análise das figuras 14, 15 e 16 mostra que as cepas Pb265, BT79 e Pb192 apresentaram um perfil de resposta muito semelhante ao descrito para a cepa Pb18. Além disso, não foram detectadas diferenças significativas entre as concentrações de LTs detectadas pelas 4 cepas, tanto no período de 4 como 8 horas.

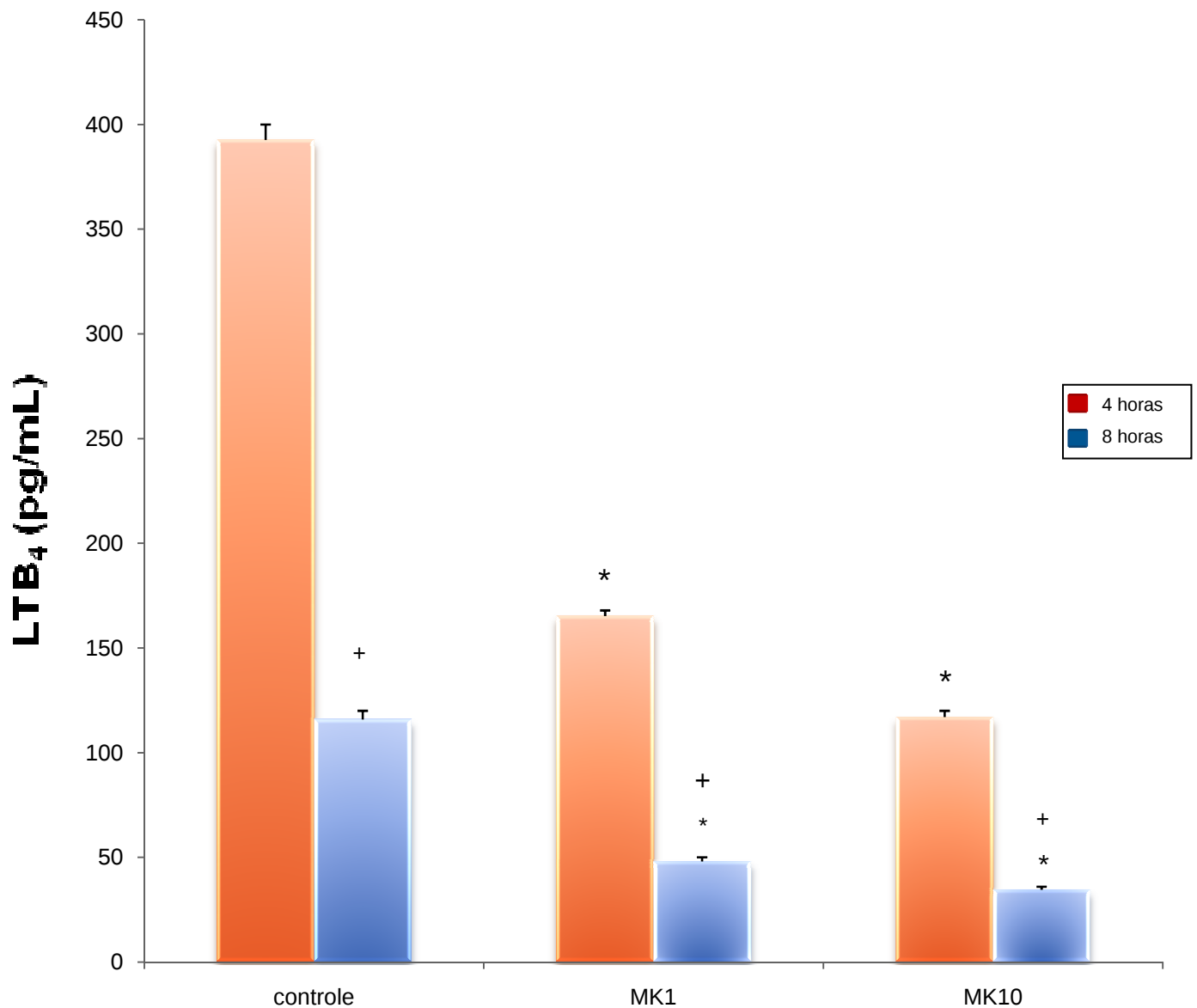


Fig. 13: Produção de LTB₄ pela cepa Pb18 do *P. brasiliensis* cultivada por 4 ou 8 horas somente em meio de cultura (controle) ou meio de cultura acrescido de MK886 nas concentrações de 1 e 10 µM/mL. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão.

*p < 0.001 X controle

+ p < 0.001 X 4 horas

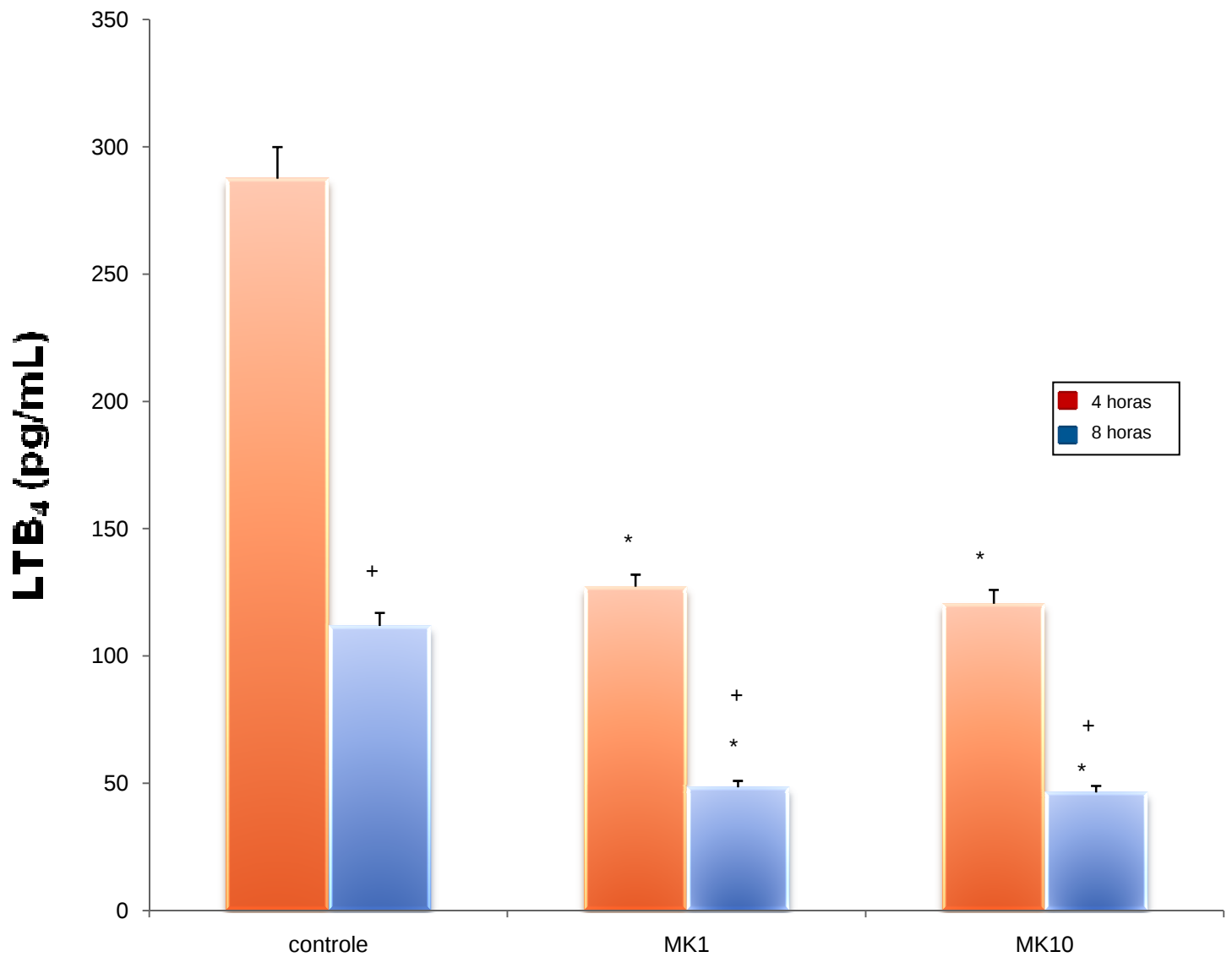


Fig. 14: Produção de LTB₄ pela cepa Pb265 do *P. brasiliensis* cultivada por 4 ou 8 horas somente em meio de cultura (controle) ou meio de cultura acrescido de MK886 nas concentrações de 1 e 10 μ M/mL. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão.

*p < 0.001 X controle

+ p < 0.001 X 4 horas

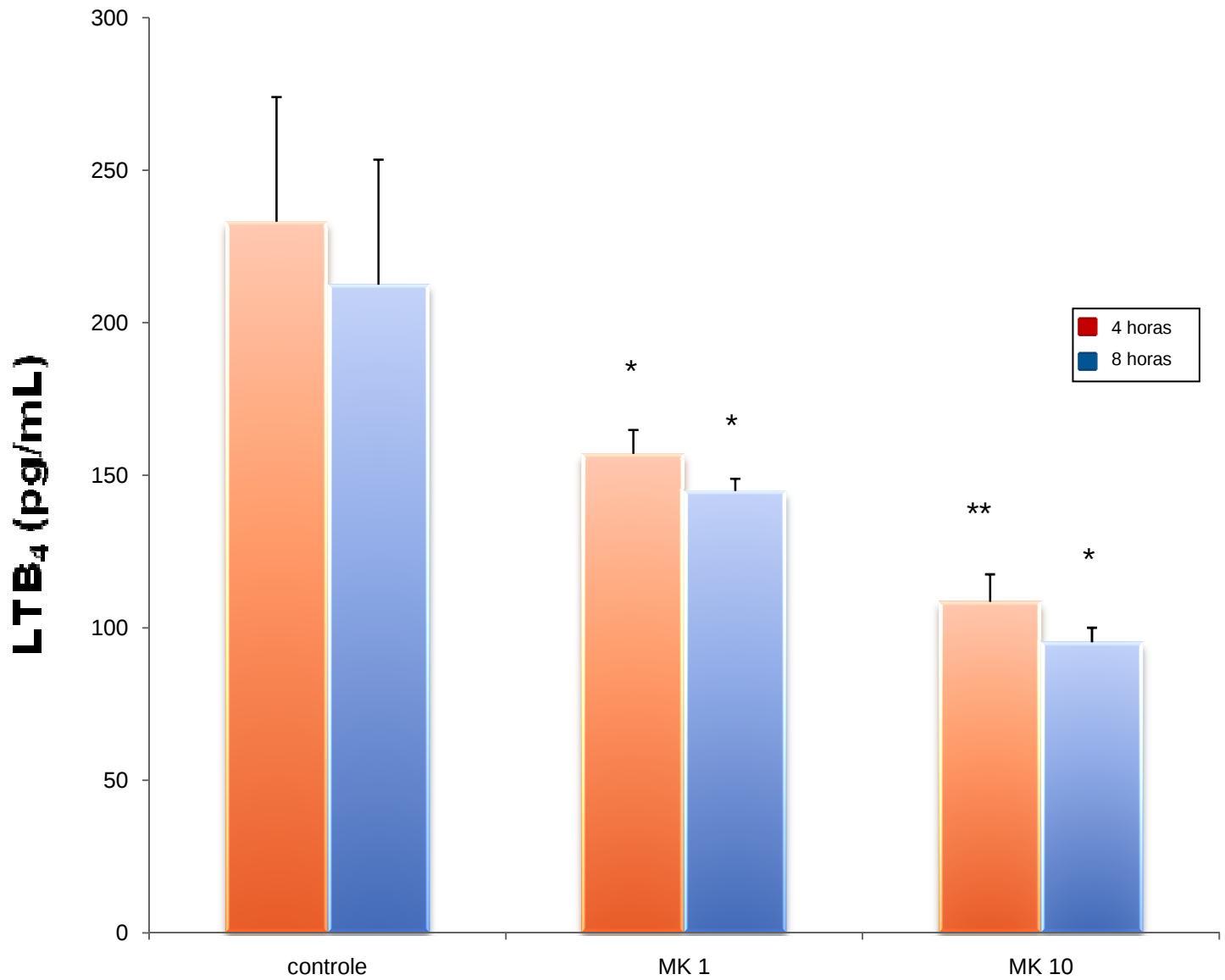


Fig. 15: Produção de LTB₄ pela cepa BT79 do *P. brasiliensis* cultivada por 4 ou 8 horas somente em meio de cultura (controle) ou meio de cultura acrescido de MK886 nas concentrações de 1 e 10 μ M/mL. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão.

