

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
UNESP

**“EFEITO DE LEUCOTRIENOS SOBRE A ATIVIDADE
FUNGICIDA DE MONÓCITOS HUMANOS CONTRA O
Paracoccidioides brasiliensis”**

CIBELE FERRARI

BOTUCATU, SP
2009

Cibele Ferrari

**“EFEITO DE LEUCOTRIENOS SOBRE A ATIVIDADE
FUNGICIDA DE MONÓCITOS HUMANOS CONTRA O
Paracoccidioides brasiliensis”**

**Orientadora:
Ângela Maria Victoriano de Campos Soares.**

Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências – UNESP Botucatu, SP – como
exigência parcial para a obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas – Modalidade
Médica.

BOTUCATU, SP
2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Ferrari, Cibeles.

Efeito de Leucotrienos sobre a atividade fungicida de monócitos humanos contra o *Paracoccidioides brasiliensis* / Cibeles Ferrari. - Botucatu [s.n], 2009.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas – Modalidade Médica) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009

Orientadora: Ângela Maria Victoriano de Campos Soares

1. Paracoccidioidomicose 2. Imunologia

Palavras-chave: Imunologia; Leucotrienos; Monócitos; *Paracoccidioides brasiliensis*

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Armando Ferrari e Antonia Silva Ferrari, pois sem seu amor, compreensão e imenso apoio não seria possível a conclusão deste trabalho e nem mesmo a realização do meu curso de graduação.

Ao meu querido irmão André Ferrari pela ajuda e pelo seu apoio.

À orientadora Ângela Maria Victoriano de campos Soares pela confiança depositada em mim e pela sua grande ajuda para a realização deste trabalho, o que me possibilitou um enorme crescimento pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo o apoio e segurança que sempre deram a mim, em todos os momentos da minha vida.

À amiga Ana Paula, pelo imenso auxílio no meu aprendizado e desenvolvimento deste trabalho, pelos conselhos nas horas certas e pelos bons momentos passados no laboratório.

Aos amigos Michele, Luciane e Guilherme pela ajuda e pelo ótimo convívio diário no laboratório, sem o qual seria muito difícil o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os doadores de sangue, pela compreensão e pela ajuda fundamental que deram a este trabalho.

A todos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, em especial, ao Luiz Severino (Lula) pela colaboração prestada, contribuindo para o bom andamento do trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa – FAPESP pelo apoio financeiro dado ao trabalho.

À grande amiga Danielle, que sempre está presente nos bons e nos maus momentos.

A todos aqueles que fizeram parte da minha vida durante a graduação, pelos bons momentos dos quais nunca vou me esquecer.

A todos aqueles que contribuíram, de alguma maneira, para a conclusão deste trabalho.

Sumário

1. Introdução	6
2. Objetivos	14
3 Materiais e Métodos	
3.1. Indivíduos Testados	16
3.2. Isolamento e Cultura de Monócitos	16
3.3. Cultivo do <i>P. brasiliensis</i>	17
3.4. Teste de Viabilidade e Obtenção da suspensão de <i>P. brasiliensis</i>	17
3.5. Avaliação da Atividade Fungicida	17
3.6. Determinação da Produção de Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂)	18
3.7. Determinação da liberação de Óxido Nitrico (NO)	19
3.8. Obtenção de sobrenadantes de cultura de monócitos para dosagem de TNF- α e IL-10	19
3.9. Determinação da produção de TNF- α e IL-10	20
3.10. Análise Estatística	20
4. Resultados	
4.1. Padronização da concentração de IFN- γ ideal para o processo de ativação de monócitos para aumento da atividade fungicida da liberação de H ₂ O ₂	22
4.2. Padronização da concentração de TNF- α ideal no processo de ativação de monócitos para aumento da atividade fungicida da liberação de H ₂ O ₂	24
4.3. Padronização da concentração de GM-CSF ideal no processo de ativação de monócitos para aumento da atividade fungicida da liberação de H ₂ O ₂	26
4.4. Efeito de leucotrienos sobre a atividade fungicida de monócitos humanos ativados ou não com IFN- γ , TNF- α ou GM-CSF e desafiados com cepa de alta ou baixa virulência do <i>P. brasiliensis</i>	28
4.5. Efeito de leucotrienos sobre a liberação de H ₂ O ₂ por monócitos humanos ativados ou não com IFN- γ , TNF- α ou GM-CSF e desafiados com cepa de alta ou baixa virulência do <i>P. brasiliensis</i>	31
4.6. Efeito de leucotrienos sobre a liberação de NO por monócitos humanos ativados ou não com IFN- γ , TNF- α ou GM-CSF e desafiados com cepa de alta ou baixa virulência do <i>P. brasiliensis</i>	34
4.7. Efeito de leucotrienos sobre a produção de IL-10 por monócitos humanos ativados ou não com IFN- γ , TNF- α ou GM-CSF e desafiados com cepa de alta ou baixa virulência do <i>P. brasiliensis</i>	36
4.8. Efeito de leucotrienos sobre a produção de TNF- α por monócitos humanos ativados ou não com IFN- γ , TNF- α ou GM-CSF e desafiados com cepa de alta ou baixa virulência do <i>P. brasiliensis</i>	38
5. Discussão	41
8. ReferênciasBibliográficas	46

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica que se manifesta endemicamente na maioria dos países da América Latina, especialmente Brasil, Argentina, Colômbia e Venezuela. Seu agente etiológico, o *Paracoccidioides brasiliensis*, é 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 (RESTREPO & TOBON, 2005).

Afeta principalmente trabalhadores rurais, que estão constantemente em contato com a vegetação e o solo. Na forma aguda da doença, jovens de ambos os sexos são afetados proporcionalmente. Porém, na forma crônica do adulto há predominância de homens com número reduzido de mulheres afetadas, sendo esse processo relacionado a um efeito protetor promovido pelos hormônios femininos. Estudos *in vitro* demonstram que estrógenos atuam inibindo a transformação de micélios ou conídios em leveduras, evento que proporciona a instalação da infecção (RESTREPO et al., 1984; SALAZAR et al., 1988). Paralelamente, foi demonstrada a presença de receptores para estrógeno tanto na fase micelial como na leveduriforme do fungo (LOOSE et al., 1983; STOVER et al., 1986).

Acredita-se que os agentes infectantes do *P. brasiliensis* sejam propágulos micelianos presentes em água, plantas e solo, que 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. Ao contrário, o processo pode progredir para a paracoccidioidomicose-doença com conseqüente disseminação para outros órgãos como fígado, baço e adrenais pela via linfo-hematogênica (FRANCO et al., 1989). 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 severa, de evolução rápida e compromete o sistema fagocítico mononuclear (baço, fígado, linfonodo 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 (FRANCO et al., 1993; MENDES, 1994).

O estabelecimento da doença, disseminação e gravidade dependem de fatores inerentes ao próprio fungo, como sua virulência, composição antigênica; das condições ambientais; e principalmente dos fatores ligados ao hospedeiro, como idade, sexo, estado nutricional, e principalmente capacidade de desenvolver uma resposta imune eficaz. Em

relação a este fator, estudos clínicos e experimentais têm sugerido a interação entre mecanismos específicos e inespecíficos de defesa na determinação da resistência ao *P. brasiliensis* (FRANCO et al., 1993; CALICH et al., 1994; MUSATTI et al., 1994; PERAÇOLI et al., 1995).

A imunidade inespecífica ou inata apresenta grande importância no combate a fungos patogênicos. Dentre os vários mecanismos envolvidos nesta resposta, os representados pelas células fagocitárias desempenham papel central na resistência contra esses patógenos, com destaque para 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 a produção de citocinas (MENCACCI et al., 2000; ANTACHOPOULOS & ROILIDES, 2005; WALSH et al., 2005). Neste contexto, macrófagos murinos ou monócitos humanos não ativados não apresentam atividade fungicida ou fungistática contra o *P. brasiliensis*, permitindo a multiplicação do mesmo no interior das células. BRUMMER et al. (1989) demonstraram que macrófagos peritoneais e pulmonares de camundongos normais, não ativados *in vitro*, são incapazes de limitar a multiplicação de leveduras do *P. brasiliensis* fagocitadas. As células fúngicas apresentaram intensa multiplicação no interior dos macrófagos, determinando a destruição dessa célula. Os autores discutem que este achado pode ter implicações importantes na patogênese da doença, sugerindo que, *in vivo*, provavelmente, o fungo se multiplique intracelularmente após a ingestão por macrófagos não ativados, levando à destruição das células e a liberação de inúmeras formas de *P. brasiliensis*.

De forma semelhante, MOSCARDI-BACCHI et al. (1994), utilizando monócitos e macrófagos humanos normais, verificaram que estas células permitem o crescimento e a multiplicação intracelular do *P. brasiliensis*. Essa idéia é reforçada por estudos que avaliaram a capacidade fungicida de macrófagos alveolares de pacientes. Nos indivíduos que apresentavam teste intradérmico positivo a paracoccidioidina, os macrófagos mostraram capacidade de degradar o fungo, enquanto que nos pacientes com paracoccidioidina negativa, essa atividade não foi detectada, indicando que nos pacientes com resposta imune celular adequada, os macrófagos estariam sendo ativados, passando a apresentar atividade contra o fungo (GOIHMANN-YAHR et al., 1990).

Esses resultados deixam clara a importância da ativação para que as células fagocitárias adquiram atividades antifúngicas. Nesse sentido, macrófagos murinos ativados por IFN- γ ou linfocinas não purificadas, adquirem a capacidade de digerir o fungo, podendo desempenhar funções efetoras importantes contra o *P. brasiliensis* (BRUMMER et al.,

1988,1989). CANO et al. (1992a) verificaram que macrófagos cultivados em presença de linfocinas obtidas de células de baço de animais imunizados aumentaram a sua capacidade de destruir conídios, assim como inibiram a transformação de conídios em levedura (CANO et al., 1992 b).

No que se refere a células humanas, os resultados obtidos por MOSCARDI-BACCHI et al. (1994) revelam que monócitos e macrófagos de indivíduos normais quando ativados por IFN- γ inibem o crescimento intracelular do *P. brasiliensis*. Estudos semelhantes realizados em nosso laboratório mostraram que a pré-incubação de monócitos com IFN- γ não induz essas células a uma eficiente atividade fungicida contra cepa virulenta do *P. brasiliensis*. Essa atividade é adquirida somente após pré-incubação com TNF- α ou TNF- α mais IFN- γ (CALVI et al., 2003), ou GM-CSF (CARMO et al., 2002). Quando as células são desafiadas com cepa de baixa virulência, a pré-ativação apenas com IFN- γ é suficiente para aquisição de uma eficiente atividade fungicida, demonstrando que na dependência da cepa utilizada, o processo de ativação das células fagocitárias pode necessitar de sinais dados por diferentes citocinas.

No que se refere aos mecanismos através dos quais os monócitos e macrófagos ativados exercem sua atividade fungicida, 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 H₂O₂ (CARMO et al., 2006). Para os macrófagos murinos, os trabalhos têm demonstrado que a atividade antifúngica de macrófagos ativados com IFN- γ independe do metabolismo oxidativo, ocorrendo a participação dos metabólitos do nitrogênio como o NO (GONZALES et al., 2000). 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 (MOREIRA et al., 2008).

A ativação das células fagocitárias com conseqüente atividade fungicida contra o *P. brasiliensis* pode ocorrer nas primeiras fases de interação do fungo, durante o desenvolvimento de uma resposta inata. Nesta fase, as fontes das principais citocinas envolvidas, o IFN- γ e TNF- α , seriam as células NK para o IFN- γ (DUNN et al., 1991; LEVITZ et al., 1996) ou os próprios macrófagos alveolares, para o TNF. Segundo FIGUEIREDO et al. (1993), tanto cepas de *P. brasiliensis* quanto frações da parede celular, ricas em β -glucanas são capazes de induzir níveis elevados de TNF- α , sendo possível sua detecção em soro de camundongos inoculados por via intraperitoneal com o fungo. CALVI et al. (2003), estudando pacientes com paracoccidioidomicose, verificaram que a produção de TNF- α por monócitos infectados, *in vitro*, com a cepa de menor virulência (Pb265), induzia

níveis mais elevados de TNF- α em comparação à cepa virulenta (Pb18). Além disso, níveis mais elevados dessa citocina apresentaram correlação com a maior atividade fungicida dos monócitos, demonstrando a importância do TNF- α nesse mecanismo. Da mesma forma, a incubação de monócitos humanos com IFN- γ mais fração de parede do *P. brasiliensis* rica em beta glucana, induziu essas células a uma maior produção de TNF- α com conseqüente aquisição de maior atividade fungicida (ANJOS et al., 2002). Assim, os níveis dessa citocina poderiam variar na dependência da virulência ou da composição da parede celular da cepa com a qual o indivíduo entra em contato, e conseqüentemente interferir na evolução da doença.

Durante a evolução da infecção, as citocinas ativadoras podem ser geradas por elementos da resposta imune adaptativa, como os linfócitos CD₄ Th1. Vários trabalhos mostram que uma resposta protetora contra o *P. brasiliensis* depende de um padrão de resposta Th1 envolvendo como principais citocinas o IFN- γ , TNF- α e IL-12. (CALICH & KASHINO, 1998, ARRUDA et al., 2002, ROMANO et al., 2002).

Os trabalhos acima citados mostram o interesse da literatura em estabelecer os fatores moduladores da atividade das células fagocitárias contra o *P. brasiliensis*, representados principalmente pelas citocinas ativadoras. No entanto, mediadores farmacológicos derivados do metabolismo do ácido araquidônico, como as prostaglandinas e os leucotrienos (LTs) também poderiam exercer um importante efeito modulador.

Os LTs são sintetizados a partir do metabolismo do ácido araquidônico, pela ação da via 5-lipoxigenase (5-LO), a qual cataliza a inserção do oxigênio molecular ao ácido araquidônico para a formação do ácido 5-(S)-hidroperoxieicosatetraônico (5-HEPE) com subsequente transformação para LTA₄ que é convertido em leucotrienos pela ação da enzima LTA₄ hidrolase (SAMUELSSON et al., 1989; HAEGGSTROM et al., 1993; JAKOBSSON et al., 1997; CHRISTMAS et al., 2002; SOBERMAN et al., 2003; MANDAL et al., 2004). Os LTs são divididos em duas classes, os dihidroxy-leucotrieno (LTB₄) e cystenil-leucotrienos (cysLTs : LTC₄, LTD₄ e LTE₄).

As funções biológicas dos LTs dependem da ativação de receptores que são mediadas via a ligação de proteína G. Os leucotrienos LTB₄ e os membros da família dos cysLTs interagem com dois receptores distintos, os BLT1/2 e cysLTs1/2 respectivamente (TARDER & LUSTER, 2003; KANAOKA & BOYCE, 2004;).