*p < 0.05 X controle

**p < 0.001 X controle

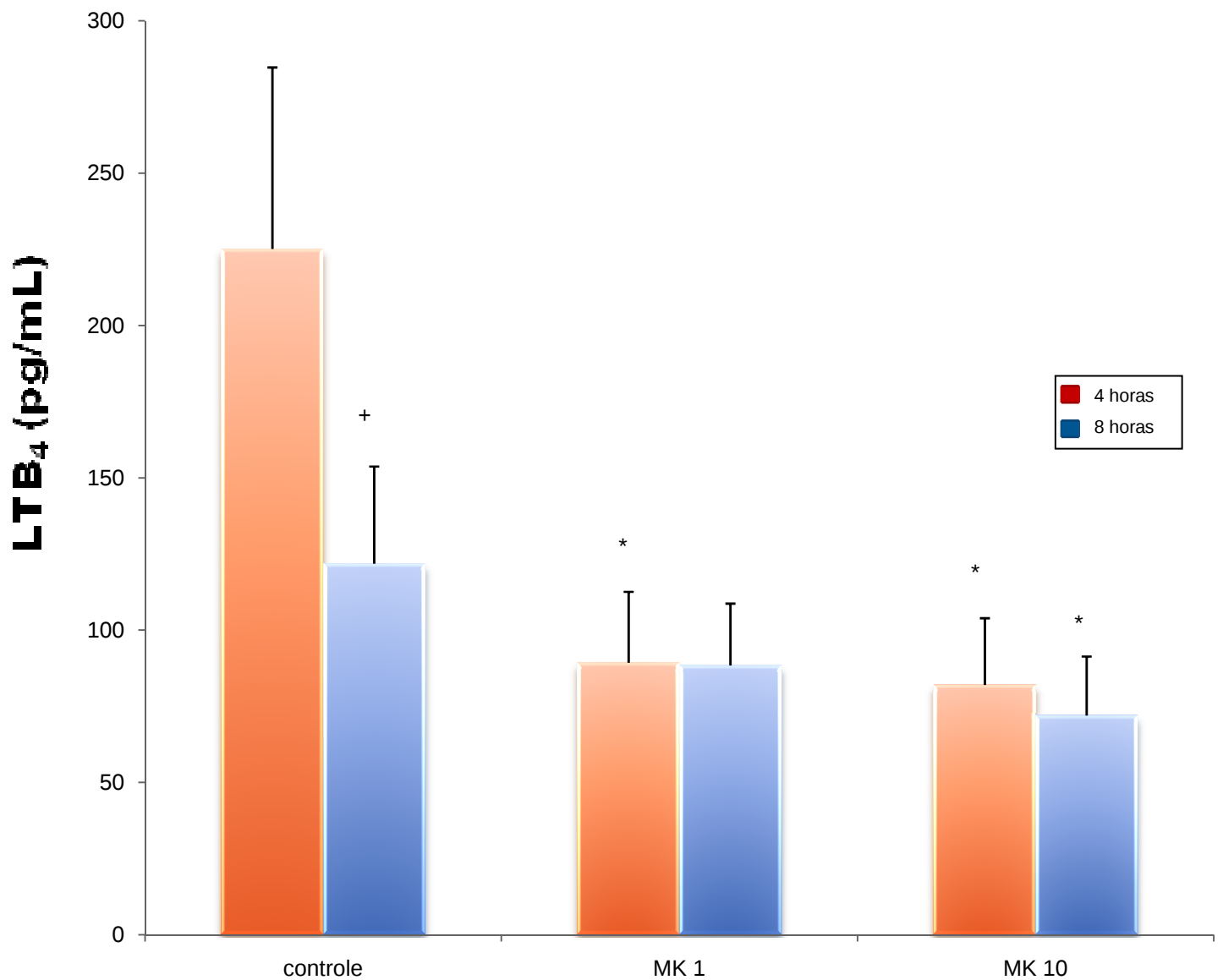


Fig. 16: Produção de LTB₄ pela cepa Pb192 do *P. brasiliensis* cultivada por 4 ou 8 horas somente em meio de cultura (controle) ou meio de cultura acrescido de MK886 nas concentrações de 1 e 10 μ M/mL. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão.

*p < 0.01 X controle

+ p < 0.01 X 4horas

6.5. PRODUÇÃO DE LTB₄ POR DIFERENTES CEPAS DE *P. brasiliensis* UTILIZANDO FONTE EXÓGENA DE AA.

De forma semelhante ao realizado nos ensaios de detecção de PGE₂, avaliamos a capacidade do fungo utilizar fonte exógena de ácido araquidônico para a produção de LTB₄. Detectamos um perfil de resposta semelhante aos ensaios de PGE₂. Os resultados obtidos para a cepa Pb18 (Figura 17) mostram claramente, que nos meios de cultura suplementados com ácido araquidônico, independente da dose utilizada, os níveis de LTB₄ foram significativamente maiores do que os detectados para as culturas cultivadas em meio sem suplementação. O mesmo perfil de resposta foi obtido para as demais cepas do fungo (Figuras 18, 19 e 20 para as cepas Pb265, BT79 e Pb192 respectivamente) não sendo detectadas diferenças importantes entre elas.

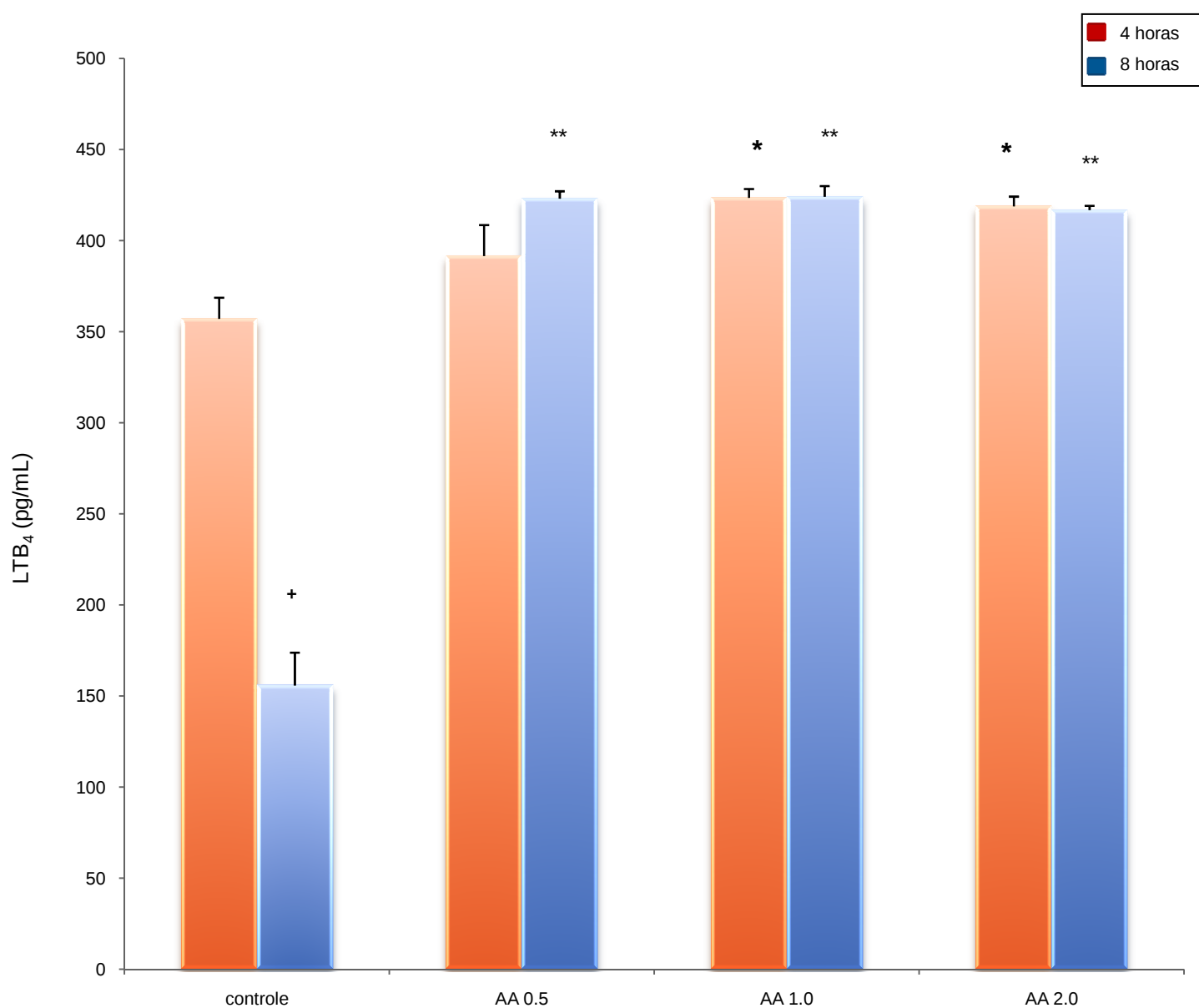


Fig. 17: Produção de LTB₄ pela cepa Pb18 do *P. brasiliensis* cultivada por 4 ou 8 horas somente em meio de cultura (controle) ou meio de cultura acrescido de AA nas concentrações de 0.5, 1.0 e 2.0 mM/mL. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão.