Esses mediadores proinflamatórios são produzidos por várias células como mastócitos e eosinófilos que sintetizam principalmente cysLTs, e neutrófilos, macrófagos e células dendríticas que secretam LTB₄. Estão envolvidos na patogênese de várias doenças incluindo a asma, na qual atuam como broncoconstritores e vasoativos (LEWIS et al., 1990).

Com relação à resposta imune inata estudos têm mostrado que os LTs além de atuarem como importantes agentes quimiotáticos, aumentam a fagocitose e a atividade microbicida de monócitos /macrófagos (WIRTH & KIERSZENBAUM , 1985, MANCUSO et al.,1998, PETERS- GOLDEN & COFFEY, 1998, QADRI et al., 2002; GENTILE et al., 2003, BAILIE et al., 1996)

Estudos adicionais mostraram que os LTs aumentam a atividade microbicida das células por mecanismos dependentes do metabolismo oxidativo (TALVANI et al. ,2002, SEREZANI et al. 2004, SEREZANI et al., 2006).

Em adição aos efeitos diretos dos leucotrienos sobre a funções de fagócitos, como o aumento da atividade microbicida associada à produção de metabólitos derivados de O₂ ou do nitrogênio, esses mediadores também atuam indiretamente na resposta imune inata, estimulando a produção de citocinas como TNF- α , IL-8 e IL-5 (GOLDMAN et al., 1993, KUHNS et al., 2001, MELLOR et al., 2002). Por outro lado, as citocinas como o TNF- α e principalmente o GM-CSF podem atuar sobre as células fagocitárias estimulando-as a produzirem leucotrienos. (PAINE et al., 2001, POULIOT et al., 1994, BROCK et al , 1996 COFFEY et al., 1998 , COFFEY et al., 1999, COFFEY et al., 2004)

Alguns estudos, para avaliar o papel dos leucotrienos, têm utilizado como abordagem experimental a inibição da produção dessas substâncias tanto em ensaios *in vivo* como *in vitro*. Dentre os inibidores utilizados destaca-se o MK886, um potente inibidor da síntese de leucotrienos que não tem 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 biosíntese celular deste metabólito (ROUZER et al., 1990).

Dentro deste contexto, PERES et al. (2007) mostraram que animais tratados com MK886 e infectados com *Mycobacterium tuberculosis* apresentaram um aumento significativo na taxa de mortalidade e na carga bacteriana pulmonar. Adicionalmente, os animais apresentaram uma diminuição na produção de IL-12, IFN- γ e óxido nítrico. Os autores concluíram que os leucotrienos modulam positivamente a resposta protetora Th1 na infecção *in vivo* com *Mycobacterium tuberculosis*.

MANCUSO et al. (1998) demonstraram que a inibição da síntese de LTs por MK-886 *in vitro* diminuiu significativamente a fagocitose de *Klebsiella pneumoniae* opsonizada, por macrófagos murinos.

Estudo com camundongos infectados com *Histoplasma capsulatum* demonstraram que os leucotrienos têm 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, assim como inibiu a produção de IL-12, IL-15, IL-2 e IFN- γ (MEDEIROS et. al., 2004).

Com relação à infecção pelo *P. brasiliensis*, estudos demonstraram que camundongos susceptíveis (B10.A) apresentam maiores níveis de leucotrienos nos pulmões bem como aumento da infecção, quando comparados com os animais resistentes. Além disso, foi avaliado o papel do inibidor de leucotrienos (MK-0591) na infecção *in vitro* e *in vivo*. O tratamento de macrófagos alveolares com o inibidor 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. 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 a doença. (RIBEIRO & CALICH, 2005).

Os trabalhos citados mostram claramente a importância dos leucotrienos na modulação da resposta imune inata contra diversas infecções, sendo raros, no entanto, os que avaliaram o seu efeito nos mecanismos de resposta ao *P. brasiliensis*. Dentro deste contexto, tivemos interesse em avaliar o efeito dos leucotrienos sobre a atividade de monócitos humanos desafiados *in vitro* com o *P. brasiliensis*.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Avaliar o efeito dos leucotrienos sobre a atividade fungicida de monócitos humanos ativados com TNF- α , IFN- γ e GM-CSF e desafiados com *P. brasiliensis*.

2.2. Relacionar essa atividade com os níveis de H₂O₂, NO e das citocinas IL-10, TNF- α .

Material
e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Indivíduos Testados

Foram avaliados monócitos obtidos de 20mL de sangue periférico de 20 indivíduos normais, do sexo masculino e com peso superior à setenta quilos, doadores de sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. O consentimento dos indivíduos para participação no presente trabalho foi obtido após informação e esclarecimento sobre os objetivos da pesquisa e assinatura do formulário de consentimento.

3.2. Isolamento e Cultura de Monócitos

Sangue periférico de indivíduos saudáveis foi obtido por punção venosa, sendo 20 mL colocados em tubos estéreis contendo 200µL de heparina (Liquemine-Roche). As células mononucleares foram obtidas por meio da separação em gradiente de Ficoll-Hypaque. O anel rico em linfócitos e monócitos foi coletado e lavado por 10 minutos a 200g com meio de cultura RPMI por 2 vezes. Em seguida, a suspensão celular foi ressuspensa em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, N. Y.) suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co, ST Louis, MO, USA), 40 µg/mL de gentamicina e 10% de soro autólogo inativado (Meio de Cultura de Células Completo: MCCC), sendo a identificação e viabilidade dos monócitos realizada através da incorporação pelo vermelho neutro (alíquotas de 50 µL da suspensão celular foram incubadas a 37°C durante 10 minutos com 0,45 mL da solução do corante a 0,02%). A seguir, a concentração foi ajustada para 2×10^6 monócitos/mL, com posterior plaqueamento da suspensão celular (100µL/orifício) em placas de microcultura de fundo chato com 96 orifícios. Após uma hora de incubação a 37°C em tensão de 5% de CO₂, as células não aderentes foram eliminadas através de lavagem das placas com meio de cultura RPMI.

As células foram então incubadas durante 18 horas, em tensão de 5% de CO₂ à 37°C, na presença de 100µL de MCCC, MCCC + IFN-γ ou TNF-α ou GM-CSF recombinante humano (R&D Systems) em diferentes concentrações (50, 250, 500 e 1000 U/mL), no caso dos experimentos de padronização e avaliadas quanto a atividade fungicida e produção de H₂O₂ em resposta a duas cepas de *P. brasiliensis*.

Após a escolha da concentração ideal das citocinas foram realizados os experimentos para testar o efeito dos leucotrienos sobre a atividade dos monócitos em resposta as duas cepas do *P. brasiliensis*. Os experimentos foram realizados incubando as células durante 18 horas, em tensão de 5% de CO₂ à 37°C, na presença de 100µL de MCCC,

MCCC + IFN- γ (50U/mL) , MCCC + IFN- γ (50U/mL) + MK886 10 μ M/ml ou 20 μ M/ml, MCCC + TNF- α (50U/mL), MCCC + TNF- α (50U/mL) + MK886 10 μ M/mL ou 20 μ M/mL, MCCC + GM-CSF (500U/mL) ou MCCC + GM-CSF(500U/mL) + MK886 10 μ M/mL ou 20 μ M/mL com posterior avaliação da atividade fungicida , produção de H₂O₂ e NO e coleta dos sobrenadantes para avaliação das citocinas .

3.3. Cultivo do *P. brasiliensis*

Foram utilizadas as cepas 18 e 265 de *P. brasiliensis* (18 e 265) mantida em nosso laboratório através de cultivo em meio GPY, contendo 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.

3.4. Teste de Viabilidade e Obtenção da suspensão de *P. brasiliensis*

As células leveduriformes foram removidas da superfície de cultivo com auxílio de alça de platina e transferidas para tubos estéreis contendo pérolas de vidro de 4mm de diâmetro 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, uma vez que as células mortas apresentam-se com coloração escura. A viabilidade da suspensão utilizada foi maior ou igual a 90%.

As concentrações das suspensões fúngicas utilizadas nos ensaios foram de 4x10⁴ fungos viáveis/mL (4x10³ fungos/orifício), estabelecendo uma relação fungo/monócito de 1:50 para microcultura, e 2x10⁴ fungos viáveis/mL para macrocultura (2x10⁴ fungos/orifício).

3.5. Avaliação da Atividade Fungicida

Após o período de 18 horas de incubação com os diferentes estímulos descritos no item 5.2, os sobrenadantes das culturas foram retirados e os monócitos desafiados com 0,1mL de suspensão de *P. brasiliensis*, contendo 4x10⁴ fungos/mL diluídos em RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma), 40 μ g/mL de gentamicina e 10% de soro autólogo fresco. Alguns orifícios da placa de cultura receberam apenas as suspensões do fungo, em concentrações equivalentes às utilizadas na incubação com as monocamadas de monócitos sendo consideradas como culturas controles.

Após um período de 4 horas, os sobrenadantes das coculturas foram coletados, e as monocamadas de monócitos submetidas a diversas lavagens com água destilada. Este processo permitiu que os monócitos fossem removidos da placa, lisados, com conseqüente liberação dos fungos que foram fagocitados. As suspensões obtidas através desse processo foram adicionadas aos sobrenadantes já coletados e foram consideradas como culturas experimentais. O mesmo procedimento foi realizado com as culturas controles, contendo apenas o fungo.

Ao final do processo, o material obtido, a partir das lavagens com água destilada, das culturas controles e das culturas experimentais resultou em um volume de 2mL. Essas suspensões, contendo fungos viáveis ou não, foram homogeneizadas em agitador de tubos tipo Vortex por 20 segundos, seguida de plaqueamento em triplicatas de 100 µL das suspensões 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), cultivadas em meio GPY a 37°C e com agitação (140 rpm) durante 7 dias. A atividade fungicida foi detectada através da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) após 10 dias de semeadura e calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Atividade Fungicida} = 1 - \left[\frac{\text{média das UFC das culturas experimentais}}{\text{média das UFC das culturas controles}} \right] \times 100$$

3.6. Determinação da Produção de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

A produção de H₂O₂ foi determinada segundo o método descrito por PICK & KEISARI (1980), e adaptado por PICK & MIZEL (1981).

Após o período de 18 horas de incubação com os diferentes estímulos descritos no item 5.2, os sobrenadantes das coculturas foram retirados e aos monócitos aderidos foram desafiados com 0,1mL de suspensão de *P. brasiliensis* (18 ou 265), contendo 4x10⁴ fungos/mL diluídos em solução vermelho fenol contendo 140mM de NaCl; 10mM de tampão fosfato pH 7; 5,5mM de dextrose; 0,56mM de vermelho fenol; 0,01 mg/mL de peroxidase de raiz forte tipo II (Sigma Chemical Co, ST Louis, MO, USA), contendo 10% de soro autólogo fresco. Após 4 horas, a reação foi interrompida pela adição de 0,01 ml de NaOH 1N. As amostras foram testadas em triplicatas de cada grupo. A absorbância foi determinada em leitor automático de ELISA, com filtro de 620nm, contra um blank constituído de solução vermelho fenol e NaOH a 1N. Os resultados da dosagem de H₂O₂ foram expressos em nanomoles de H₂O₂/2x10⁵ células, a partir de curva-padrão estabelecida em cada ensaio,

constituída de concentrações molares conhecidas de H_2O_2 em tampão vermelho fenol. Em nossas condições experimentais a curva foi realizada com concentrações de 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 e 8.0 nM de H_2O_2 .

3.7. Determinação da liberação de Óxido Nítrico (NO)

O óxido nítrico (NO) decompõe-se espontaneamente em nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^-) no meio de cultura. A produção de NO_2^- por monócitos humanos, incubados durante 18 horas, em tensão de 5% de CO_2 à 37°C, na presença, ou não, de IFN- γ , TNF- α ou GM-CSF recombinante humano (R&D Systems) e/ou MK-886 (Sigma) e desafiados por 4 horas com cepa de alta (Pb18) ou de baixa (Pb265) virulência do *P. brasiliensis*, foi dosado pelo método colorimétrico baseado na Reação de Griess (GREEN, 1981). Aos sobrenadantes obtidos das culturas de monócitos humanos (conforme item 3.2), foi adicionado o mesmo volume (100 μl) do reagente de Griess, que contém NEED 0,1% (N-(1Naphthyl)ethyl-enediamine – Sigma Co. USA) diluído em água destilada, e sulfanilamida 1% (Sigma Co. USA) diluída em H_3PO_4 5%, misturados em volumes iguais no momento da reação. As amostras (triplicatas) foram lidas em leitor automático de ELISA, com filtro de 540 nm, contra um branco constituído por reagente de Griess. Os resultados foram expressos em micromoles de NO/ 2×10^5 células, a partir de curva padrão estabelecida em cada ensaio, constituída com concentrações molares conhecidas de NO_2 variando de 200 a 1,56 μM .

3.8. Obtenção de sobrenadantes de cultura de monócitos para dosagem de TNF- α e IL-10

Monócitos de indivíduos saudáveis, na concentração de 1×10^6 células/mL, foram colocados em placas de macrocultura com 24 orifícios (1mL/orifício) e submetidos a pré-incubação com IFN- γ , TNF- α e GM-CSF recombinante humano (R&D Systems) e/ou MK886 (Sigma), durante 18 horas em tensão de 5% de CO_2 à 37°C. Após esse período, os sobrenadantes das culturas foram retirados e os monócitos foram desafiados com células leveduriformes de *P. brasiliensis* na proporção de 50 monócitos para uma célula fúngica preparados em de solução RPMI 1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, N. Y.) suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co, ST Louis, MO, USA), 40 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina e 10% de soro autólogo fresco (2×10^4 leveduras/mL). Após 4 horas de incubação, os sobrenadantes foram coletados, centrifugados a 400g e, as alíquotas desse material conservadas a -70°C até o momento de sua utilização para a dosagem de TNF- α , IL-10.