* $p < 0.05$ x controle

** $p < 0.001$ x controle

+ $p < 0.001$ x 4 horas

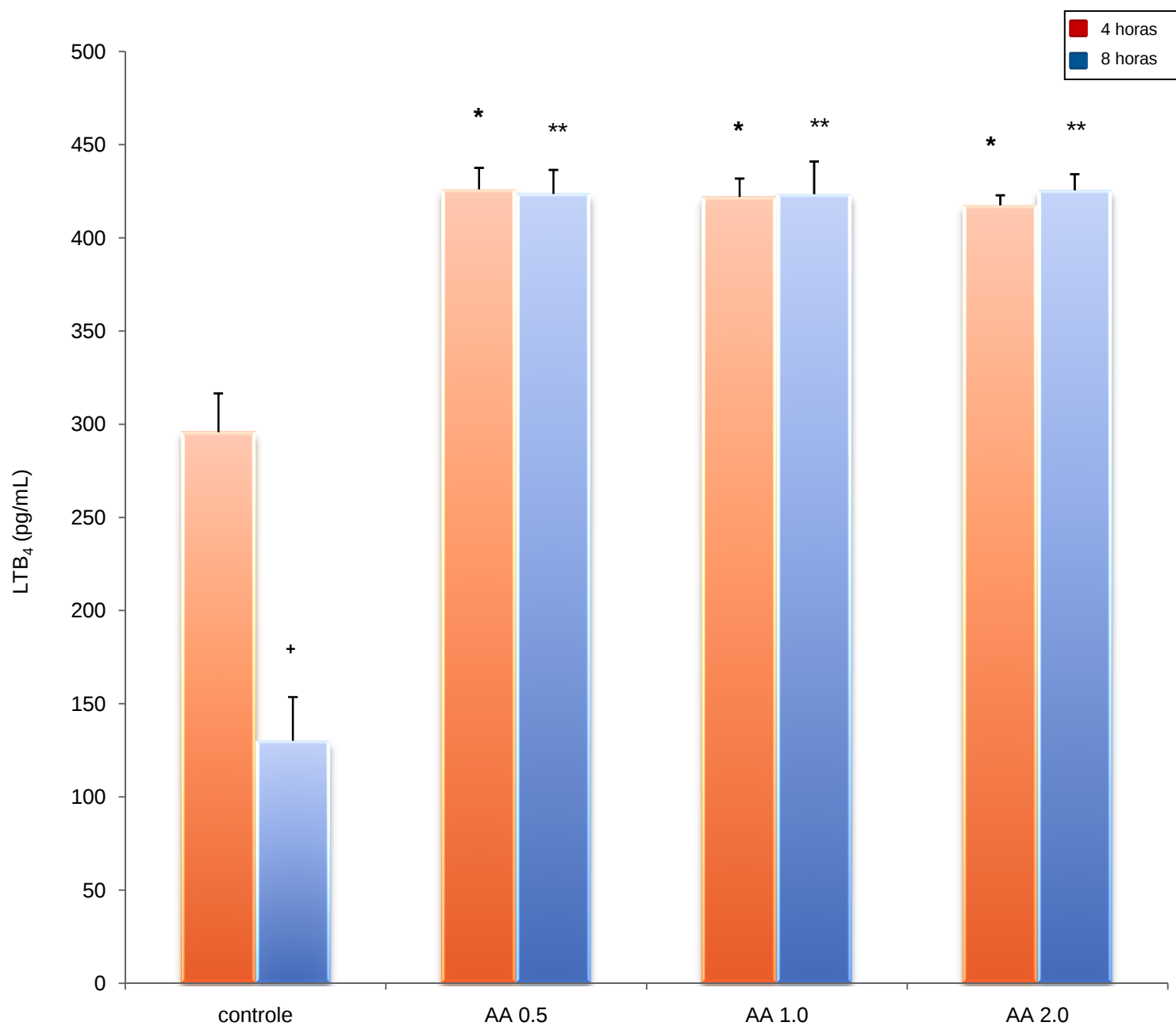


Fig. 18: Produção de LTB₄ pela cepa Pb265 do *P. brasiliensis* cultivada por 4 ou 8 horas somente em meio de cultura (controle) ou meio de cultura acrescido de AA nas concentrações de 0.5, 1.0 e 2.0 mM/mL. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão.

* $p < 0.01$ x controle

** $p < 0.001$ x controle

+ $p < 0.001$ x 4 horas

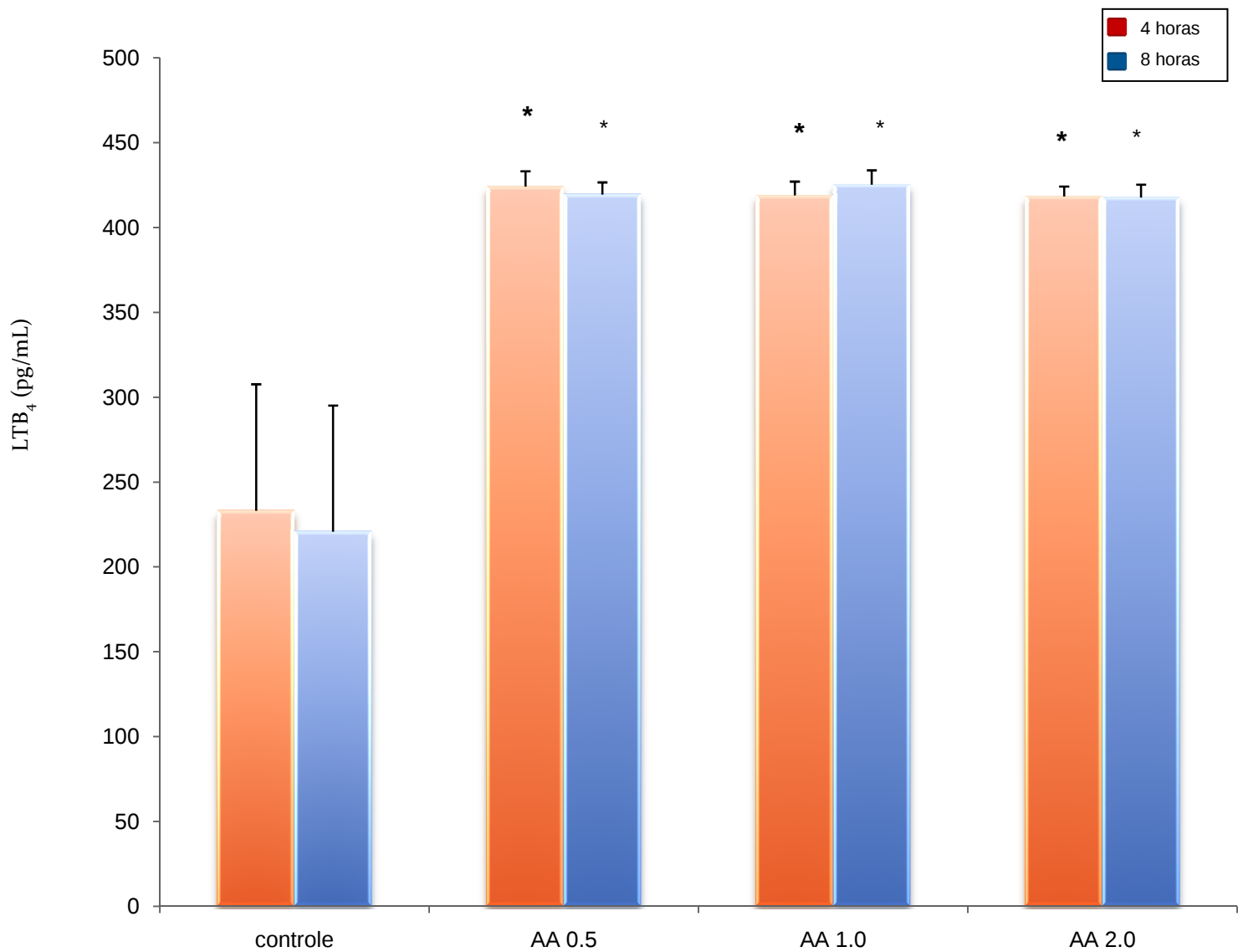


Fig. 19: Produção de LTB_4 pela cepa BT79 do *P. brasiliensis* cultivada por 4 ou 8 horas somente em meio de cultura (controle) ou meio de cultura acrescido de AA nas concentrações de 0.5, 1.0 e 2.0 mM/mL. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão.

* $p < 0.05$ x controle

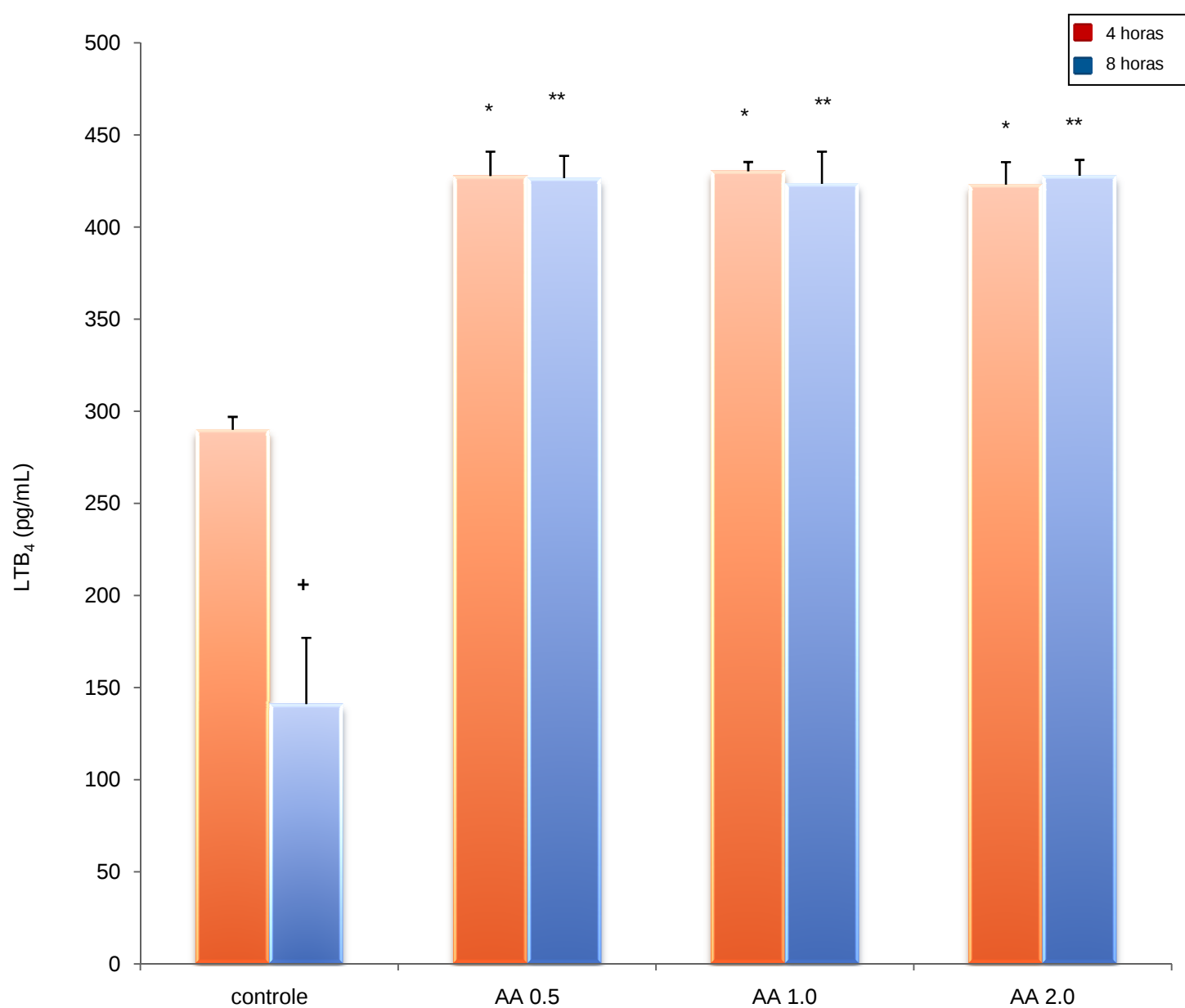


Fig. 20: Produção de LTB₄ pela cepa Pb192 do *P. brasiliensis* cultivada por 4 ou 8 horas somente em meio de cultura (controle) ou meio de cultura acrescido de AA nas concentrações de 0.5, 1.0 e 2.0 mM/mL. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão.