3.9. Determinação da produção de TNF- α e IL-10

As placas de 96 orifícios e fundo plano (Maxsorb-Nunc Life Tech. Inc., MD, USA) foram sensibilizadas por 18h a 5°C com anticorpo monoclonal de camundongo anti-TNF- α ou anti-IL10 humano (R&D Systems), diluído em PBS, pH 7.2, na concentração de 2 μ g/mL. Após esse período, os orifícios foram lavados 3 vezes com 300 μ L de PBS, pH 7.2, contendo Tween 20 a 0,05% (PBST). O bloqueio da placa foi realizado colocando-se em cada orifício 300 μ L de PBS contendo 5% sacarose, 0.5% de Tween 20, 1% de soro albumina bovina (BSA) e 0,005% de NaN₃ (azida sódica) e incubada à temperatura ambiente, por 2 horas. Em seguida, a placa foi lavada conforme descrito acima e em alguns orifícios da placa foi adicionado 100 μ L de TNF- α ou IL-10 recombinante humano (R&D Systems) diluído de forma seriada em concentrações variando de 30 a 2000pg/mL para obtenção de curva padrão; e nos orifícios restantes foram colocados 100 μ L dos sobrenadantes gerados conforme descrito no item 4.9. Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente, foram retiradas as amostras, realizada nova lavagem da placa e adicionado o anticorpo revelador policlonal de cabra anti-TNF- α ou IL-10 humano conjugado com biotina (R&D Systems), na concentração de 100ng/mL, seguindo-se incubação por 2 horas à temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente com PBST e adicionado, 100 μ L de avidina conjugada com peroxidase (Sigma) diluída em PBS contendo 0,1% de BSA na concentração de 1:10.000, por 30 minutos à 37°C. Em seguida, foram adicionados 100 μ L do substrato enzimático, constituído por 12,5mL de tampão citrato-fosfato 0,1M, pH5.0 contendo 1mg/mL do revelador ortofenilenodiamina (Sigma) e 10 μ L de H₂O₂ a 30% (Sigma). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos, a reação foi bloqueada pela adição de 50 μ L de ácido sulfúrico 2M e a leitura da placa realizada em leitor de ELISA (Multiskan EFLAB, Helsinki, Finland) com comprimento de onda de 450 nm. Os níveis de TNF- α ou IL-10 nos sobrenadantes de culturas de monócitos foram calculados utilizando-se a curva padrão.

3.10. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software Graphpad Instat San Diego, California – USA. 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% ($p < 0,05$)

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Padronização da concentração de IFN- γ ideal para o processo de ativação de monócitos para aumento da atividade fungicida da liberação de H₂O₂.

Os resultados relativos a esses ensaio podem ser visualizados na figura 1 e 2.

Com relação à atividade fungicida (Fig.1), detectamos que monócitos não ativados e desafiados com a cepa 18 desenvolvem baixas porcentagens, que aumentam após o processo de ativação com IFN- γ sendo a dose de 50U/mL a que induziu os maiores resultados. O mesmo perfil de resposta foi detectado para a cepa 265. No entanto, as porcentagens de atividade fungicida detectadas em todas as coculturas foram sempre maiores do que as detectadas para a cepa 18, apesar das diferenças não apresentarem significância estatística em todos os tratamentos.

Nos ensaios de liberação de H₂O₂ (Fig. 2), monócitos incubados somente com MCCC liberaram níveis substanciais que, no entanto, aumentaram após a ativação com IFN- γ principalmente na concentração de 50 U/mL (dados estatisticamente significativos). Após o desafio com a cepa 18, tanto monócitos não ativados como submetidos à ativação liberaram níveis significativamente menores do metabólito, quando comparados aos liberados pelas culturas não desafiadas. No entanto, quando analisamos os resultados obtidos após o desafio, detectamos diferenças importantes entre as células ativadas e não ativadas com a manutenção dos níveis maiores do metabólito após a ativação com IFN- γ na concentração de 50U/mL. Semelhante ao detectado no ensaio de atividade fungicida, a cepa 265 induziu o mesmo perfil de resposta detectado para a cepa 18. No entanto, as porcentagens detectadas em todas as coculturas foram sempre maiores do que as detectadas para a cepa 18, apesar das diferenças não apresentarem significância estatística em todos os tratamentos.

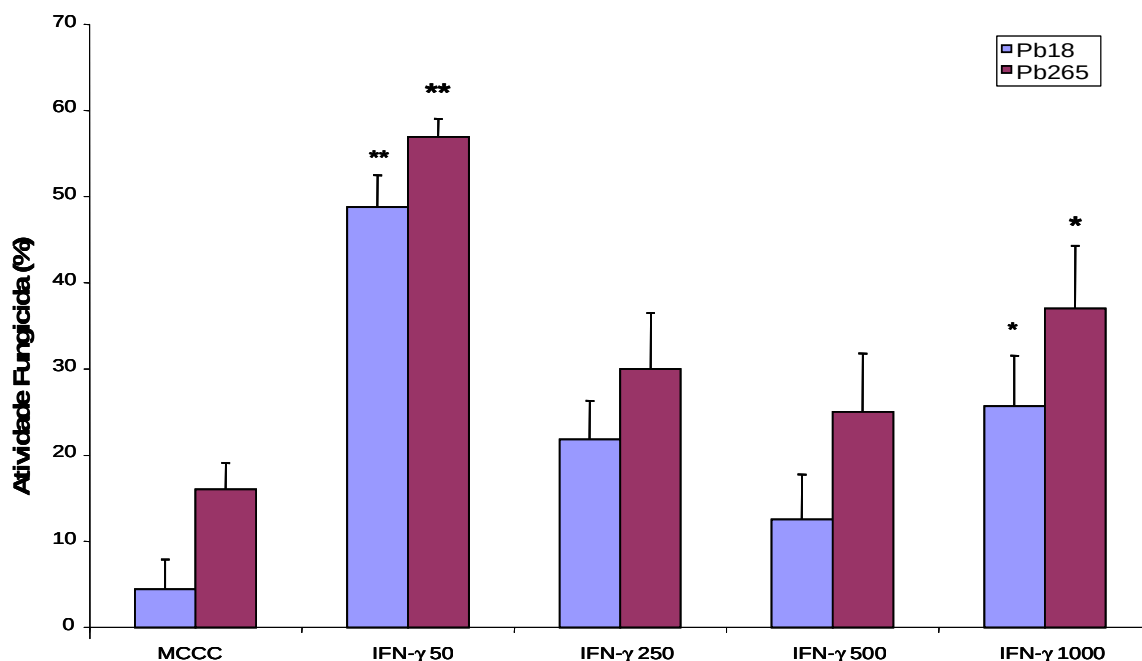


FIG.1 Atividade fungicida de monócitos humanos pré-incubados somente com MCCC ou diferentes concentrações de IFN- γ (50, 250, 500 e 1000U/mL) e desafiados com as cepas 18 ou 265 de *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão. Análise estatística: Teste de Tukey

MCCC = Meio de Cultura Completo

* $p < 0.05$ x MCCC ** $p < 0.01$ x MCCC

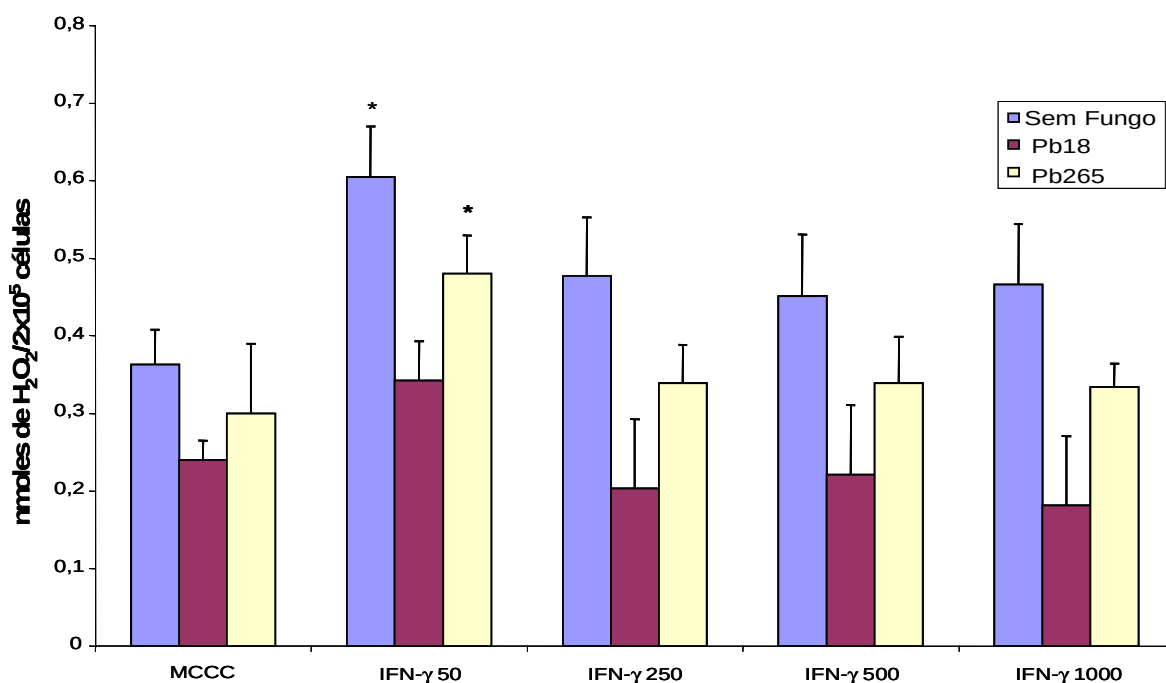


FIG.2 Produção de H_2O_2 por monócitos humanos pré-incubados somente com MCCC ou diferentes concentrações de IFN- γ (50, 250, 500 e 1000U/mL) e desafiados com as cepas 18 ou 265 de *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão. Análise estatística: Teste de Tukey

MCCC = Meio de Cultura Completo

* $p < 0.05$ x MCCC

4.2. Padronização da concentração de TNF- α ideal no processo de ativação de monócitos para aumento da atividade fungicida da liberação de H₂O₂.

Os resultados referentes a esses ensaios podem ser analisados na figura 3 e 4.

Quanto à atividade fungicida (Fig.3), detectamos que as células desafiadas com ambas as cepas apresentaram um aumento após a ativação com TNF- α . No entanto, esse aumento só foi estatisticamente significativo na concentração de 50U/mL. Novamente, a atividade fungicida mostrou-se maior quando as células foram desafiadas com a cepa 265 (dados significativos estatisticamente somente para a dose de 50U/mL).

Com relação à produção de H₂O₂ (Fig. 4), detectamos que monócitos ativados com TNF- α , apresentaram aumento significativo na produção do metabólito somente na dose de 50U/mL (monócitos não desafiados e monócitos desafiados com as cepas 18 e 265) e de 250U/mL (somente monócitos não desafiados com fungo). De forma semelhante ao IFN- γ , o aumento dos níveis de H₂O₂ foram maiores em células desafiadas com a cepa 265, exceto no caso da dose de 500U/mL, com a qual os níveis produzidos por monócitos desafiados com as cepas 18 e 265 foram semelhantes. Novamente os níveis detectados pelas células desafiadas foram menores em relação às células não desafiadas, sendo esse processo mais pronunciado após o desafio com a cepa 18 (dados significativos estatisticamente somente para a dose de 50U/mL).

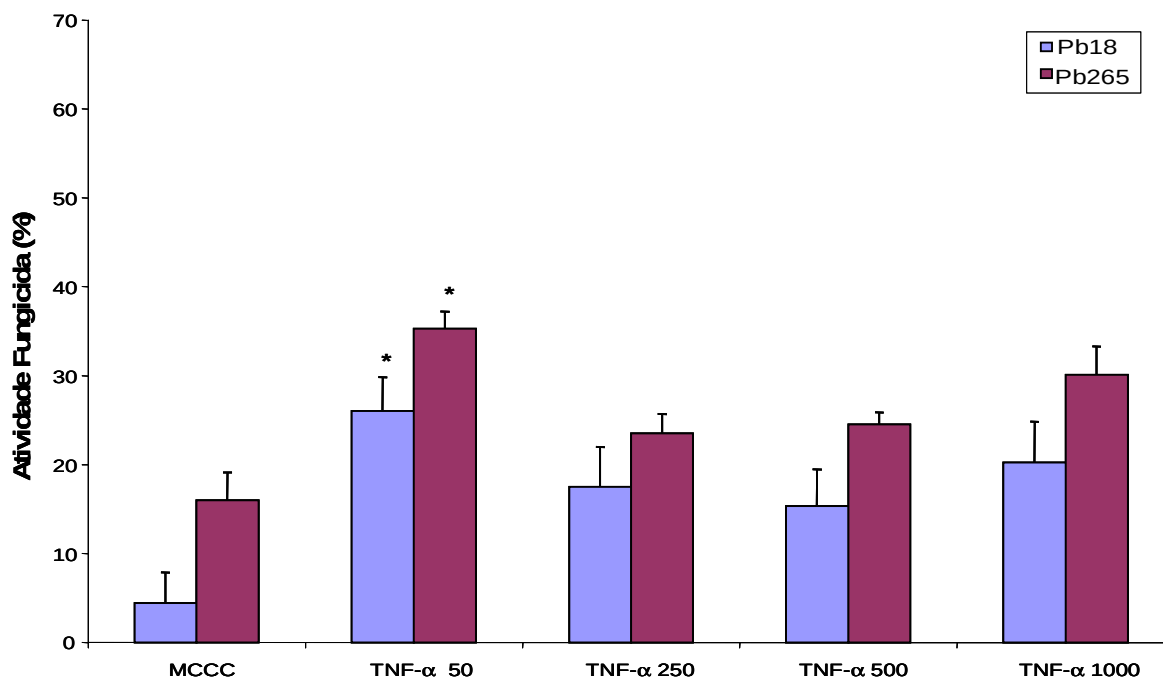


FIG.3 Atividade fungicida de monócitos humanos pré-incubados somente com MCCC ou diferentes concentrações de TNF- α (50, 250, 500 e 1000U/mL) e desafiados com as cepas 18 ou 265 de *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão. Análise estatística: Teste de Tukey

MCCC = Meio de Cultura Completo

* $p < 0.05$ x MCCC

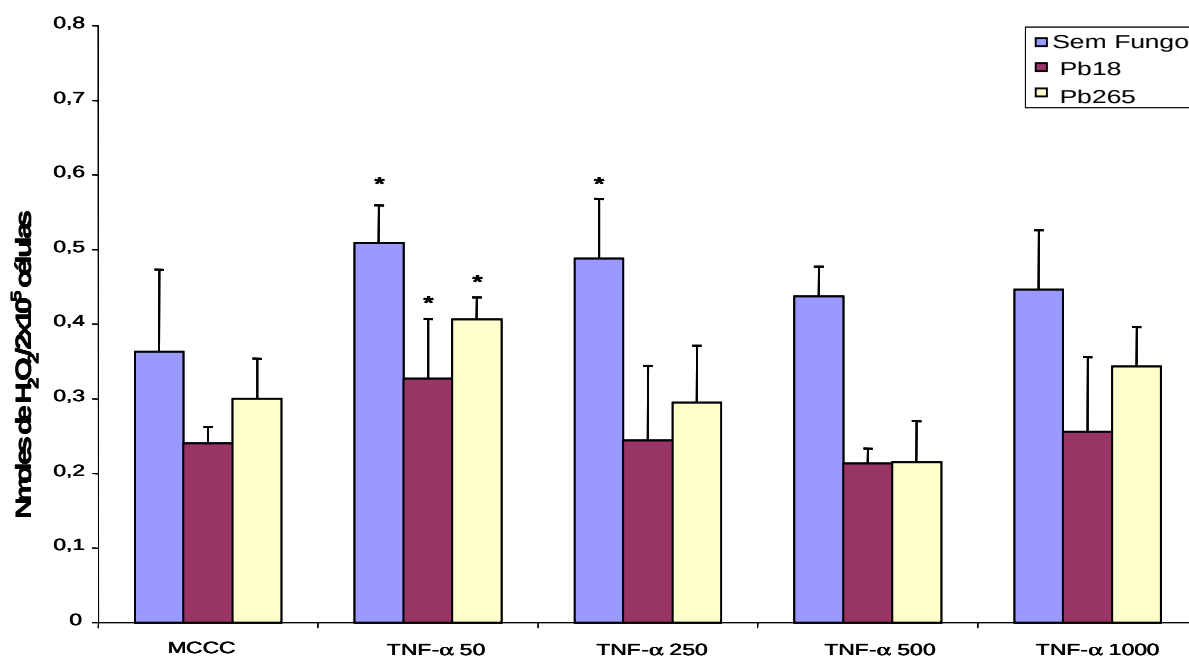


FIG.4 Produção de H_2O_2 por monócitos humanos pré-incubados somente com MCCC ou diferentes concentrações de TNF- α (50, 250, 500 e 1000U/mL) e desafiados com as cepas 18 ou 265 de *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão. Análise estatística: Teste de Tukey

MCCC = Meio de Cultura Completo

* $p < 0.05$ x MCCC

4.3. Padronização da concentração de GM-CSF ideal no processo de ativação de monócitos para aumento da atividade fungicida

Os resultados podem ser analisados na figura 5 e 6.