* $p < 0.01$ x controle

** $p < 0.001$ x controle

+ $p < 0.01$ x 4 horas

6.6. ASSOCIAÇÃO ENTRE PRODUÇÃO DE LTB4 E VIABILIDADE DO *P. brasiliensis*.

Para essa análise os fungos foram cultivados por 4 e 8 horas na ausência ou presença de diferentes concentrações de MK 886 sendo posteriormente avaliados quanto a sua viabilidade. Os resultados obtidos com a cepa Pb18 (Figura 21) mostram que após 8 horas de cultura, ocorre uma diminuição na viabilidade fúngica detectada por um menor número de unidades formadoras de colônias recuperadas. No entanto essa diferença não foi estatisticamente significativa. Detectou-se também uma diminuição no número de unidades após a incubação com as duas concentrações de MK 886 tanto para as culturas de 4 como de 8 horas.

Os resultados referentes às demais cepas (Figuras 22, 23 e 24 para as cepas Pb265, BT79 e Pb192, respectivamente) mostram um perfil de resposta semelhante ao detectado para a cepa Pb18.

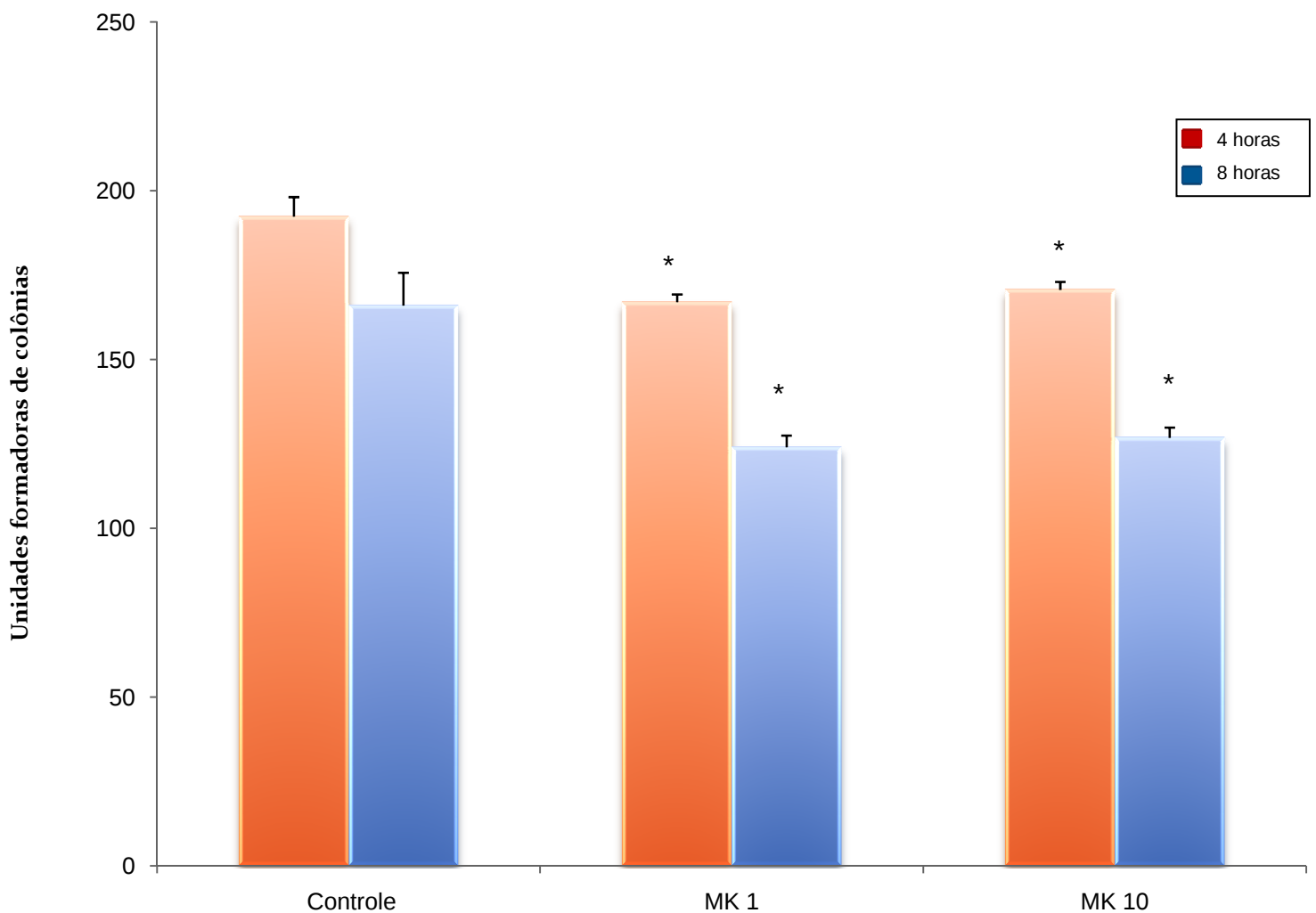


Fig. 21: Recuperação de unidades formadoras de colônia (UFC) da cepa Pb18 do *P. brasiliensis* cultivada por 4 ou 8 horas somente com meio de cultura (controle) ou meio de cultura acrescido de MK886 nas concentrações 1 e 10 µM/mL. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão.

* $p < 0.05$ x controle

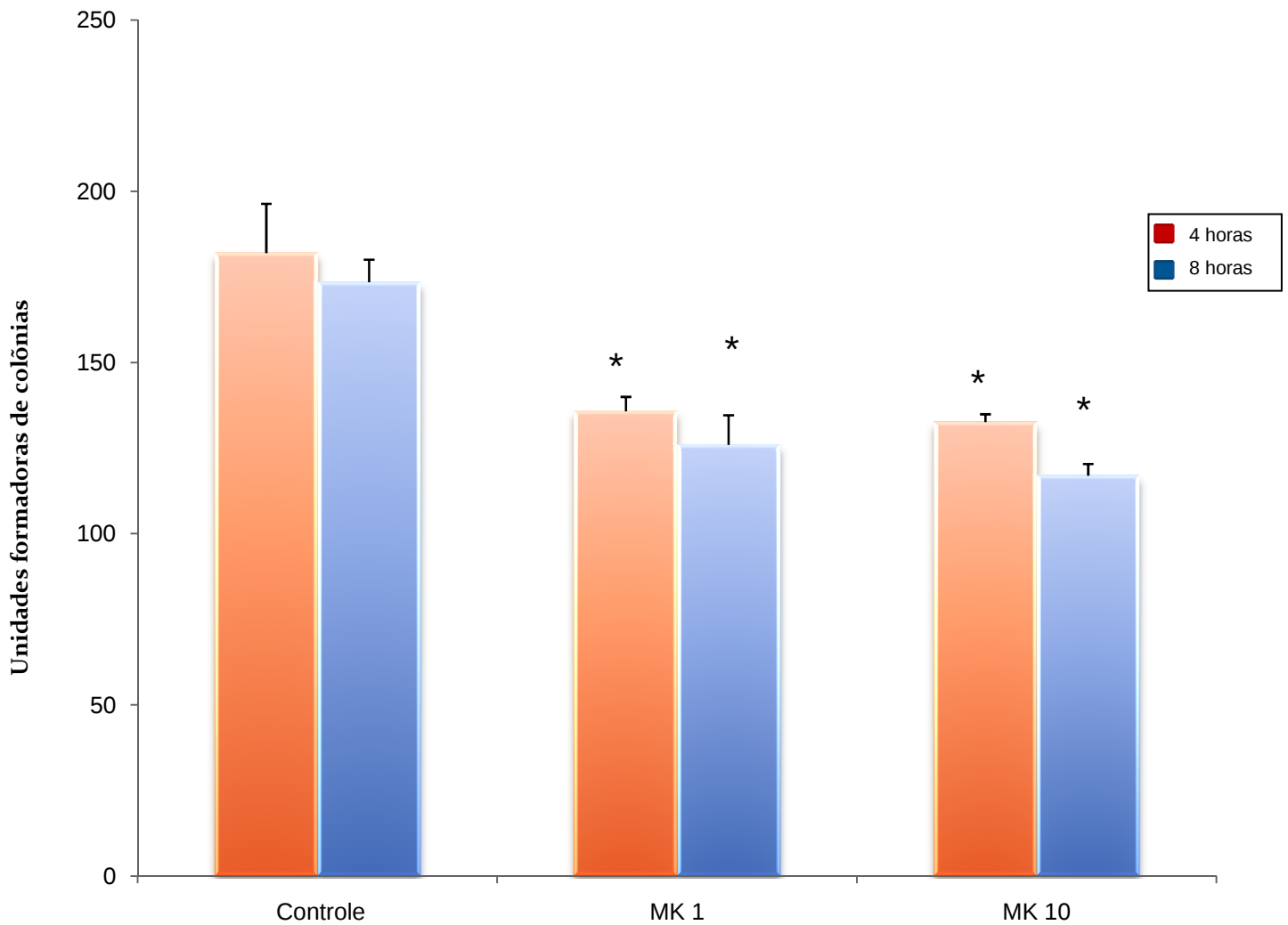


Fig. 22: Recuperação de unidades formadoras de colônia (UFC) da cepa Pb265 do *P. brasiliensis* cultivada por 4 ou 8 horas somente com meio de cultura (controle) ou meio de cultura acrescido de MK886 nas concentrações 1 e 10 $\mu\text{M/mL}$. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão.

* $p < 0.05$ x controle

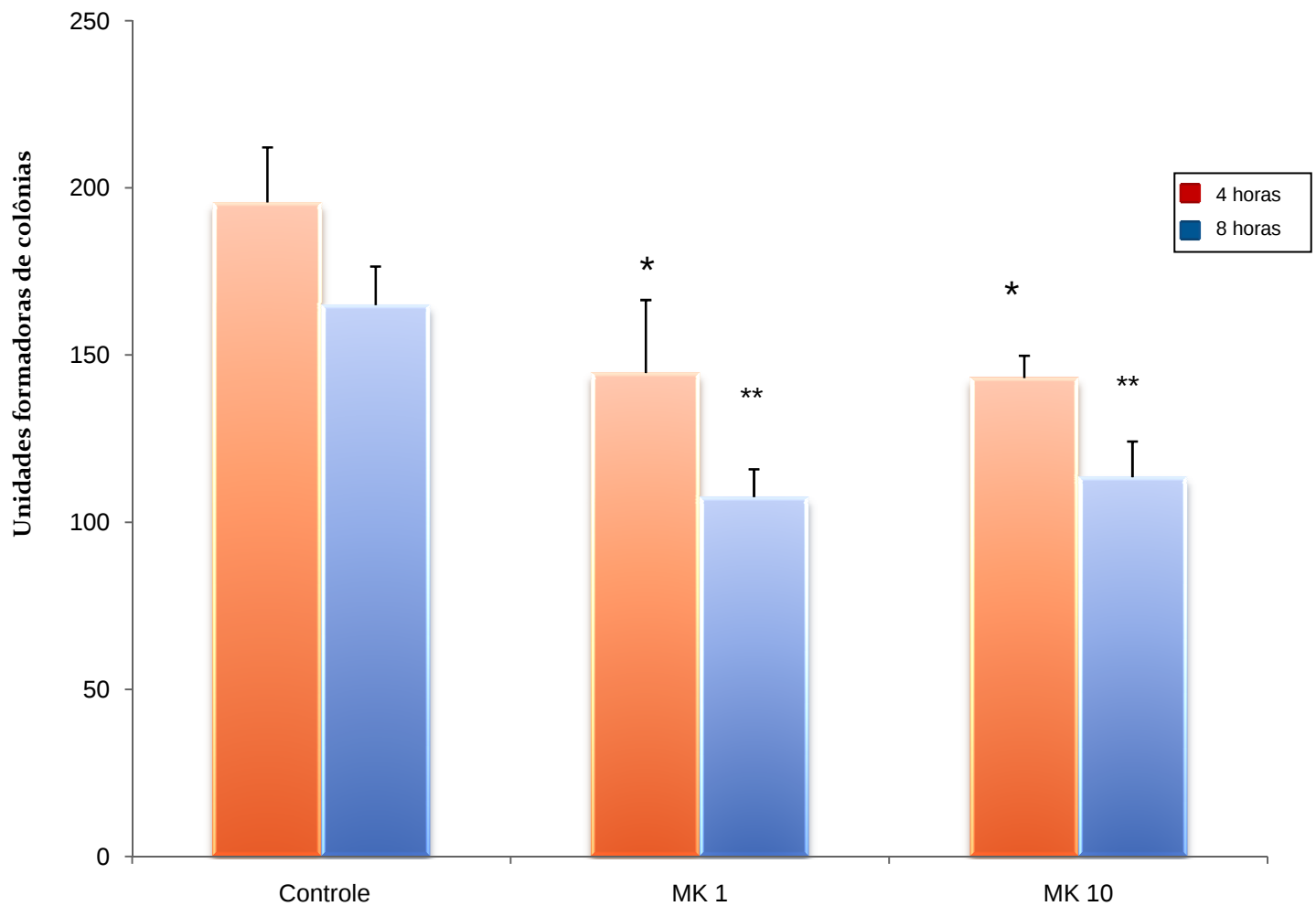


Fig. 23: Recuperação de unidades formadoras de colônia (UFC) da cepa BT79 do *P. brasiliensis* cultivada por 4 ou 8 horas somente com meio de cultura (controle) ou meio de cultura acrescido de MK886 nas concentrações 1 e 10 $\mu\text{M/mL}$. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão.