Observamos um aumento significativo da atividade fungicida (Fig.5) após o processo de ativação das células desafiadas com ambas as cepas. Novamente ocorreu uma maior atividade fungicida contra a cepa 265. Em relação a essa citocina a dose que se apresentou com uma diferença estatisticamente significante foi a de 500U/mL.

Quanto à liberação de H_2O_2 (Fig. 6), de forma semelhante ao ocorrido para as outras citocinas, um aumento significativo da produção do metabólito foi detectado após a ativação com a citocina (principalmente na dose de 500U/mL). O perfil de resposta de monócitos não desafiados e desafiados com as duas cepas se manteve, sendo maior a produção de H_2O_2 em monócitos não desafiados e menor em monócitos desafiados com a cepa 18.

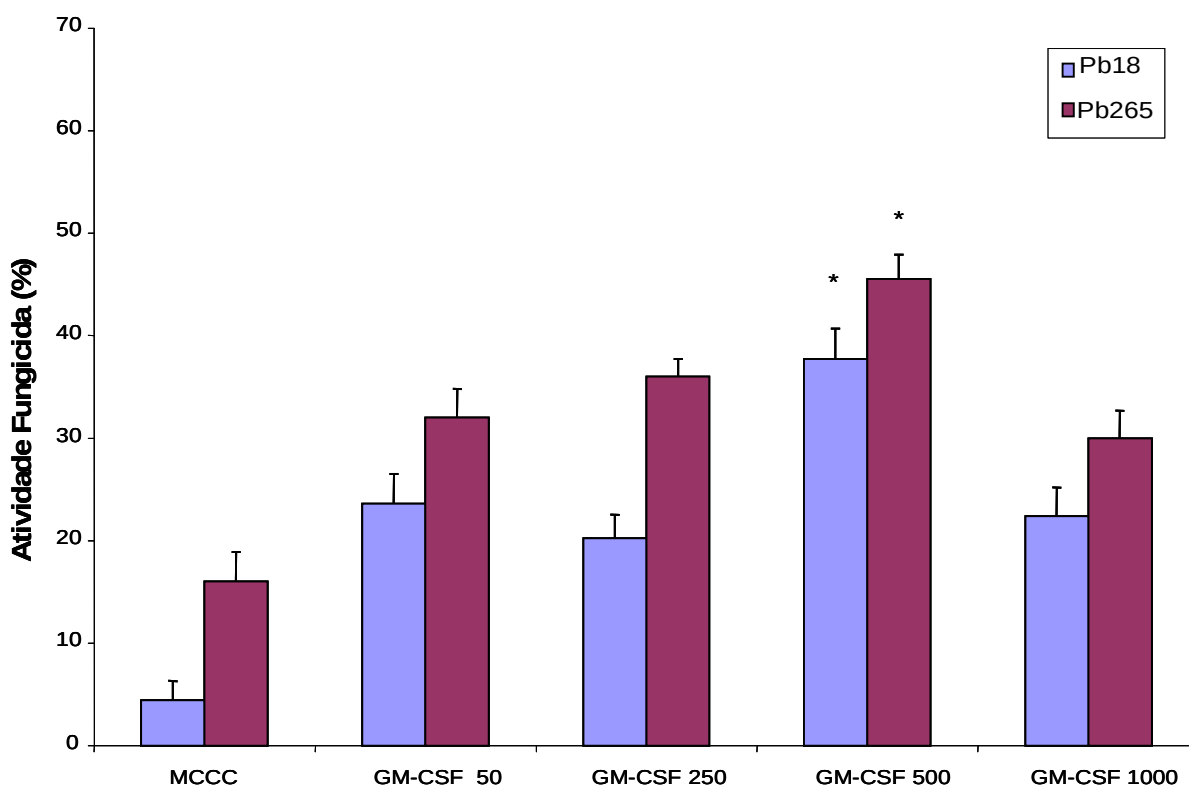


FIG.5 Atividade fungicida de monócitos humanos pré-incubados somente com MCCC ou diferentes concentrações de GM-CSF (50, 250, 500 e 1000 U/mL) e desafiados com as cepas 18 ou 265 de *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão. Análise estatística: Teste de Tukey

MCCC = Meio de Cultura Completo

* $p < 0.05$ x MCCC

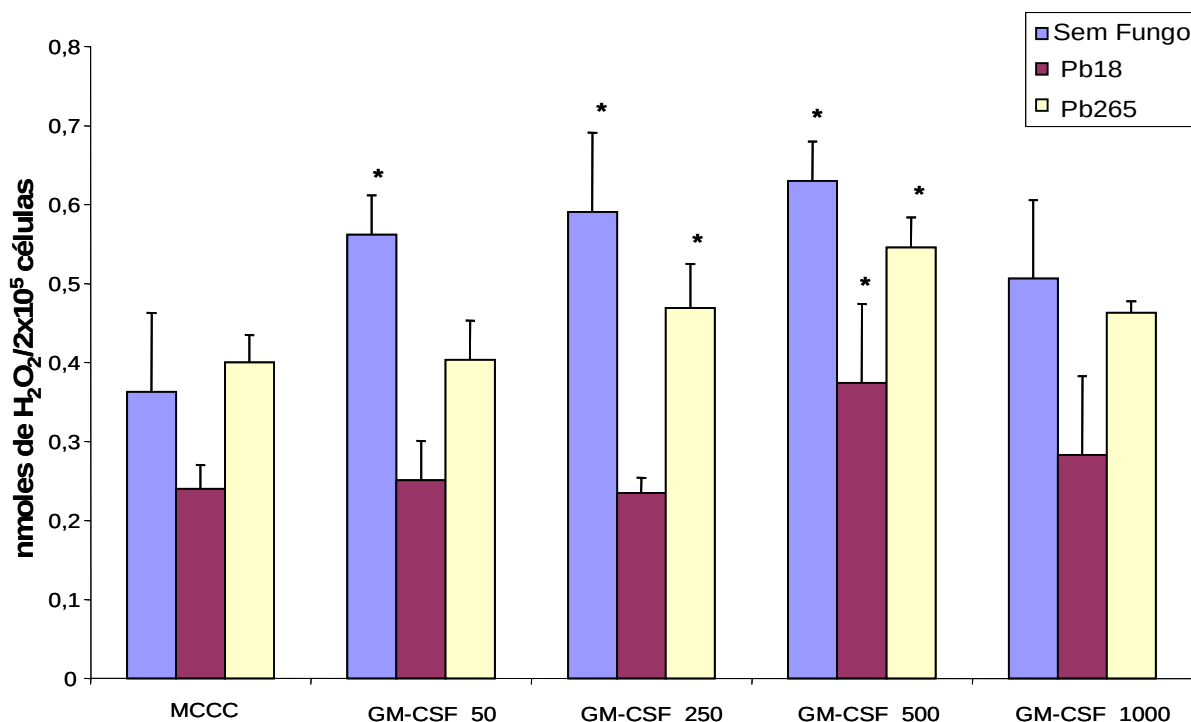


Fig.6 Produção de H_2O_2 de monócitos humanos pré-incubados somente com MCCC ou diferentes concentrações de GM-CSF (50, 250, 500 e 1000 U/mL) e desafiados com as cepas 18 ou 265 de *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão. Análise estatística: Teste de Tukey

MCCC = Meio de Cultura Completo

* $p < 0.05$ x MCCC

A análise dos resultados relativos a fase de padronização das concentrações das citocinas confirma resultados anteriores de nosso laboratório mostrando a capacidade das 3 citocinas ativarem monócitos humanos, de forma dose dependente, para o desenvolvimento de atividade fungicida. No entanto, os resultados deixam claro que a melhor concentração pode variar em relação ao lote de citocina utilizado, o que justifica a realização de ensaios de padronização a cada projeto que inclua a utilização de lotes novos. Os resultados também confirmam que a melhor concentração obtida nos ensaios de H_2O_2 deva ser coincidente ou próxima aquela detectada na atividade fungicida, uma vez que a mesma é dependente da atuação desse metabólito. Assim, as doses escolhidas para o desenvolvimento dos objetivos do projeto propriamente ditos foram : 50U/mL para IFN- γ e TNF- α e 500U/mL para o GM-CSF.

4.4. Efeito de leucotrienos sobre a atividade fungicida de monócitos humanos ativados ou não com IFN- γ , TNF- α ou GM-CSF e desafiados com cepa de alta ou baixa virulência do *P.brasiliensis*

Os resultados para as 3 citocinas foram obtidos em ensaios realizados concomitantemente com as mesmas células. Assim, os valores para culturas não ativadas são semelhantes nas 3 figuras (figs 7 a 9).

As doses de 10 e 20 μ M/mL para o MK-886 foram escolhidas após a realização de testes usando apenas monócitos não ativados tratados com as doses de 1, 5, 10, 20 μ M/mL de MK-886 e desafiados com as duas cepas da fungo. Nesses testes, detectamos que as doses de 10 e 20 μ M/mL foram as que induziram uma maior diminuição na produção do metabólito.

Os resultados mostraram, como esperado, que monócitos não ativados apresentam atividade fungicida mais baixa em relação àqueles que sofreram ativação e que, independentemente do estímulo, monócitos desafiados com a cepa 265 desenvolvem atividade fungicida maior que os desafiados com a cepa 18.

Quando analisamos os resultados obtidos após a incubação com MK886, principalmente na dose de 20 μ M/mL, detectamos a indução de uma menor atividade fungicida, tanto em células ativadas com IFN- γ (figura 7), TNF- α (figura 8), ou GM-CSF (figura 9), quanto em células não ativadas, mostrando um possível efeito estimulatório dos leucotrienos sobre a atividade fungicida de monócitos humanos.

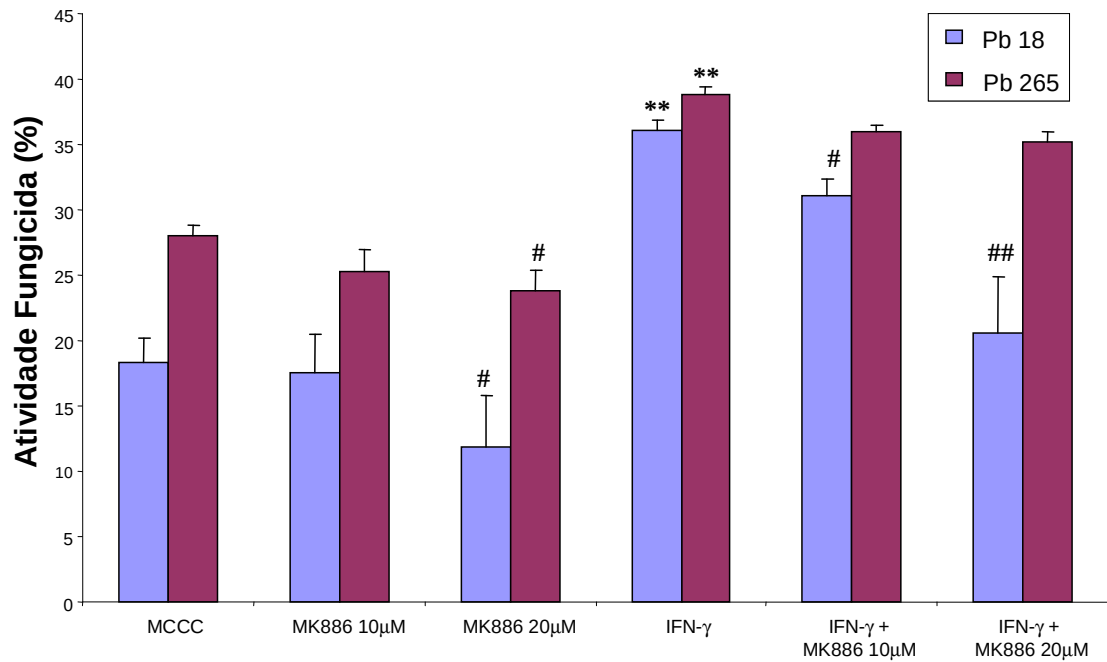


FIG-7. Atividade fungicida de monócitos humanos pré-incubados com MCCC, MK886 (10 ou 20 mM), IFN- γ (50U/ml) ou IFN- γ (50U/ml) + MK886 (10 ou 20 μ M) e desafiados com *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão. Análise estatística: Teste de Tukey.

MCCC = Meio de cultura celular completo

** $p < 0,01$ X MCCC

$p < 0,05$ X sem MK886

$p < 0,01$ X sem MK886

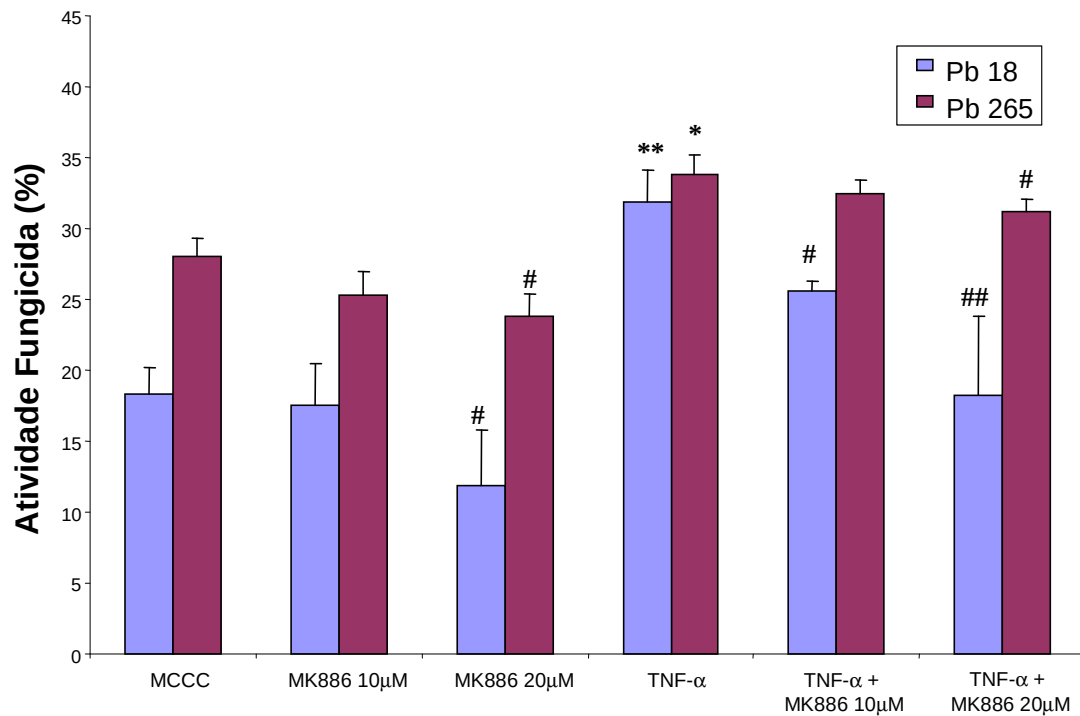


FIG-8. Atividade fungicida de monócitos humanos pré-incubados com MCCC, MK886 (10 ou 20 mM), TNF- α (50U/ml) ou TNF- α (50U/ml) + MK886 (10 ou 20 μ M) e desafiados com *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão. Análise estatística: Teste de Tukey.

MCCC = Meio de cultura celular completo

* $p < 0,05$ X MCCC

$p < 0,05$ X sem MK886

** $p < 0,01$ X MCCC

$p < 0,01$ X sem MK886

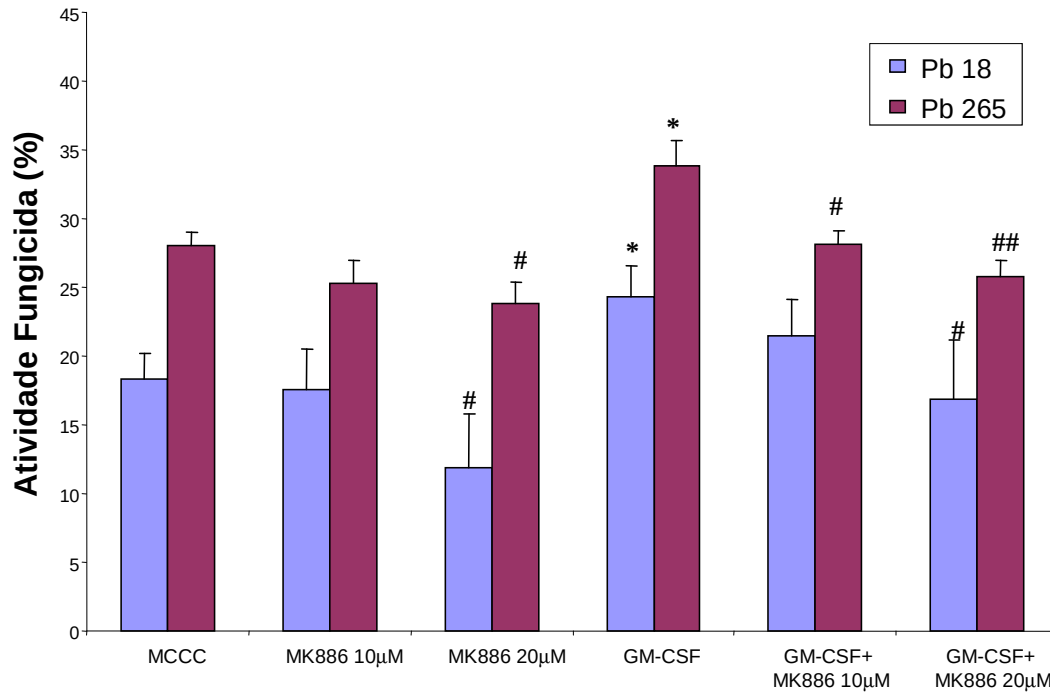


FIG-9. Atividade fungicida de monócitos humanos pré-incubados com MCCC, MK-886 (10 ou 20 mM), GM-CSF (50U/ml) ou GM-CSF (50U/ml) + MK886 (10 ou 20 µM) e desafiados com *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão. Análise estatística: Teste de Tukey.

MCCC = Meio de cultura celular completo

* $p < 0,05$ X MCCC

** $p < 0,01$ X MCCC

$p < 0,05$ X sem MK886

$p < 0,01$ X sem MK886

4.5. Efeito de leucotrienos sobre a liberação de H₂O₂ por monócitos humanos ativados ou não com IFN- γ , TNF- α ou GM-CSF e desafiados com cepa de alta ou baixa virulência do *P.brasiliensis*

De forma semelhante aos ensaios de atividade fungicida, os resultados para as 3 citocinas foram obtidos em ensaios realizados concomitantemente com as mesmas células. Assim, os valores para culturas não ativadas são semelhantes nas 3 figuras (figs 10, 11 e 12 para IFN- γ , TNF- α e GM-CSF, respectivamente). A análise das figuras 10 a 12 revela, como observado nos experimentos de padronização, que monócitos não tratados e não desafiados liberam níveis baixos de H₂O₂ que, aumentam após a ativação.

Detectamos também que em todas as culturas, níveis menores do metabólito foram liberados após o desafio com o fungo quando comparadas às respectivas culturas não desafiadas. Quando analisamos isoladamente os resultados obtidos após o desafio, verificamos aumentos significativos do metabólito após a ativação com as 3 citocinas. Além disso, culturas desafiadas com Pb18 apresentam níveis mais baixos de H₂O₂ com relação àquelas desafiadas com Pb 265.

Com relação ao tratamento com MK-886, todas as culturas tratadas, independentemente do estímulo, liberaram níveis mais baixos de H₂O₂, principalmente na dose de 20 μ M/mL, quando comparadas às não tratadas, mostrando um possível efeito estimulatório dos leucotrienos sobre a produção do mediador.

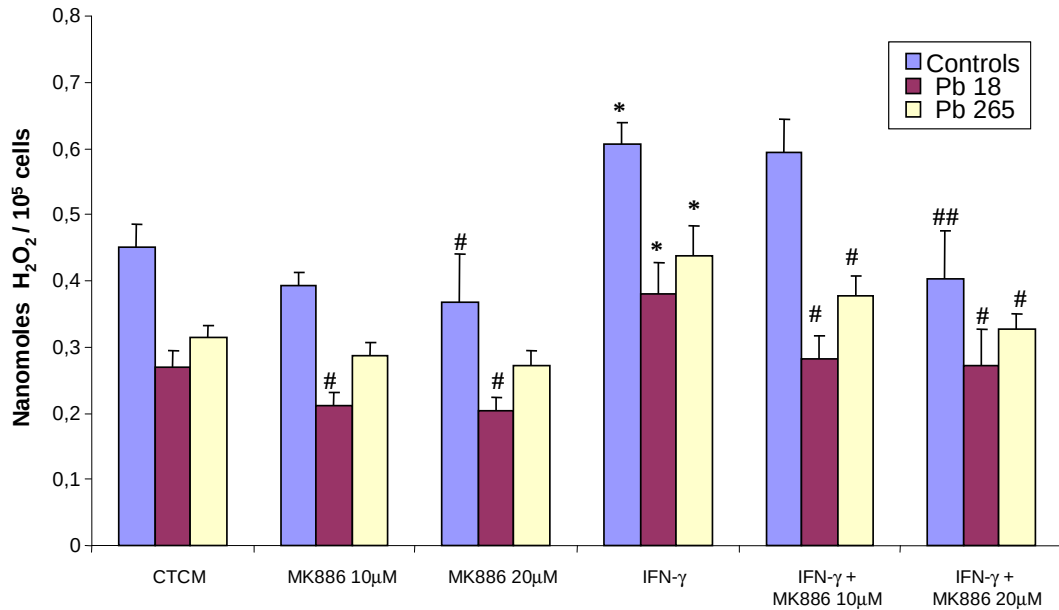


FIG-10. Liberação de H_2O_2 por monócitos humanos pré-incubados com MCCC, MK-886 (10 ou 20 mM), $IFN-\gamma$ (50U/ml) ou $IFN-\gamma$ (50U/ml) + MK886 (10 ou 20 μ M) e desafiados com *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão. Análise estatística: Teste de Tukey.

MCCC = Meio de cultura celular completo

** $p < 0,01$ X MCCC

$p < 0,05$ X sem MK886

$p < 0,01$ X sem MK886

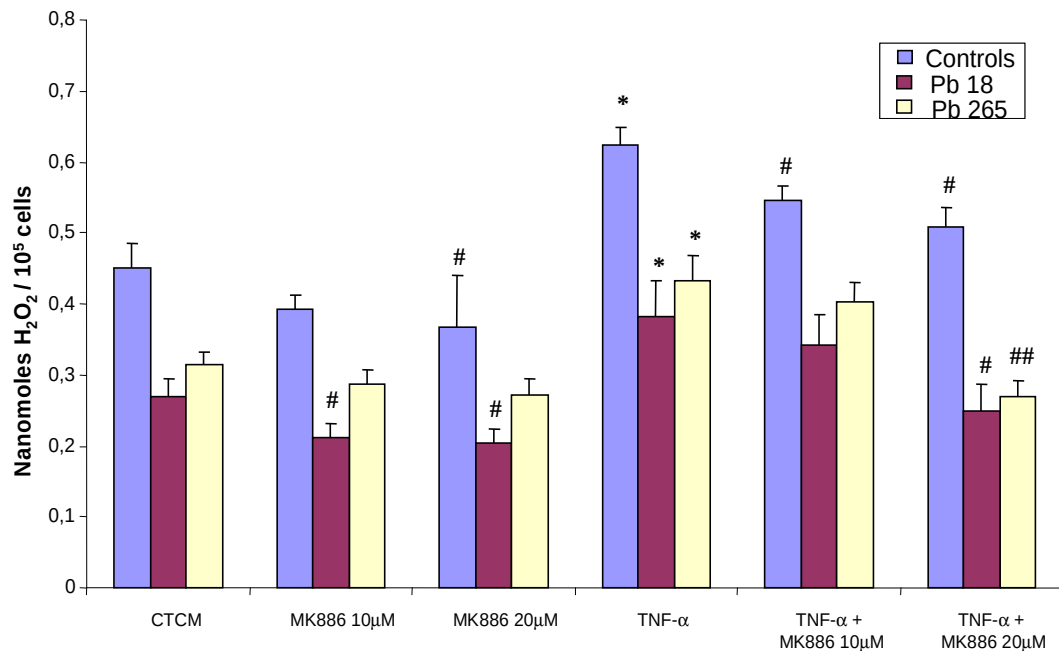


FIG-11. Liberação de H_2O_2 por monócitos humanos pré-incubados com MCCC, MK-886 (10 ou 20 mM), $TNF-\alpha$ (50U/ml) ou $TNF-\alpha$ (50U/ml) + MK886 (10 ou 20 μ M) e desafiados com *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão. Análise estatística: Teste de Tukey.

MCCC = Meio de cultura celular completo

* $p < 0,05$ X MCCC

$p < 0,05$ X sem MK886

$p < 0,01$ X sem MK886

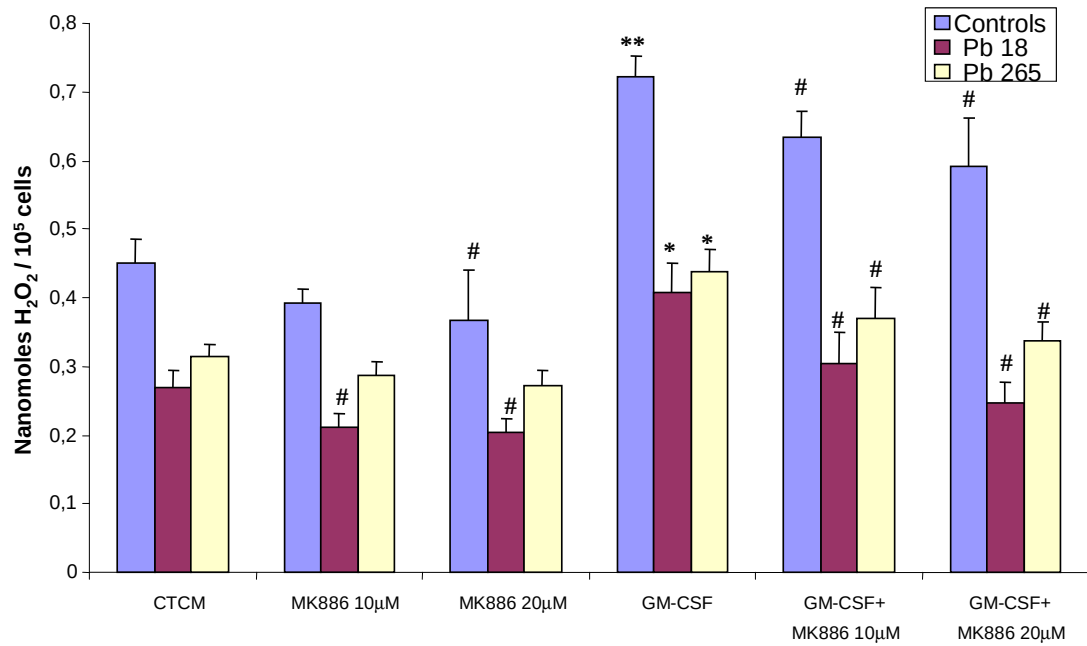


FIG-12. Liberação de H_2O_2 por monócitos humanos pré-incubados com MCCC, MK-886 (10 ou 20 mM), GM-CSF (50U/ml) ou GM-CSF (50U/ml) + MK886 (10 ou 20 μ M) e desafiados com *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão. Análise estatística: Teste de Tukey.