* $p < 0.05$ x controle

** $p < 0.001$ x controle

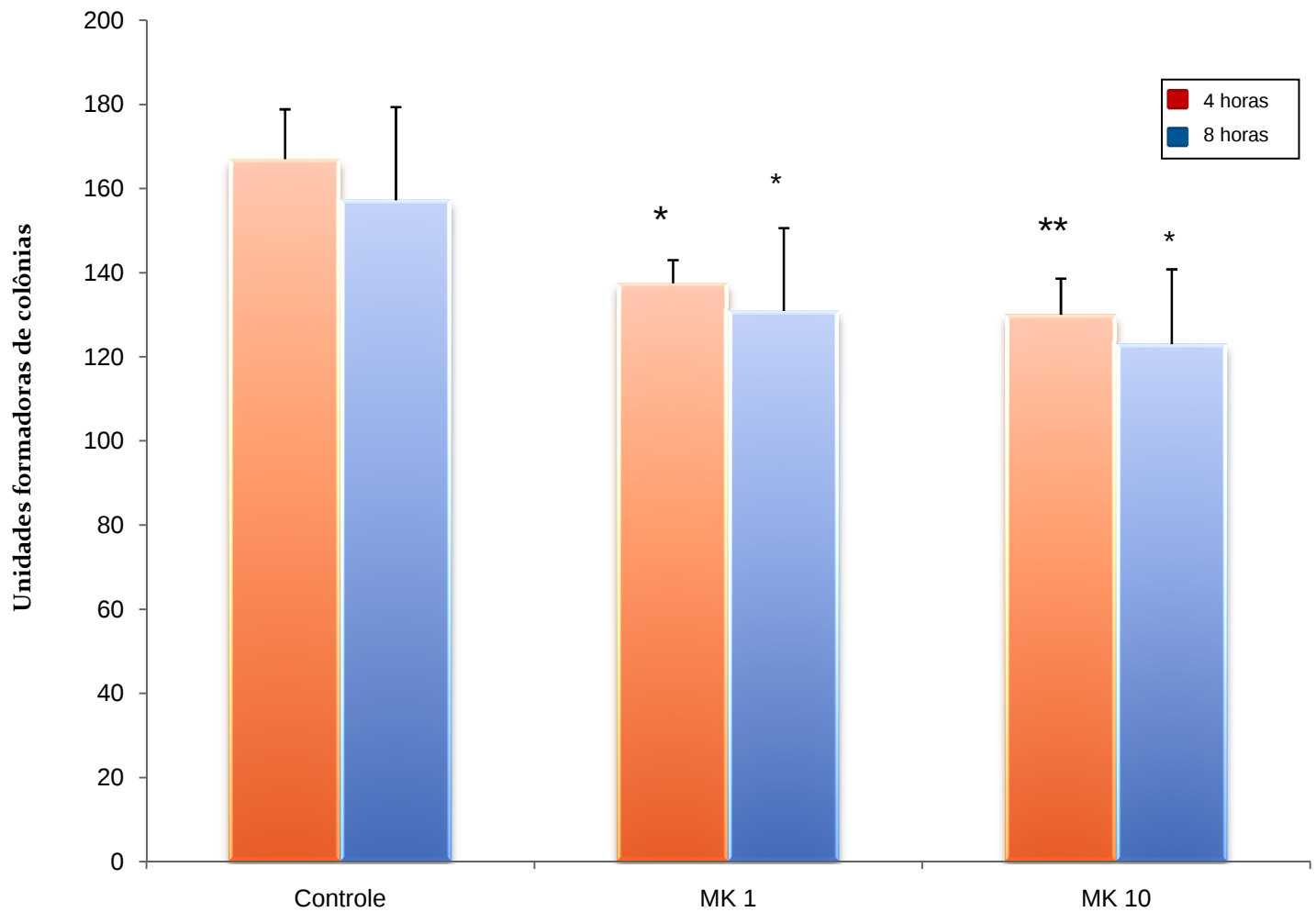


Fig. 24: Recuperação de unidades formadoras de colônia (UFC) da cepa Pb192 do *P. brasiliensis* cultivada por 4 ou 8 horas somente com meio de cultura (controle) ou meio de cultura acrescido de MK886 nas concentrações 1 e 10 µM/mL. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão.

*p < 0.01 x controle

**p < 0.001 x controle

7. DISCUSSÃO

Vários trabalhos na literatura têm mostrado que a resposta imune efetora contra o *P. brasiliensis* pode ser modulada por fatores como as citocinas ativadoras e desativadoras¹⁰⁰⁻¹¹⁰. Neste contexto, macrófagos murinos ou monócitos/macrófagos humanos não ativados não apresentam atividade fungicida ou fungistática contra o *P. brasiliensis*, permitindo a multiplicação do mesmo no interior das células^{102-103, 106}. No entanto, macrófagos murinos ativados por IFN- γ ou citocinas não purificadas, adquirem a capacidade de digerir o fungo, conídios ou ainda inibir transformação de conídios em levedura^{100-102, 104, 105}.

No que se refere às células humanas, os resultados revelam que monócitos e macrófagos de indivíduos normais quando ativados por IFN- γ inibem o crescimento intracelular do *P. brasiliensis*¹⁰⁶. Trabalhos em nosso laboratório mostraram que a pré-incubação de monócitos com IFN- γ induz essas células a uma eficiente atividade fungicida somente contra cepa virulenta do *P. brasiliensis*. Essa atividade, contra a cepa avirulenta é adquirida somente após pré-incubação com TNF- α ou TNF- α mais IFN- γ ¹⁰⁸ ou GM-CSF¹¹¹. Assim, na dependência da cepa utilizada, o processo de ativação das células fagocitárias pode necessitar de sinais dados por diferentes citocinas.

Estudos em nosso laboratório demonstraram que a atividade fungicida de monócitos humanos ativados com TNF- α envolve a geração de metabólitos do oxigênio como a H₂O₂¹¹². Para os macrófagos murinos, estudos mostraram que atividade antifúngica de macrófagos ativados com IFN- γ independe do metabolismo oxidativo, ocorrendo a participação dos metabólitos do nitrogênio como o óxido nítrico (NO)¹¹³. No entanto, trabalho recente em nosso laboratório demonstrou que tanto a H₂O₂ como o NO participam da atividade fungicida de macrófagos murinos ativados com TNF- α ou IFN- γ ¹¹⁰.

Os trabalhos citados acima deixam clara a necessidade de um processo de ativação das células mononucleares para a aquisição de atividade fungicida contra *P. brasiliensis*. Esse processo pode ocorrer nas primeiras fases de interação do fungo, durante o desenvolvimento de uma resposta imune inata. As fontes das principais citocinas envolvidas nesta fase seriam as células NK

para o IFN- γ ¹¹⁴⁻¹¹⁵ ou monócitos do sangue periférico¹¹⁶ ou macrófagos peritoneais, para o TNF- α ¹¹⁷.

No entanto, alguns estudos têm claramente demonstrado que a ação das citocinas ativadoras pode ser altamente controlada por citocinas supressoras, como a IL-10. Assim, a IL-10 desativa macrófagos murinos e monócitos humanos ativados com IFN- γ ou TNF- α , inibindo a capacidade dessas células destruírem o *P. brasiliensis*. Nesse sentido, a ativação das células fagocitárias para a destruição do fungo depende da produção de IFN- γ e ou TNF- α , associada à produção de baixos níveis de IL-10^{107, 109-108}.

Os trabalhos citados acima mostram o interesse da literatura em estabelecer os fatores de ativação e desativação da resposta imune contra o *P. brasiliensis* representados principalmente pelas citocinas. No entanto, são raros os trabalhos com o objetivo de avaliar o papel de outros fatores potencialmente moduladores, como os eicosanóides que envolvem principalmente as PGs e os LTs^{60-62 118}.

Tem sido relatado que, apesar das células do hospedeiro constituir uma importante fonte dessas substâncias em resposta a vários microrganismos, outras fontes em potencial seriam os próprios microrganismos¹¹⁹. Nesse sentido, trabalho anterior desenvolvido em nosso laboratório mostrou que tanto uma cepa de alta como de baixa virulência de *P. brasiliensis*, Pb18 e Pb265 respectivamente, produzem PGs, sendo a produção desses eicosanóides relacionada com a sobrevivência do fungo¹²⁰. Assim, no presente trabalho objetivamos estender nossos estudos em relação à produção de PGs, adicionando outras cepas às anteriormente testadas, assim como períodos de cultura diferentes. Objetivamos ainda, avaliar a capacidade das mesmas produzirem LTs. Adicionalmente, testamos se o fungo pode produzir esses mediadores utilizando fonte exógena de ácido araquidônico e finalmente, se a produção de ambos está relacionada com a sobrevivência e multiplicação do fungo. Foram utilizadas 4 cepas do fungo de diferentes virulências e avaliados os períodos de cultura de 4 e 8 horas.

A escolha das cepas baseou-se em um estudo realizado por Kurokawa et al¹¹⁶, que determinou o perfil de virulência de 10 cepas de *P. brasiliensis* através da inoculação intravenosa em camundongos e avaliação

do grau de infecção no pulmão e disseminação para fígado e baço. A cepa BT79 foi classificada como de alta virulência, uma vez que um grande número de fungos foi recuperado do pulmão dos animais infectados, além da presença de lesões granulomatosas extensas no fígado e baço. A Pb18 foi considerada de padrão intermediário devido à menor recuperação de fungos do pulmão em relação às cepas de alta virulência. As cepas Pb265 e Pb192 foram consideradas de baixa virulência, em função da recuperação de um número muito baixo de fungos.

Detectamos que as 4 cepas produzem concentrações consideráveis tanto de PGs como de LTs, já nas primeiras 4 horas de cultura, que diminuem de forma significativa após 8 horas de cultura. No entanto, não detectamos diferenças importantes entre as concentrações liberadas pelas diferentes cepas. Esses resultados sugerem que a produção desses eicosanóides não é um fator determinante para as diferenças nas virulências apresentadas pelas cepas testadas.