MCCC = Meio de cultura celular completo

* $p < 0,05$ X MCCC

$p < 0,05$ X sem MK886

** $p < 0,01$ X MCCC

4.6. Efeito de leucotrienos sobre a liberação de NO por monócitos humanos ativados ou não com IFN- γ , TNF- α ou GM-CSF e desafiados com cepa de alta ou baixa virulência do *P.brasiliensis*

Os resultados relativos aos ensaios podem ser visualizados nas figuras 13 a 15.

Como relatado para os ensaios anteriores, os resultados para as culturas sem ativação são semelhantes nas 3 figuras.

De uma forma geral, detectamos baixos níveis de NO quando comparados aos obtidos em nosso laboratório em estudos anteriores (1 a 2,5 μM / 10^5 células). Apesar dos baixos níveis, células não ativadas e não desafiadas liberaram níveis maiores do metabólito após a ativação com as 3 citocinas. Quando analisamos isoladamente os resultados obtidos após o desafio, verificamos um aumento na produção do metabólito após a ativação com as citocinas, principalmente com TNF- α e GM-CSF. Foi observado também que em todas as culturas, níveis menores foram liberados após o desafio com o fungo quando comparadas às respectivas culturas não desafiadas. Além disso, culturas desafiadas com Pb18 apresentam níveis mais baixos de NO com relação àquelas desafiadas com Pb 265.

Em adição, detectamos que após o tratamento com MK-886 os níveis de NO apenas tenderam a diminuir em todas as culturas, uma vez que não foram obtidos resultados estatisticamente significativos.

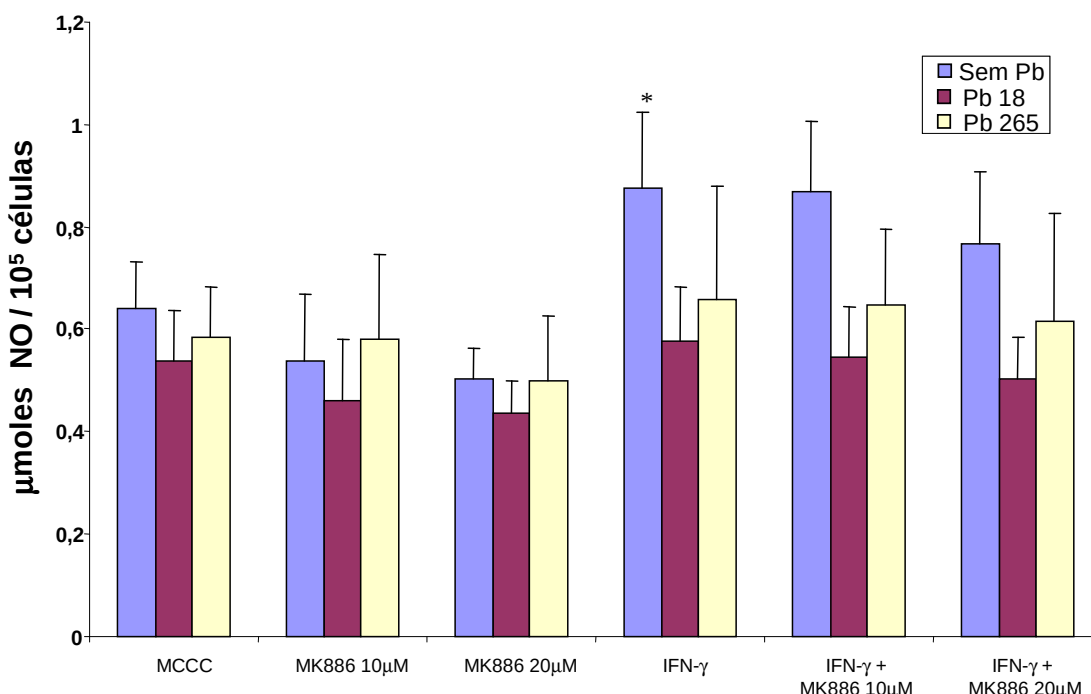


FIG-13. Liberação de NO por monócitos humanos pré-incubados com MCCC, MK-886 (10 ou 20 mM), IFN- γ (50U/ml) ou IFN- γ (50U/ml) + MK886 (10 ou 20 μM) e desafiados com *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão. Análise estatística: Teste de Tukey.

MCCC = Meio de cultura celular completo

* $p < 0,05$ X MCCC

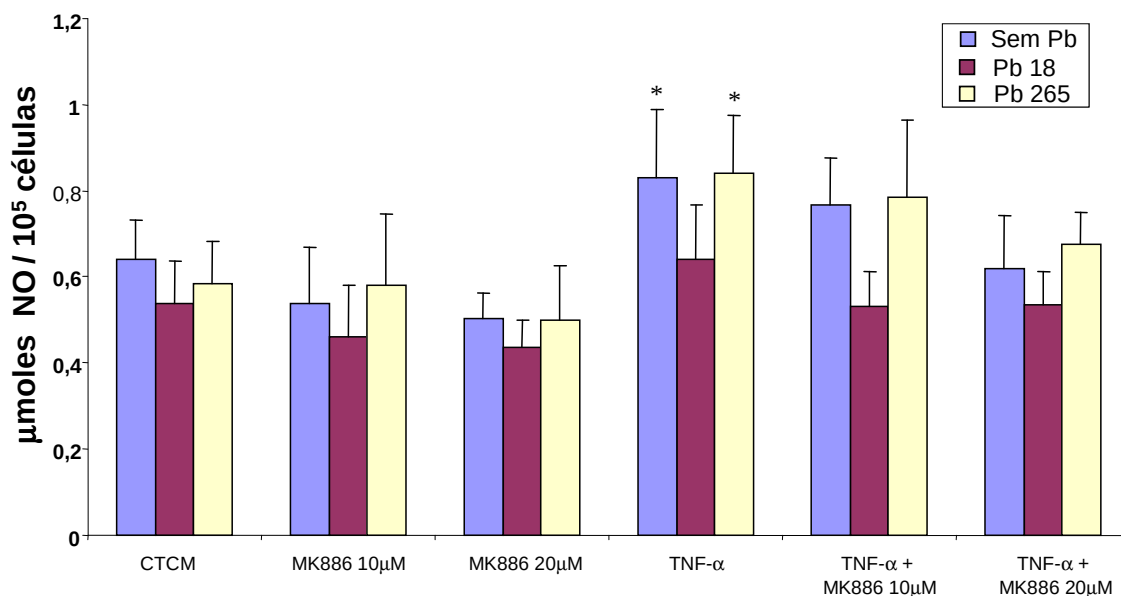


FIG-14. Liberação de NO por monócitos humanos pré-incubados com MCCC, MK-886 (10 ou 20 mM), TNF-α (50U/ml) ou TNF-α (50U/ml) + MK886 (10 ou 20 μM) e desafiados com *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em média ± erro padrão. Análise estatística: Teste de Tukey.

MCCC = Meio de cultura celular completo

* p < 0,05 X MCCC

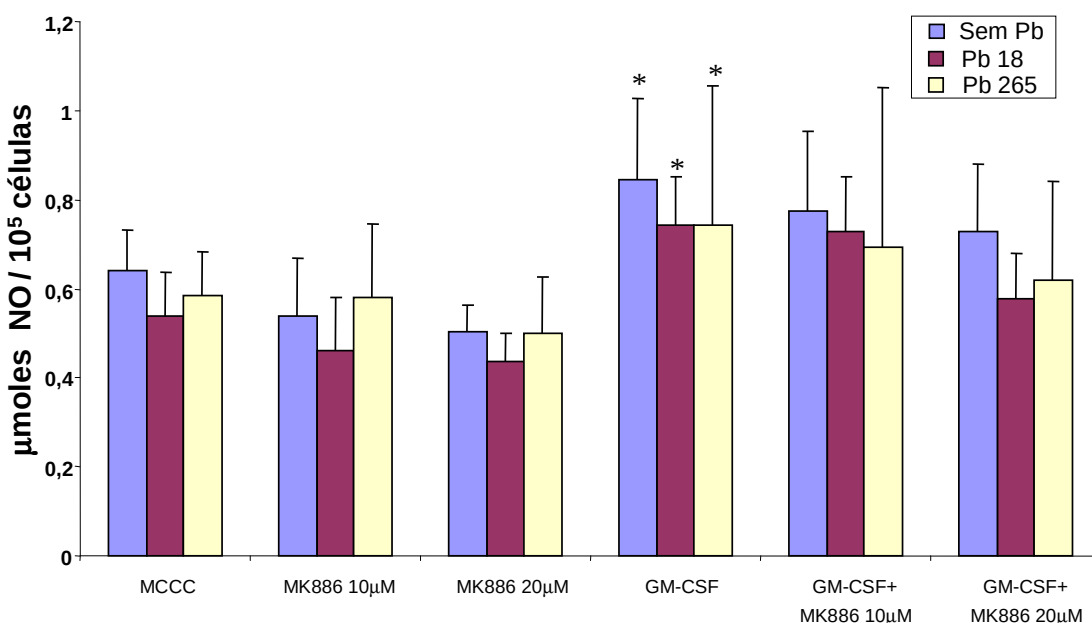


FIG-15. Liberação de NO por monócitos humanos pré-incubados com MCCC, MK-886 (10 ou 20 mM), GM-CSF (50U/ml) ou GM-CSF (50U/ml) + MK886 (10 ou 20 μM) e desafiados com *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em média ± erro padrão. Análise estatística: Teste de Tukey.

MCCC = Meio de cultura celular completo

* p < 0,05 X MCCC

4.7. Efeito de leucotrienos sobre a produção de IL-10 por monócitos humanos ativados ou não com IFN- γ , TNF- α ou GM-CSF e desafiados com cepa de alta ou baixa virulência do *P.brasiliensis*

Os resultados referentes aos ensaios estão apresentados na figuras 13 a 16.. Novamente, os resultados das culturas não ativadas são semelhantes nos ensaios para as 3 citocinas.

Detectamos que monócitos ativados com IFN- γ , TNF- α ou GM-CSF tendem a liberar maiores níveis de IL-10 que monócitos não ativados. Após o desafio com o fungo, ocorre uma tendência de aumento da produção de IL-10, em todas as culturas independentemente do estímulo, não ocorrendo, no entanto, diferenças entre o aumento induzido pela cepa 18 ou 265. Na grande maioria das culturas ocorreu uma diminuição da produção da citocina após o tratamento com MK886, mostrando o possível papel estimulador dos leucotrienos sobre a produção de IL-10.

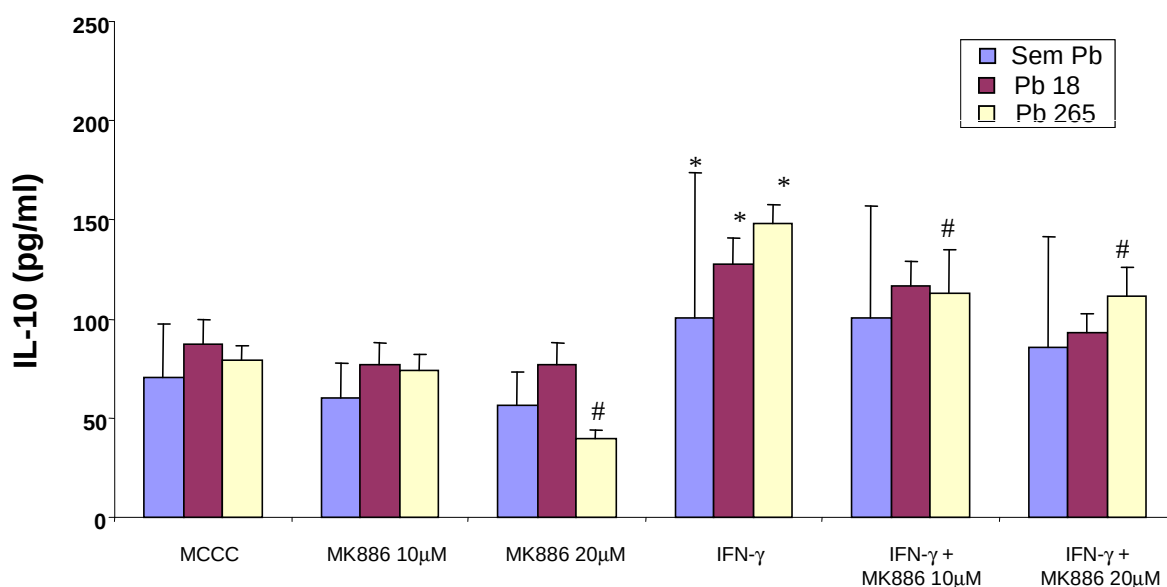


FIG-16. Produção de IL-10 por monócitos humanos pré-incubados com MCCC, MK-886 (10 ou 20 μ M), IFN- γ (50U/ml) ou IFN- γ (50U/ml) + MK886 (10 ou 20 μ M) e desafiados com *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão. Análise estatística: Teste de Tukey.

MCCC = Meio de cultura celular completo

* $p < 0,05$ X MCCC # $p < 0,05$ X Sem MK-886

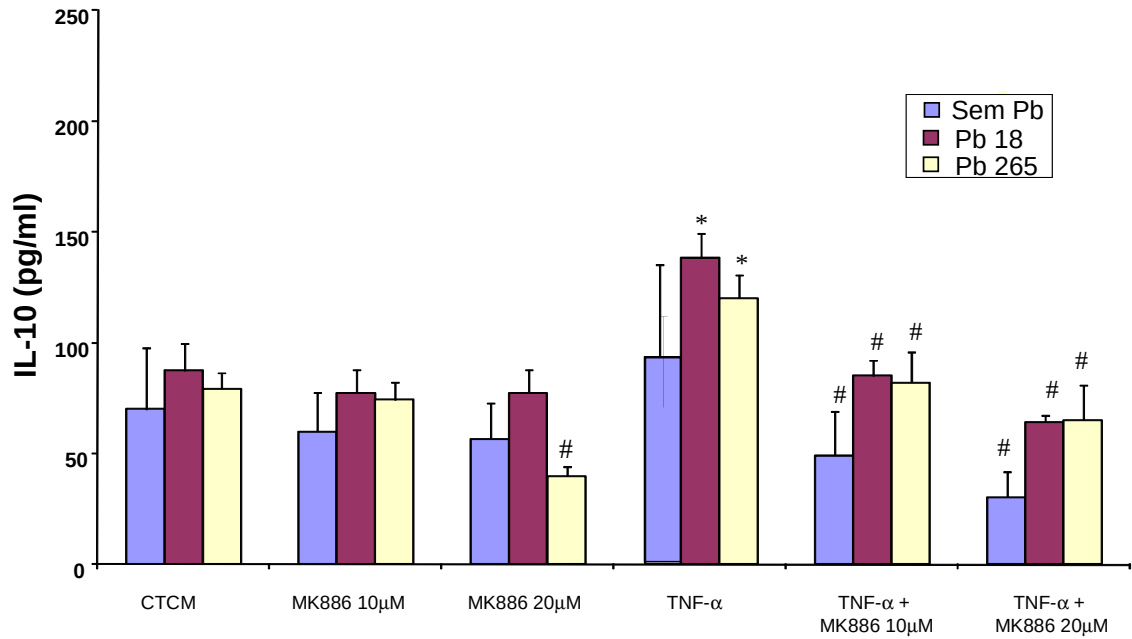


FIG-17. Produção de IL-10 por monócitos humanos pré-incubados com MCCC, MK-886 (10 ou 20 μM), TNF-α (50U/ml) ou TNF-α (50U/ml) + MK886 (10 ou 20 μM) e desafiados com *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em média ± erro padrão. Análise estatística: Teste de Tukey.

MCCC = Meio de cultura celular completo

* p < 0,05 X MCCC # p < 0,05 X Sem MK-886

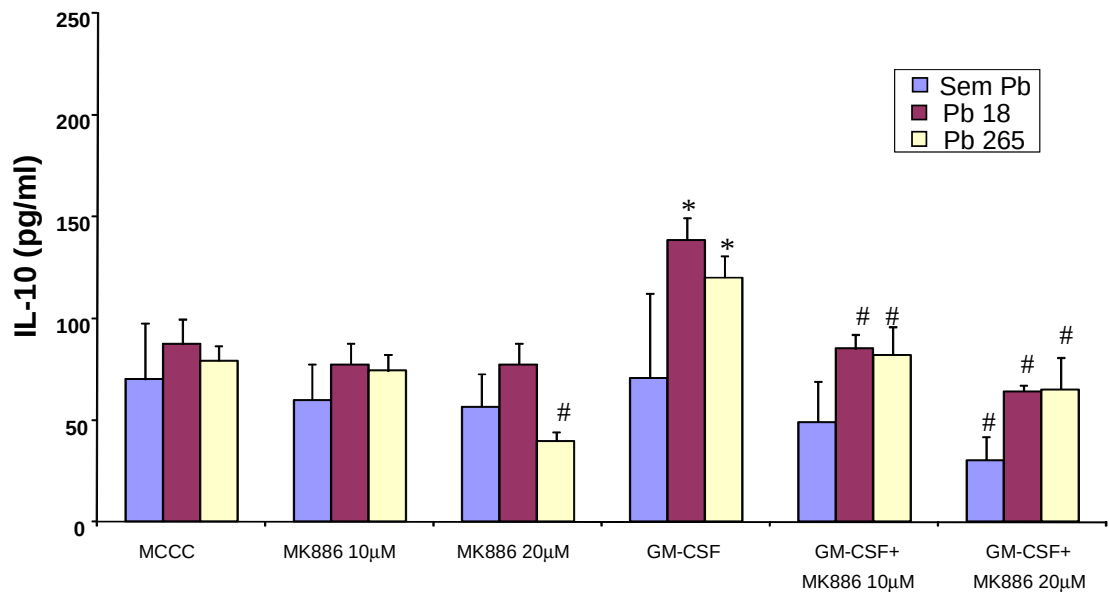


FIG-18. Produção de IL-10 por monócitos humanos pré-incubados com MCCC, MK-886 (10 ou 20 μM), GM-CSF (50U/ml) ou GM-CSF (50U/ml) + MK886 (10 ou 20 μM) e desafiados com *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em média ± erro padrão. Análise estatística: Teste de Tukey.

MCCC = Meio de cultura celular completo

* p < 0,05 X MCCC # p < 0,05 X Sem MK-886

4.8. Efeito de leucotrienos sobre a produção de TNF- α por monócitos humanos ativados ou não com IFN- γ , TNF- α ou GM-CSF e desafiados com cepa de alta ou baixa virulência do *P. brasiliensis*

Os resultados referentes aos ensaios estão nas figuras 19 a 21. Novamente, os resultados das culturas não ativadas são semelhantes nos ensaios para as 3 citocinas

Analisando as 3 figuras conjuntamente, observamos que as culturas não ativadas e não desafiadas liberam baixos níveis de TNF- α que no entanto, aumentam significativamente após a ativação com as 3 citocinas. Após o desafio, independentemente do estímulo, detectamos um aumento na produção da citocina em relação às culturas não desafiadas, que tenderam a ser maior após o desafio com a cepa 265. Detectamos ainda, na grande maioria das culturas, uma diminuição da produção de TNF, após o tratamento com MK886, mostrando um efeito modulador positivo dos leucotrienos sobre a produção dessa citocina.

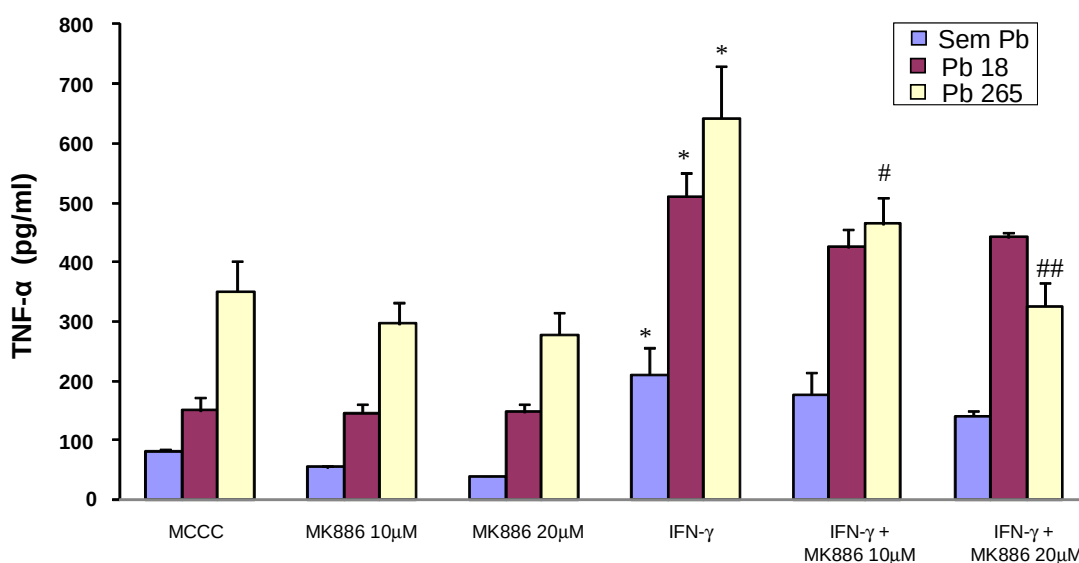


FIG-19. Produção de TNF- α por monócitos humanos pré-incubados com MCCC, MK-886 (10 ou 20 μ M), IFN- γ (50U/ml) ou IFN- γ (50U/ml) + MK886 (10 ou 20 μ M) e desafiados com *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão. Análise estatística: Teste de Tukey.

MCCC = Meio de cultura celular completo

* $p < 0,05$ X MCCC

$p < 0,05$ X Sem MK-886

$p < 0,01$ X Sem MK-886

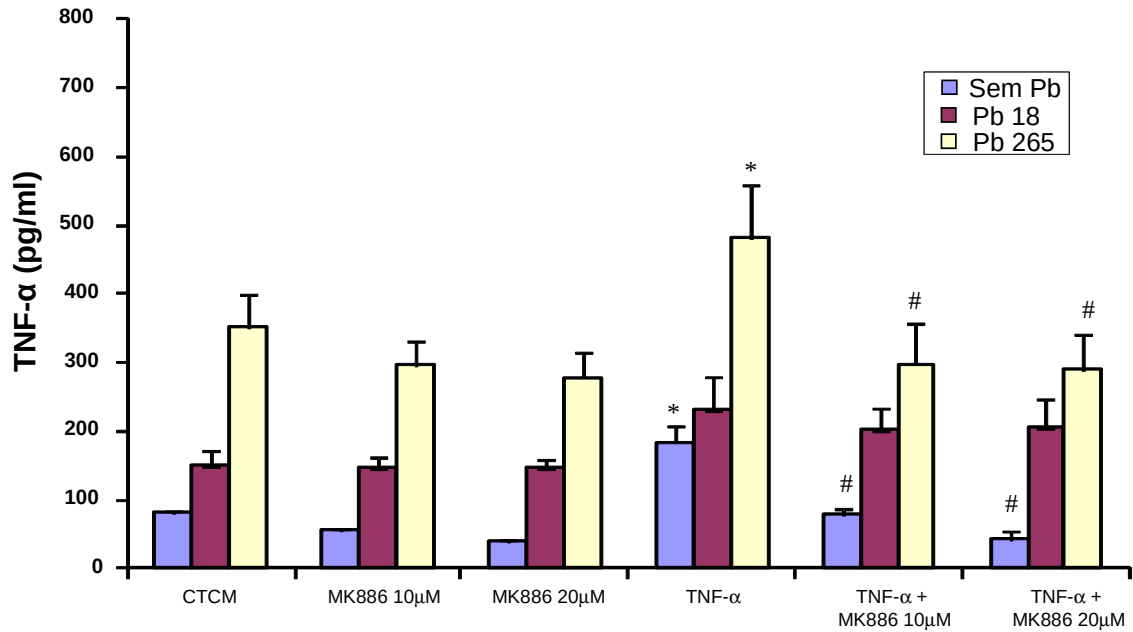


FIG-20. Produção de TNF- α por monócitos humanos pré-incubados com MCCC, MK-886 (10 ou 20 μ M), TNF- α (50U/ml) ou TNF- α (50U/ml) + MK886 (10 ou 20 μ M) e desafiados com *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão. Análise estatística: Teste de Tukey. MCCC = Meio de cultura celular completo

* $p < 0,05$ X MCCC # $p < 0,05$ X Sem MK-886

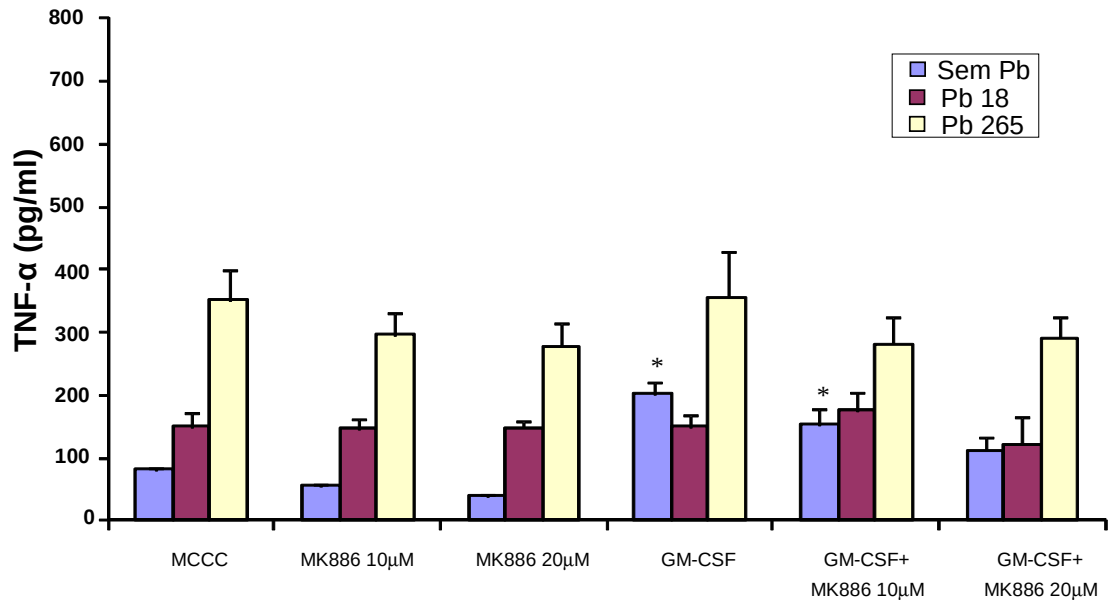


FIG-21. Produção de TNF- α por monócitos humanos pré-incubados com MCCC, MK-886 (10 ou 20 μ M), GM-CSF (50U/ml) ou GM-CSF (50U/ml) + MK886 (10 ou 20 μ M) e desafiados com *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão. Análise estatística: Teste de Tukey. MCCC = Meio de cultura celular completo

* $p < 0,05$ X MCCC

Discussão

5. DISCUSSÃO

Trabalhos na literatura têm mostrado claramente o papel dos leucotrienos na modulação da resposta imune inata contra diversas infecções, sendo raros, no entanto, os que avaliaram o efeito desses mediadores nos mecanismos de resposta ao *P. brasiliensis*. Dentro deste contexto, objetivamos no presente trabalho avaliar o efeito dos leucotrienos sobre a atividade fungicida de monócitos humanos ativados com TNF- α , IFN- γ e GM-CSF e desafiados com *P. brasiliensis* e relacionar essa atividade com os níveis dos metabólitos envolvidos nessa atividade, assim como com citocinas moduladoras do processo.

Os resultados mostram como esperado a capacidade das 3 citocinas usadas ativarem monócitos humanos, para o desenvolvimento de atividade fungicida. Os resultados também confirmam uma associação entre essa atividade e os níveis de H₂O₂, considerado como o principal metabólito envolvido na destruição do fungo por monócitos humanos. Em relação à produção desse metabólito, chama a atenção mais uma vez que, após o desafio com o fungo tanto monócitos não ativados como monócitos submetidos aos diversos tratamentos liberaram níveis significativamente menores do metabólito, quando comparados aos liberados pelas culturas não desafiadas. Esses resultados têm sido explicados em nossos trabalhos pelo fato de o fungo induzir a produção de prostaglandinas pelos monócitos que exercem uma regulação autócrina negativa sobre a atividade fungicida dessas células. No entanto, após a ativação das células com as citocinas ocorre uma reversão desse processo, fazendo com que a célula apresente uma eficiente atividade fungicida (Bordon-graciani et al., 2009, *submted*). Uma outra explicação para a redução dos níveis de H₂O₂ pode estar relacionado ao fato do fungo produzir catalase, uma vez que trabalhos têm mostrado que o *P. brasiliensis* é capaz de expressar o gene que codifica a enzima catalase peroxissomal (*PbcatP*). (FELIPE et al., 2005; MOREIRA et al., 2004).