Nossos resultados incluem o *P. brasiliensis* entre os fungos patogênicos que produzem eicosanóides uma vez que Noverr et al¹²¹, demonstraram, a produção tanto de LTs como PGs por diversos fungos como o *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum* e outros. No entanto, os nossos resultados mostram uma não associação entre virulência e produção de PGs, o que diferem dos obtidos para o fungo *Cryptococcus neoformans*, nos quais a cepa de baixa virulência apresentou níveis significativamente mais baixos do que as amostras clínicas, mais virulentas⁹⁷.

Uma outra importante questão a ser respondida em relação à produção de eicosanóides por fungos diz respeito aos processos metabólicos utilizados. Nesse sentido, considerando que o meio utilizado para o cultivo do fungo não contém entre os seus constituintes o ácido araquidônico acreditamos que o *P. brasiliensis* secrete PGs e LTs utilizando uma fonte endógena desse ou outro substrato semelhante. No entanto, a ocorrência de ácido araquidônico em diversos tipos de fungos ainda é um ponto de discussão importante na literatura. Esse ácido foi detectado em leveduras do fungo *Rhodotorula*, mas não em outros fungos como *C. neoformans* e *C. albicans*¹²²⁻¹²³. No entanto,

discute-se que as condições de cultivo dos fungos e ou extração e identificação não tenham sido as ideais para a detecção de ácidos graxos de cadeia longa.

Neste contexto, um dos objetivos do presente trabalho foi avaliar se o *P. brasiliensis* tem capacidade de utilizar fontes exógenas de ácido araquidônico para a produção de eicosanóides. Nossos resultados mostraram de uma forma muito clara a existência dessa capacidade, uma vez que os níveis de PGs e LTs aumentaram consideravelmente após a adição de diferentes concentrações de ácido araquidônico ao meio de cultura. Esses resultados concordam com a literatura que mostra a capacidade de vários fungos, incluindo *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* em utilizar o ácido araquidônico exógeno como substrato para a produção de PGs e LTs^{121,124}. Esses achados podem ter uma importante implicação *in vivo*, pois sugerem fortemente a utilização, pelo fungo, de AA do hospedeiro para a produção tanto de PGs, como de LTs, durante a infecção.

Outro ponto de discussão refere-se à ocorrência ou não nos fungos, de vias metabólicas, semelhantes às existentes nos mamíferos ou outros eucariotos, que utilizam enzimas como a COX e LO, empregando AA como substrato para a produção desses mediadores. Assim, numa tentativa de mostrar a utilização dessas vias enzimáticas pelo *P. brasiliensis*, realizamos experimentos nos quais as culturas de fungos foram incubadas na presença de INDO um inibidor da enzima COX, no caso dos ensaios de produção de PGs, e de MK886, um inibidor da enzima LO, nos ensaios de produção de LTs. Os níveis de PGE₂ foram significativamente reduzidos na presença de INDO, demonstrando que o *P. brasiliensis* para a produção de PGE₂, usa uma via metabólica dependente da enzima COX. A atividade dessa enzima para a produção de PGs foi demonstrado também para outros fungos como a *C. albicans* e *C. Neoformans*⁹⁷. Da mesma forma, as concentrações de LTB₄ foram reduzidas com a incubação com MK886, mostrando a utilização pelo *P. brasiliensis* da via da LO.

Outro objetivo do nosso trabalho foi avaliar se a produção de PGE₂ e LTB₄ está relacionada com a sobrevivência do *P. brasiliensis*. Observamos para todas as cepas, que o cultivo em meio acrescido de INDO ou MK886 inibiu de forma significativa a viabilidade dos fungos. Assim, concluímos a existência no *P. brasiliensis*, de vias metabólicas dependentes de COX e LO

que culminam com a produção de PGE_2 e LTB_4 , que são importantes para a sua sobrevivência.

Novamente, nossos resultados estão de acordo com os de Noverr et al^{97,121}, que mostram que tanto as PGs como os LTs interferem, substancialmente, com a viabilidade de *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*.

No entanto, além do papel na sobrevivência do fungo, outro ponto de discussão importante refere-se ao papel das PGs e LTs na modulação da resposta imune do hospedeiro. Nesse sentido, devemos considerar que além dos microrganismos alterarem essa resposta induzindo a produção desses mediadores pelas células do hospedeiro, eles seriam os próprios produtores.

Nesse sentido, PGs derivadas de leveduras de *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, de forma semelhante à liberada por células de mamíferos, alteram as funções da resposta imune, diminuindo a produção de quimiocinas e $\text{TNF-}\alpha$, a proliferação de esplenócitos, mas aumentando a produção de IL-10.

Na PCM, estudos revelam que em modelo experimental murino células esplênicas secretam PGE_2 , que possui atividade imunossupressora, inibindo a produção de IL-2, mas aumentando a de IL-4 e IL-10 durante os primeiros períodos da infecção⁶⁰. Em nosso laboratório estudos *in vitro* tem mostrado que *P. brasiliensis* induz a produção de PGs por monócitos humanos inibindo a capacidade dessas células destruírem o fungo⁶¹⁻⁶². Nesse sentido, nossos resultados indicam que *P. brasiliensis* possui um mecanismo de escape das funções efectoras do hospedeiro, tanto produzindo PGs quanto induzindo sua produção.

Em relação ao LTs os vários trabalhos têm mostrado que ao contrário das PGs, esses mediadores exercem um efeito modulador positivo sobre a resposta imune do hospedeiro. No entanto, na PCM, o único trabalho realizado com o objetivo de avaliar o papel desse mediador nessa resposta, mostrou uma modulação negativa, sugerindo que esse mediador na PCM, pode ter um efeito semelhante ao da PG⁹⁶.

8. CONCLUSÃO

O *Paracoccidioides brasiliensis* independente da sua virulência tem capacidade de produzir LTs e PGs, utilizando tanto fonte endógena como exógena de ácido araquidônico e que esses mediadores são importantes para a sua sobrevivência e provavelmente para a sua evasão da resposta imune do hospedeiro.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lutz A. Uma mycose pseudococcidica localisada na bocca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. Bras Med 1908; 22: 121-124.
2. Splendore A. Un'affezione micotica com localizzazione nella mucosa della bocca, osservata in brasil, determinata da funghi appartenenti alla tribu degli exoascei (*Zymonema brasiliensis* n. sp.) In: Bertero G. Volume in onore del Prof Celli nel 25^o anno di insegnamento, Roma: 1912. 412p.
3. Almeida FP. Estudos comportamentais do granuloma coccidióidico nos Estados Unidos do Brasil. Novo gênero para o parasitismo. Ann. Med. São Paulo 1930; 5: 125.
4. Lacaz CS. South American Blastomycosis. Anais da Faculdade de Medicina de São Paulo 1956; 7-120.
5. Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. Sabouraudia. 1985; 23(5): 323-34.
6. Albornoz MB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. Sabouraudia 1971; 9(3): 248-53.
7. Naiff RD, Ferreira LCL, Barret TV. Paracoccidioidomycose enzoótica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no Estado de Pará. Rev Inst Med Trop 1986; 28: 19-29.
8. Bagagli E, Sano A, Coelho KI, Alquati S, Miyji M, Camargo ZP, et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. Am J Trop Med Hyg 1998; 58: 505-512.
9. Puccia R, Schenkman NS, Gorin PA, Travassos LR. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis* identification of a specific antigen. Infect Immun 1986; 53: 199-206.
10. Puccia R, Travassos LR. 43-Kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. J Clin Microbiol 1991; 29: 1610-5.

11. Silva-Vergara ML, Martinez R, Camargo ZP, Malta MHB, Maffei CML, Chadu JB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. *Med Mycol* 2000; 38: 193-199.
12. Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium - to - yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* 1984; 46: 346-353.
13. Stevens DA. The interface of mycology and endocrinology. *J Med Vet Mycol* 1989; 27(3):133-40.
14. Aristizabal BH. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. *Infect Immun* 1998; 66(11): 5587-91.
15. Aristizabal BH, Clemons KV, Cock AM, Restrepo A, Stevens DA. Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue response. *Med Mycol* 2002; 40(2): 169-78.
16. Mackinnon JE. Pathogenesis of South American blastomycosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1959; 53: 487-494.
17. Gonzáles Ochoa A. Theories regarding the portal of entry of *Paracoccidioides brasiliensis*: a brief review. *Sci Publ PAHO* 1972; 254: 278-280.
18. Giraldo R, Restrepo A, Gutiérrez F. Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a model based on the study of 46 patients. *Mycopathol* 1976; 58: 63-70.
19. Restrepo A. Immune response to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Curr Top Med Mycol* 1988; 2: 239-277.
20. Wanke B, Londero AT. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: Franco M. *Paracoccidioidomycosis*. Florida USA. CRC Press Boca Raton, 1994; 109-120.
21. Carbonell LM, Rodriguez J. Transformation of mycelia and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis* in cultures and in experimental inoculations. *J Bacterial* 1965; 90: 504-510.
22. San-Blás F, San-Blás G. *Paracoccidioides brasiliensis*. In; Szaniszló PJ. *Fungal Dimorphism*. New York: Plenum 1985; 93-120.

23. Franco M, Montenegro MP, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NGS. Paracoccidioidomycosis a recent proposed classification of its forms. *Rev Soc Bras Med Trop* 1987; 20: 129-132.
24. Mendes RP. The gamut of clinical manifestations. In: Franco MF, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press 1994; 233-252.
25. Franco M, Peraçoli MTS, Soares AMVC, Montenegro MR, Mendes RP, Meira DA. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Trop Med Mycol* 1993; 5: 115-149.
26. Mendes, RP. Quadro clínico. In: Veronesi R, Foccacia R. *Tratado de Infectologia*. Rio de Janeiro, Atheneu 1996; 1803p.
27. Lacerda GB, Arce-Gomez B, Queiroz-Telles F. Increased frequency of HLA-40 in patients with paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 1988; 26: 253-256.
28. Peraçoli MT, Soares AMVC. Imunologia da paracoccidioidomicose. In: Tosta CE. *Imunologia das infecções*. Uberaba: FUNEPU 1992; 5-36.
29. Mencacci A, Cenci E, Bacci A, Montagnoli C, Bistoni F, Romani L. Cytokines in candidiasis and aspergillosis. *Curr Pharm Biotechnol* 2000; 1(3):235-51.
30. Antachopoulos C, Roilides E. Cytokines and fungal infections. *Br J Hematol* 2005; 129(5):583-96.
31. Smith WL, Dewitt DL. Prostaglandins endoperoxide H synthase-1 and -2. *Adv Immunol* 1996; 62: 167-215.
32. Herschman HR. Prostaglandin synthase 2. *Biochem Biophys Acta* 1996; 1299(1): 125-140.
33. Ruggeri P, Nicocia G, Venza I, Venza M, Valenti A, Teti D. Polyamine metabolism in prostaglandin E₂ treated human T lymphocytes. *Immunoph Immunot* 2000; 22: 117-129.
34. Choudhry MA, Hockberger PE, Sayeed MM. PGE₂ suppresses mitogen induced Ca²⁺ mobilization in T cells. *Am J Physiol* 1999a; 277: 1741-1748.
35. Choudhy MA, Ahmed Z, Sayeed MM. PGE₂ mediated inhibition of T cell p59 (fyn) is independent of cAMP. *Am J Physiol* 1999b; 277: 302-309.
36. Cosme R, Lublin D, Takafuji V, Lynch K, Roche JK. Prostanoids in human colonic mucosa: effects of inflammation on PGE₂ receptor expression. *Hum Immunol* 2000; 6(7)1: 684-696.

37. Mastino A, Piacentini M, Grelli S, Favalli C, Autuori F, Tentori L, et al. Induction of apoptosis in thymocytes by prostaglandin E *in vivo*. *Dex Immunol* 1992; 2(4):263-271.
38. Pica E, Franzese O, D'Onofrio C, Bonmassa E, Favalli C, Garaci E. Prostaglandin E₂ induces apoptosis in resting immature and mature human lymphocytes a c-Myc-dependent and Bcl-2-independent associated pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 277(3): 1793-1800.
39. Porter BO, Malek TR. Prostaglandin E₂ inhibits T cell activation induced apoptosis and Fas mediated cellular cytotoxicity by blockade of Fas-ligand induction. *Eur J Immunol* 1999; 29: 2360-2365.
40. Bloom D, Jabrane-Ferrat N, Zeng L, Wu A, Li L, Lo D, et al. Prostaglandin E₂ enhancement of interferon- γ production by antigen-stimulated type 1 helper T cells. *Cell Immunol* 1999; 194: 21-7.
41. Hilkens C, Snijders A, Snijdwint FG, Wierenga EA, Kapsenberg ML. Modulation of T cell cytokine secretion by accessory cell derived products. *Eur Resp J Supl* 1996; 22: 90-94.
42. Phipps RP, Stein H, Roper RL. A new view of prostaglandin E regulation of immune response. *Immunol Today* 1991; 12: 349-352.
43. Hendricks A, Leibold W, Kalver V, Shuberth H J. Prostaglandin E₂ is variably induced by bacterial superantigens in bovine mononuclear cells and has a regulatory role for the T cell proliferative response. *Immunology* 2000; 201: 493-505.
44. Ganapathy V, Gurlo T, Jarstamarken H O, Von Grafenstein H. Regulator of TCR-induced IFN- γ release from islet-reactive non-obese diabetic CD₈⁺ T cells by prostaglandin E₂ receptor signaling. *Int Immunol* 2000; 12: 851-60.
45. Reiser C, Bock G, Klocker H, Bartsh G, Thurnher M. Prostaglandin E₂ and tumor necrosis factor- α cooperate to activate human dendritic cells synergistic activation of interleukin-12 production. *J Exp Med* 1997; 186: 1603-8.
46. Harizi H, Juzan M, Grosset C, Rashedi M, Gualde N. Dendritic cells issued *in vitro* from bone marrow produce PGE₂ that contributes to the immunomodulation induced by antigen-presenting cells. *Cell Immunol* 2001; 209: 19-28.

47. Kalinski P, Hilkens C, Snijders A, Snijdwint FG, Kapsenberg ML. Dendritic cells obtained from peripheral blood precursors in the presence of PGE₂ promote Th₂ responses. *Adv Exp Med Biol* 1997; 417: 363-67.
48. Walker W, Rotondo D. Prostaglandin E₂ is a potent regulator of interleukin-12 and interleukin-18 induced natural killer cell interferon- γ synthesis. *Immunology* 2004; 111: 298-305.
49. Gazzinelli RT, Oswald IP, James SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon- γ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L arginine-dependent, nitrogen oxide mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . *Eur J Immunol* 1992a; 22: 2501-6.
50. Gazzinelli RT, Oswald IP, James SL, Sher A. IL-10 inhibits parasite killing and nitric oxide production by IFN- γ -activated macrophages. *J Immunol* 1992b; 148: 1792-6.
51. Edwards CK, Hedegaard HB, Zlotnik A, Gangadharam PR, Johnston Jr RB, Pabst MJ. Chronic infection due to *Mycobacterium intracellulare* in mice: association with macrophage release of prostaglandin E₂ and reversal by injection of indomethacin, muramyl dipeptide, or interferon- γ . *J Immunol* 1986; 136: 1820-27.
52. Farrell JP, Kirkpatrick CE. Experimental Cutaneous Leishmaniasis. A possible role for prostaglandin in exacerbation of disease in *Leishmania major*-infected Balb/c mice. *J Immunol* 1987; 138: 902-907.
53. De Freitas LAR, Mbow ML, Estay M, Bleyenbergh JA, Titus RG. Indomethacin treatment slows disease progression and enhances a Th1 response in susceptible Balb/c mice infected with *Leishmania major*. *Paras Immunol* 1999; 21: 273-277.
54. Stout RD, Ferguson KP, Li YN, Lambe Jr DW. Staphylococcal exopolysaccharides inhibit lymphocyte proliferative responses by activation of monocyte prostaglandin production. *Infect Imm* 1992; 60: 922-927.
55. Schleifer KW, Mansfield MJ. Suppressor macrophages in African trypanosomiasis inhibit T cell proliferative responses by nitric oxide and prostaglandins. *J. Immunol* 1993; 151: 5492-5503.

56. Pinge-Filho P, Tadakoro CE, Abrahamsohn IA. Prostaglandins mediated suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell Immunol* 1999; 193: 90-98.
57. Rangel Moreno J, Estrada Garcia I, Garcia Hernandez ML, Aguilar Leon D, Marquez R, Hernandez Pando R. The role of prostaglandin E₂ in the imunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 2002; 106: 257-66.
58. Barros-Mazon S, Guariento ME, Silva CA, Coffman RL, Abrahamsohn IA. Differential regulation of lymphoproliferative responses to *Trypanosoma cruzi* antigen in patients with the cardiac or indeterminate form of Chagas disease. *Clin Immunol* 2004; 111: 137-145.
59. Ramaswany K, Kumar P, He YX. A role for Parasite-Induced PGE₂ in IL-10-mediated host immunoregulation by skin stage schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol* 2000; 165: 4567-4574.
60. Michelin MA, Figueiredo F, Cunha FQ. Involvement of prostaglandin in the immunosuppression occurring during experimental infection by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Exper Parasitol* 2002; 102: 170-177.
61. Soares AMVC, Calvi SA, Peraçoli MTS. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunology* 2001; 102: 480-485.
62. Bordon AP, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Calvi SA, Peraçoli MT, Victoriano de Campos Soares AM. Prostaglandin E₂ inhibits *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human monocytes. *Microbes Infect* 2007a; 9(6):744-7.
63. Peters-Golden M, Coffey M. Role of leukotrienes in antimicrobial defense of the lung. *J Lab Clin Med* 1998; 132(4):251-7.
64. Samuelsson B, Borgeat P, Hammarström S, Murphy RC. Introduction of a nomenclature: leukotrienes. *Prostaglandins* 1979; 17(6): 785-7.
65. Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Smith MJ. Lipoxygenase products and the polymorphonuclear leucocyte. *Agents Actions* 1980; 10(6): 548-50.
66. Hebert MJ, Takano T, Holthöfer H, Brady HR. Sequential morphologic events during apoptosis of human neutrophils. Modulation by lipoxygenase-derived eicosanoids. *J Immunol* 1996; 157(7): 3105-15.

-
67. Mancuso P, Standiford TJ, Marshall T, Peters-Golden M. 5-Lipoxygenase reaction products modulate alveolar macrophage phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun 1998; 66(11): 5140-6.
 68. Serhan CN, Haeggström JZ, Leslie CC. Lipid mediator networks in cell signaling: update and impact of cytokines. FASEB J 1996; 10(10): 1147-58.
 69. Talvani A, Machado FS, Santana GC, Klein A, Barcelos L, Silva JS, Teixeira MM. Leukotriene B₄ induces nitric oxide synthesis in infected murine macrophages and mediates resistance to infection. Infect Immun 2002; 70(8): 4247-53.
 70. Hubbard NE, Erickson KL. Role of 5'-lipoxygenase metabolites in the activation of peritoneal macrophages for tumoricidal function. Cell Immunol 1995; 160(1):115-22.
 71. Lärfars G, Lantoiné F, Devynck MA, Gyllenhammar H. Electrochemical detection of nitric oxide production in human polymorphonuclear neutrophil leukocytes. Scand J Clin Lab Invest 1999; 59(5): 361-8.
 72. Ito N, Yokomizo T, Sasaki T, Kurosu H, Penninger J, Kanaho Y, Katada T, Hanaoka K, Shimizu T. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase activation and calcium influx for leukotriene B₄-induced enzyme release. J Biol Chem 2002; 277(47): 44898-904.
 73. Flamand L, Borgeat P, Lalonde R, Gosselin J. Release of anti-HIV mediators after administration of leukotriene B₄ to humans. J Infect Dis. 2004; 189(11):2001-9.
 74. Bjerrum OW, Borregaard N. Dual granule localization of the dormant NADPH oxidase and cytochrome b559 in human neutrophils. Eur J Haematol 1989; 43(1): 67-77.
 75. Lindsay MA, Haddad EB, Rousell J, Teixeira MM, Hellewell PG, Barnes PJ, Giembycz MA. Role of the mitogen-activated protein kinases and tyrosine kinases during leukotriene B₄-induced eosinophil activation. J Leukoc Biol 1998; 64(4): 555-62.
 76. Yokomizo T, Masuda K, Kato K, Toda A, Izumi T, Shimizu T. Leukotriene B₄ receptor. Cloning and intracellular signaling. Am J Respir Crit Care Med 2000a; 161(2): S51-5.

77. Yokomizo T, Kato K, Terawaki K, Izumi T, Shimizu T. A second leukotriene B (4) receptor, BLT2. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. *J Exp Med* 2000b; 192(3): 421-32.
78. Tager AM, Luster AD. BLT1 and BLT2: the leukotriene B (4) receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003; 69(2-3): 123-34.
79. Wirth JJ, Kierszenbaum F. Stimulatory effects of leukotriene B4 on macrophage association with and intracellular destruction of *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 1985; 134(3): 1989-93.
80. Bailie MB, Standiford TJ, Laichalk LL, Coffey MJ, Strieter R, Peters-Golden M. Leukotriene-deficient mice manifest enhanced lethality from *Klebsiella pneumonia* in association with decreased alveolar macrophage phagocytic and bactericidal activities. *J Immunol* 1996; 157(12):5221-4.
81. Serezani CH, Aronoff DM, Jancar S, Mancuso P, Peters-Golden M. Leukotrienes enhance the bactericidal activity of alveolar macrophages against *Klebsiella pneumoniae* through the activation of NADPH oxidase. *Blood* 2005; 106(3): 1067-75.
82. Serezani CH, Perrela JH, Russo M, Peters-Golden M, Jancar S. Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. *J Immunol* 2006; 177(5): 3201-8.
83. Goldman G, Welbourn R, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Lavage with leukotriene B4 induces lung generation of tumor necrosis factor- α that in turn mediates neutrophil diapedesis. *Surgery* 1993; 113(3): 297-303.
84. Kuhns DB, Nelson EL, Alvord WG, Gallin JI. Fibrinogen induces IL-8 synthesis in human neutrophils stimulated with formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine or leukotriene B (4). *J Immunol* 2001; 167(5): 2869-78.
85. Mellor EA, Austen KF, Boyce JA. Cysteinyl leukotrienes and uridine diphosphate induce cytokine generation by human mast cells through an interleukin 4-regulated pathway that is inhibited by leukotriene receptor antagonists. *J Exp Med* 2002; 195(5):583-92.
86. Paine R, Morris SB, Jin H, Wilcoxon SE, Phare SM, Moore BB, Coffey MJ, Toews GB. Impaired functional activity of alveolar macrophages from GM-

- CSF-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281(5):L1210-8.
87. Brock TG, McNish RW, Coffey MJ, Ojo TC, Phare SM, Peters-Golden M. Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on eicosanoid production by mononuclear phagocytes. *J Immunol* 1996; 156(7): 2522-7.
88. Pouliot M, McDonald PP, Borgeat P, McColl SR. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor stimulates the expression of the 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) in human neutrophils. *J Exp Med* 1994; 179(4):1225-32.
89. Coffey MJ, Wilcoxon SE, Sporn PH, Peters-Golden M. Regulation of 5-lipoxygenase activity in mononuclear phagocytes: characterization of an endogenous cytosolic inhibitor. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 1998; 56(2-3):103-17.
90. Coffey MJ, Phare SM, Peters-Golden M, Huffnagle GB. Regulation of 5-lipoxygenase metabolism in mononuclear phagocytes by CD4 T lymphocytes. *Exp Lung Res* 1999; 25(7):617-29.
91. Coffey MJ, Phare SM, Peters-Golden M. Role of leukotrienes in killing of *Mycobacterium bovis* by neutrophils. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004; 71(3): 185-90.
92. Peres CM, de Paula L, Medeiros AI, Sorgi CA, Soares EG, Carlos D, Peters-Golden M, Silva CL, Faccioli LH. Inhibition of leukotriene biosynthesis abrogates the host control of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect* 2007; 9(4): 483-9.
93. Rouzer CA, Ford-Hutchinson AW, Morton HE, Gillard JW. MK886, a potent and specific leukotriene biosynthesis inhibitor blocks and reverses the membrane association of 5-lipoxygenase in ionophore-challenged leukocytes. *J Biol Chem* 1990; 265(3): 1436-42.
94. Anibal FF, Rogerio AP, Malheiro A, Machado ER, Martins-Filho OA, Andrade MC, Soares EG, Medeiros AI, Faccioli LH. Impact of MK886 on eosinophil counts and phenotypic features in toxocariasis. *Scand J Immunol* 2007; 65(4): 344-52.
95. Medeiros AI, Sá-Nunes A, Soares EG, Peres CM, Silva CL, Faccioli LH. Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. *Infect Immun* 2004; 72(3): 1637-44.

96. Ribeiro LRR, Calich VLG. 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, 2005, Lindóia. Rev. Inst. Med. Rrop. S. Paulo 2005; 47: 27.
97. Noverr MC, Phare SM, Toews GB, Coffey MJ, Huffnagle GB. Pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* produce immunomodulatory prostaglandins. Infect Immun 2001; 69(5):2957-63.
98. Kurita N, Sano A, Coelho KIR, Takeo K, Nishimura K, Miyaji M. Na improved culture medium for detecting live yeast phase cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Med Vet Mycol 1993; 31: 201-5.
99. Godfrey KAM. Statistic in practice. Comparing the means of several groups. N England J Med 1985; 313: 450-6.
100. Brummer E, Hanson HL, Restrepo A, Stevens DA. *In vivo* and *in vitro* activation of pulmonary macrophages by IFN-gamma for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitides*. J Immunol 1988a; 140: 2786-9.
101. Brummer E, Hanson LH, Stevens DA. Gamma interferon activation of macrophages for killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and evidence for nonoxidative mechanisms. Int J Immunopharmacol 1988b; 10: 945-52.
102. Brummer E, Hanson LH, Restrepo A, Stevens DA. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. Infect Immun 1989; 57: 2289-94.
103. Goihman-Yahr M, Isturiz G, Rotthenberg A. Los fagocitos y patogenia de la paracoccidioidomicosis. Interciencia 1990; 200-5.
104. Cano LE, Brummer E, Stevens DA, Restrepo A. Fate of conidia of *Paracoccidioides brasiliensis* after ingestion by resident macrophages or cytokine-treated macrophages. Infect Immun 1992a; 60(5):2096-100.
105. Cano LE, Arango R, Salazar ME, Brummer E, Stevens D, Restrepo A. Killing of *P. brasiliensis* conidia by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. J Med Vet Mycol 1992b; 30(2): 161-8.
106. Moscardi-Bacchi M, Brummer E, Stevens DA, Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. J Med Microbiol 1994; 40(3): 159-64.

107. Soares AMVC, Silva WB, Rodrigues DR, Calvi SA, Dias LA, Peraçoli MTS, Kurokawa CS. IL-10 but not TGF- β inhibits *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human activated monocytes. Ann Rev Biom Sciences 2002; 89.
108. Calvi SA, Peraçoli MT, Mendes RP, Marconde-Machado J, Fecchio D, Marques SA, Soares AMVC. Effects of cytokines on the *in vitro* fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. Microbes Infect 2003; 5: 107-13.
109. Costa DL, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Bordon AP, Tavian EG, Peraçoli MT, Soares AM. Effect of interleukin-10 on the *Paracoccidioides brasiliensis* killing by gamma-interferon activated human neutrophils. Microbiol Immunol 2007; 51(1): 73-80.
110. Moreira AP, Dias-Melicio LA, Peraçoli MT, Calvi SA, Victoriano de Campos Soares AM. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells by IFN-gamma and TNF-alpha activated murine peritoneal macrophages: evidence of H₂O₂ and NO effector mechanisms. Mycopathologia 2008; 166(1): 17-23.
111. Carmo, JPM. Role of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM- CSF) on human monocytes activation *in vitro* for high-virulent *Paracoccidioides brasiliensis* killing. In: VIII International Meeting on Paracoccidioidomycosis - Prof. Carlos da Silva Lacaz, 2002, Pirenópolis-Goiás-Brazil. Annual Review of Biomedical Sciences. São Paulo - SP : Fundação Editora da Unesp, 2002. v. 2002. p. 94.
112. Carmo JP, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peraçoli MT, Soares AM. TNF-alpha activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H₂O₂-dependent mechanism. Med Mycol 2006 Jun; 44(4): 363-8.
113. Gonzáles A, Gregori W, Velez D, Restrepo A, Cano LE. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *P. brasiliensis* conidia. Infect Immun 2000; 68: 2546-52.
114. Dunn PL, North RJ. Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis. Infect Immun 1991; 59(9): 2892-900.
115. Levitz SM, North EA. gamma Interferon gene expression and release in human lymphocytes directly activated by *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. Infect Immun 1996; 64(5): 1595-9.

116. Kurokawa CS, Lopes CR, Sugizaki MF, Kuramae EE, Franco MF, Peraçoli MT. Virulence profile of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates: association with morphologic and genetic patterns. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2005; 47(5): 257-62.
117. Figueiredo F, Alves LM, Silva C L. Tumour necrosis factor production *in vivo* and *in vitro* in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions. *Clin Exp Immunol* 1993; 93(2):189-94.
118. Biondo GA, Bordon-Graciani AP, Tavian EG, Acorci MJ, Dias-Melicio LA, Peraçoli MTS, Soares AMVC. Produção de leucotrieno B₄ por diferentes cepas do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. CD-ROM do VII Workshop de Pós-graduação, Botucatu, São Paulo, Brasil, 2008.
119. Noverr MC, Erb-Downward JR, Huffnagle GB. Production of eicosanoids and other oxylipins by pathogenic eukaryotic microbes. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(3): 517-33.
120. Bordon AP, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Biondo GA, Fecchio D, Peraçoli MT, Soares AMVC. Prostaglandin E(2) production by high and low virulent strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia*. 2007b; 163(3): 129-35.
121. Noverr MC, Toews GB, Huffnagle GB. Production of prostaglandins and leukotrienes by pathogenic fungi. *Infect Immun* 2002; 70(1): 400-2.
122. Gangopadhyay PK, Thadepalli H, Roy I, Ansari A. Identification of species of *Candida*, *Cryptococcus*, and *Torulopsis* by gas-liquid chromatography. *J Infect Dis* 1979; 140(6): 952-8.
123. Marumo K, Aoki Y. Discriminant analysis of cellular fatty acids of *Candida sp*, *Torulopsis glabrata*, and *Cryptococcus neoformans* determined by gas-liquid chromatography. *J Clin Microbiol* 1990; 28(7): 1509-13.
124. Deva, R., R. Ciccoli, T. Schewe, J. L. Kock, and S. Nigam. Arachidonic acid stimulates cell growth and forms a novel oxygenated metabolite in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1486: 299–311.

10. RESUMO

Paracoccidioides brasiliensis, é o agente da paracoccidioidomicose, a micose profunda endêmica na América Latina. Produção de eicosanóides, como prostaglandinas e leucotrienos, durante as infecções fúngicas tem mostrado desempenhar um papel crítico na sobrevivência e/ou crescimento fúngico, bem como na modulação da resposta imune do hospedeiro. As células hospedeiras são uma fonte desses mediadores, porém outra fonte em potencial pode ser o próprio fungo. O objetivo do nosso estudo foi avaliar se cepas do *P. brasiliensis* com diferentes graus de virulência (Pb18, Pb265, BT79, Pb192) produzem, prostaglandina E_2 (PGE_2) e leucotrieno B_4 (LTB_4). Além disso, verificamos se *P. brasiliensis* pode usar fontes exógenas de ácido araquidônico (AA), bem como as vias metabólicas dependentes das enzimas cicloxigenase (COX) e lipoxigenase (5-LO), para a produção de PGE_2 e LTB_4 , respectivamente. Finalmente, uma possível associação entre esses eicosanóides e a viabilidade do fungo também foi avaliada. Demonstramos, usando ensaios de Elisa, que todas as cepas de *P. brasiliensis*, independente do seu grau de virulência, produzem altos níveis de PGE_2 e LTB_4 após 4h cultura que foram reduzidos após 8h. No entanto, em ambos os tempos da cultura, foram detectados níveis mais elevados de eicosanóides, quando as culturas foram complementadas com uma fonte exógena de AA. Diferentemente, o tratamento com indometacina, um inibidor da COX, ou MK886, um inibidor da 5-LO, induz a uma redução nos níveis de PGE_2 e LTB_4 , respectivamente, bem como a viabilidade do fungo. Os dados fornecem evidências de que *P. brasiliensis* tem a capacidade de metabolizar, tanto AA endógeno como exógeno por vias dependentes da COX e 5-LO enzimas que participam da produção de PGE_2 e LTB_4 , respectivamente, que são indispensáveis para a sua viabilidade.

11. ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis, is the agent of paracoccidioidomycosis, the most prevalent deep mycosis in Latin America. Production of eicosanoids, such as prostaglandins and leukotrienes, during fungal infections is theorized to play a critical role on fungal survival and/or growth as well as on host immune response modulation. Host cells are one source of these mediators; however another potential source may be the fungal itself. The purpose of our study was to assess whether *P. brasiliensis* strains with different degree of virulence (Pb18, Pb265, PbBT79, Pb192) produce both, prostaglandin E₂ (PGE₂) and leukotriene B₄ (LTB₄). Moreover, we asked if *P. brasiliensis* can use exogenous sources of arachidonic acid (AA), as well as metabolic pathways dependent on cyclooxygenase (COX) and lipooxygenase (5-LO) enzymes, for PGE₂ and LTB₄ production, respectively. Finally, a possible association between these eicosanoides and fungus viability was assessed. We have demonstrated, using Elisa assays, that all *P. brasiliensis* strains, independently of their virulence degree, produce high PGE₂ and LTB₄ levels on 4h culture that were reduced after 8 h. However, in both culture times, higher eicosanoides levels were detected when culture medium was supplemented with exogenous AA. Differently, treatment with indomethacin, a COX inhibitor, or MK886, a 5-LO inhibitor, induces a reduction on PGE₂ and LTB₄ levels, respectively, as well as in fungus viability. The data provide evidence that *P. brasiliensis* has the capacity to metabolize either endogenous or exogenous AA by pathways dependent on COX and 5-LO enzymes for producing PGE₂ and LTB₄, respectively, that are critical for its viability.