Os experimentos relacionados com o desenvolvimento do projeto propriamente dito, isto é, com o objetivo de avaliar o efeito dos leucotrienos sobre a atividade fungicida mostraram que, após a incubação com MK886, ocorre a indução de uma menor atividade fungicida, tanto em células ativadas com as 3 citocinas quanto em células não ativadas, mostrando um possível efeito estimulatório dos leucotrienos sobre a atividade fungicida de monócitos humanos. Estes resultados concordam com a literatura uma vez que vários estudos mostram que os LTs, além de atuarem como agentes quimiotáticos, aumentam a atividade das células fagocitárias. Um dos primeiros trabalhos foi realizado por WIRTH & KIERSZENBAUM (1985), que observaram que tanto LTB₄ como o LTC₄, aumentam a fagocitose do *Trypanosoma cruzi* por macrófagos peritoneais de camundongos.

Subseqüentemente, numerosos estudos com modelos *in vitro* e *in vivo*, têm revelado o importante papel desses mediadores no aumento da fagocitose (MANCUSO et al., 1998; QADRI et al., 2002; GENTILE et al., 2003) e da atividade microbicida de monócitos/macrófagos (PETERS- GOLDEN & COFFEY, 1998).

BAILIE et al. (1996), em ensaios *in vivo*, detectaram um aumento da produção de leucotrienos 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 conseqüente morte desses animais.

Os ensaios de produção de H_2O_2 , revelaram o mesmo perfil de resposta da atividade fungicida, uma vez que todas as culturas tratadas com MK886, independentemente do estímulo, liberaram níveis mais baixos de H_2O_2 , comparadas às não tratadas. Esses resultados também concordam com a literatura uma vez que estudos mostraram que os LTs aumentam a atividade microbicida das células por mecanismos dependentes tanto da produção de óxido nítrico (NO), como da ativação da enzima NADPH oxidase. Nesse sentido, TALVANI et al. (2002) descreveram que a adição de leucotrienos nas culturas de macrófagos peritoneais murinos, induzem produção de NO, associado a um aumento de $TNF-\alpha$ e da atividade microbicida contra o *Trypanossoma cruzi*. SEREZANI et al. (2004), demonstraram que os LTs, principalmente o LTB_4 , aumentam significativamente a atividade microbicida dos macrófagos alveolares infectados com *K. pneumoniae*, sendo essa atividade dependente da ativação da enzima NADPH oxidase. Camundongos resistentes à infecção por *Leishmania amazonensis* (C3H/HePAS), produzem maiores níveis de LTB_4 quando comparados a cultura de células dos animais suscetíveis (BALB/c) que não produzem LTB_4 e não desenvolvem atividade microbicida. A adição de LTB_4 , nestas culturas, aumentou a produção de NO e a atividade microbicida destas células (SEREZANI et al., 2006). No entanto, em relação ao NO, nossos resultados não foram conclusivos, pois apesar de detectarmos um aumento na produção do metabólito após a ativação com as citocinas, principalmente TNF e GM-CSF, após o tratamento com MK886, os níveis apenas tenderam a diminuir, sem apresentarem significância estatística.

Nossos ensaios referentes a produção de citocinas mostraram que tanto células não ativadas e não desafiadas liberam baixos níveis de $TNF-\alpha$ e IL-10 que no entanto, aumentam significativamente após a ativação com as 3 citocinas. Após o desafio, independentemente do estímulo, detectamos um aumento na produção das citocinas em relação às culturas não desafiadas. Detectamos ainda, na grande maioria das culturas, uma diminuição da produção de TNF e IL-10, após o tratamento com MK886, mostrando um efeito modulador positivo dos leucotrienos sobre a produção de $TNF-\alpha$ e IL-10. Os

resultados em relação ao TNF- α são esperados, pois em adição aos efeitos diretos dos leucotrienos sobre as funções de fagócitos, como o aumento da atividade microbicida associada à produção de metabólitos derivados de O₂ ou do nitrogênio, esses mediadores também atuam indiretamente na resposta imune inata, estimulando a produção de citocinas. Estudos mostram a capacidade do LTB₄ em induzir a produção de TNF- α (GOLDMAN et al., 1993) por monócitos, IL-8 por neutrófilos (KUHNS et al., 2001) e de IL-5 e TNF- α por mastócitos (MELLOR et al., 2002).

No entanto, em relação à IL-10, os resultados não são esperados uma vez que não encontramos trabalhos na literatura mostrando o efeito estimulador de LTs sobre a produção dessa citocina. Além disso, trabalhos têm mostrado o efeito desativador dessa citocina sobre células fagocitárias humanas em resposta ao *P. brasiliensis*, resultando em uma diminuição da atividade fungicida dessas células (Costa et al, 2007)

Em conjunto, os resultados do presente trabalho permite-nos sugerir que o desafio de monócitos com o fungo induz a produção de leucotrienos que aumenta a produção de TNF- α . Essa citocina ativa as células fagocitárias a liberarem H₂O₂ resultando em atividade fungicida. Esse processo é bastante amplificado após a incubação com citocinas, provavelmente por uma maior liberação de LTs resultante do processo de ativação, uma vez que estudos têm mostrado que as citocinas estimulam a produção de leucotrienos pelas células fagocitárias. Assim, macrófagos de camundongos deficientes para a produção de GM-CSF, exibem níveis reduzidos da síntese de LTs (PAINE et al., 2001). Outros estudos têm mostrado que o GM-CSF e em uma menor extensão o TNF- α , aumentam a estimulação de proteína ativadora da 5-LO em neutrófilos humanos (POULIOT et al., 1994)

Neutrófilos de pacientes infectados com HIV apresentam uma diminuição na síntese de leucotrienos associada a uma diminuição na capacidade dessas células apresentarem atividade fungicida contra *Cryptococcus neoformans*. No entanto, essas atividades foram significativamente aumentadas após tratamento dos pacientes com G-CSF (COFFEY et al., 1998). Resultados semelhantes foram detectados em relação a monócitos do sangue periférico após tratamento dos pacientes com GM-CSF (COFFEY et al., 1999). Outros estudos mostraram que o GM-CSF aumenta a produção de leucotrienos e a atividade microbicida de neutrófilos humanos desafiados com *Mycobacterium bovis* (COFFEY et al., 2004).

No presente trabalho, as diferenças obtidas em relação a cepa 18 e 265, merecem ser melhor investigadas no sentido de demonstrar se a maior produção de TNF- α , H₂O₂ e maior atividade fungicida induzida pela cepa 265 estaria relacionada com a sua maior

capacidade de estimular a liberação de leucotrienos, ou se fatores intrínsecos dessa cepa como os seus constituintes de parede, poderiam estar envolvidos.

Referências

Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANJOS, A.R., CALVI, S.A., FERRACINI, R., PERAÇOLI, M.T., SILVA, C.L., SOARES, A.M. Role of *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall fraction containing beta-glucan in tumor necrosis factor-alpha production by human monocytes: correlation with fungicidal activity. **Med. Mycol.**, v.40, p.377-82, 2002.
- ANTACHOPOULOS, C., ROILIDES, E. Cytokines and fungal infections. **Br. J. Haematol.**, v.129, p.583-96, 2005.
- ARRUDA, C., FRANCO, M.F., KASHINO, S.S., NASCIMENTO, F.R., FAZIOLI, R.DOS A., VAZ, C.A., RUSSO, M., CALICH, V.L. Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. **Clin. Immunol.**, v.103, p.185-95, 2002.
- BAILIE, M.B., STANDIFORD, T.J., LAICHALK, L.L., COFFEY, M.J., 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.**, v. 157, p. 5221-4, 1996.
- BORDON-GRACIANI A.P., DIAS-MELICIO L.A., ACORCI M.J., ARAÚJO JR J.P., PERAÇOLI M.T.S., SOARES A.M.V.C. Inhibition of human monocyte *Paracoccidioides brasiliensis* killing by prostaglandins can be reversed by monocyte activation with cytokines. **Eur. J. Clin. Microbiol Infect Dis**, 2009 (*submitted*).
- BROCK, T.G., MCNISH, R.W., COFFEY, M.J., OJO, T.C., PHARE, S.M., PETERS-GOLDEN, M. Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on eicosanoid production by mononuclear phagocytes. **J. Immunol.**, v.156, p .2522-7, 1996.
- BRUMMER, E., HANSON, L.H., RESTREPO, A., STEVENS, D.A. *In vivo* and *in vitro* activation of pulmonary macrophages by IFN-gamma for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. **J. Immunol.**, v.140, p. 2786-9, 1988.

- BRUMMER, E., HANSON, L.H., RESTREPO, A., STEVENS, D.A. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. **Infect Immun.**, v.57, p.2289-94, 1989.
- CALICH, V.L, KASHINO, S.S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, p. 615-23, 1998.
- CALICH, V.L.G., RUSSO, M., VAZ, C.A.C., BURGER, E., SINGER-VERMES, L.M. Resistance mechanism to experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Ciência e Cultura**, v. 46, p. 455-61, 1994.
- CALVI, S.A., PERAÇOLI, M.T., MENDES, R.P., MARCONDES-MACHADO, J., FECCHIO, D., MARQUES, S.A., SOARES, A.M. Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. **Microbes Infect.**, v.5, p. 107-13, 2003.
- CANO, L.E., BRUMMER, E., STEVENS, D.A., RESTREPO, A. Fate of conidia of *Paracoccidioides brasiliensis* after ingestion by resident macrophages or cytokine-treated macrophages. **Infect. Immun.**, v.60, p.2096-100, 1992a.
- CANO, L.E., ARANGO, R., SALAZAR, M.E., BRUMMER, E., STEVENS, D.A., RESTREPO, A. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 30, p.161-8, 1992b.
- CARMO, J.P., DIAS-MELICIO, L.A., CALVI, S.A., PERAÇOLI, M.T., SOARES, A.M. TNF- α activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H₂O₂-dependent mechanism. **Med. Mycol.**, v. 44, p.363-8, 2006.
- CARMO, J.P.M., PERAÇOLI, M.T.S., CALVI, S.A., DIAS-MELICIO, L.A., TAVIAN, E.G., SOARES A.M.V.C. Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on human monocytes activation in vitro for high virulent *Paracoccidioides brasiliensis* killing. **Ann. Rev. Biomed. Sci.**, Special Issue, p. 94, 2002.

- CHRISTMAS, P., WEBER, B.M., MCKEE, M., BROWN, D., SOBERMAN, R.J. Membrane localization and topology of leukotriene C4 synthase. **J. Biol. Chem.**, v.277, p. 28902-8, 2002.
- COFFEY, M.J., PHARE, S.M., GEORGE, S., PETERS-GOLDEN, M., KAZANJIAN, P.H. Granulocyte colony-stimulating factor administration to HIV-infected subjects augments reduced leukotriene synthesis and anticryptococcal activity in neutrophils. **J. Clin. Invest.**, v.102, p. 663-70, 1998.
- COFFEY, M.J., PHARE, S.M., CINTI, S., PETERS-GOLDEN, M., KAZANJIAN, P.H. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor upregulates reduced 5-lipoxygenase metabolism in peripheral blood monocytes and neutrophils in acquired immunodeficiency syndrome. **Blood**, v.94, p.3897-905, 1999.
- COFFEY, M.J., PHARE, S.M., PETERS-GOLDEN, M. Role of leukotrienes in killing of *Mycobacterium bovis* by neutrophils. Prostaglandins **Leukot. Essent. Fatty Acids**, v.71, p.185-90, 2004.
- COSTA, D.L., ACORCI, M.J., BORDON-GRACIANI, A.P., DIAS-MELICIO, L.A.; PERAÇOLI, M.T.S., SOARES, A.M.V.C. Effect of Interleukin-10 on the *Paracoccidioides brasiliensis* killing by gamma- interferon activated human neutrophils. **Microbiology and Immunology**, v. 51, p. 73-80, 2007.
- DUNN, P.L., NORTH, R.J. Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis. **Infect. Immun.**, v.59, p. 2892-900,1991.
- FELIPE M.S.S., ANDRADE R.V., ARRAES F.B., NICOLA A.M., MARANHÃO A.Q., TORRES F.A., et al. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. **J. Biol. Chem.**, v.280: 24706-14, 2005.
- FRANCO, M., PERACOLI, M.T., SOARES, A., MONTENEGRO, R., MENDES, R.P., MEIRA, D.A. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **Curr.Top. Med. Mycol.**, v.5, p.115-49, 1993.

- FRANCO, M., MENDES, R.P., MOSCARDI-BACCHI, M., REZKALLAH-IWASSO, M.T., MONTENEGRO, M.R. Paracoccidioidomycosis. **Bailliere's Clin. Trop. Med. Commun. Dis.**, v. 4, p.185-220, 1989.
- GENTILE, D.A., FIREMAN, P., SKONER, D.P. Elevations of local leukotriene C4 levels during viral upper respiratory tract infections. **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, v.91, p. 270-4, 2003.
- GOLDMAN, G, WELBOURN, R, KOBZIK, L, VALERI, C.R., SHEPRO, D., HECHTMAN, H.B. Lavage with leukotriene B4 induces lung generation of tumor necrosis factor-alpha that in turn mediates neutrophil diapedesis. **Surgery**. v.113, 297-303, 1993.
- GOIHMAN-YAHR, M., ISTURIZ, G., ROTTENBERG, A. Los fagocitos y patogenia de la paracoccidioidomycosis. **Interciencia**, v.15, p.200-5, 1990.
- GONZALEZ, A., DE GREGORI, W., VELEZ, D., RESTREPO, A., CANO, L.E. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Infect. Immun.**, v.68, p. 2546-52, 2000.
- GREEN, L.C., RUIZ DE LUZURIAGA, K., WAGNER, D.A., RAND, W., ISTFAN, N., YOUNG, V.R., TANNENBAUM, S.R. Nitrate biosynthesis in man. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.78, p.7764-8, 1981.
- HAEGGSTRÖM, J.Z., WETTERHOLM, A., MEDINA, J.F., SAMUELSSON, B. Leukotriene A4 hydrolase: structural and functional properties of the active center. **J. Lipid. Mediat.**, v.6, p.1-13, 1993.
- JAKOBSSON, P.J., MANCINI, J.A., RIENDEAU, D., FORD-HUTCHINSON, A.W. Identification and characterization of a novel microsomal enzyme with glutathione-dependent transferase and peroxidase activities. **J. Biol. Chem.**, v.272, p.22934-9, 1997.
- KANAOKA, Y, BOYCE, J.A. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses. **J. Immunol.**, v.173, p.1503-10, 2004.

- KUHNS, D.B., NELSON, E.L., ALVORD, W.G., GALLIN, J.I. Fibrinogen induces IL-8 synthesis in human neutrophils stimulated with formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine or leukotriene B(4). **J. Immunol.**, v.167, p.2869-78, 2001.
- LEVITZ, S.M., NORTH, EA. gamma Interferon gene expression and release in human lymphocytes directly activated by *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, v.64, p.1595-9, 1996.
- LEWIS, R.A., AUSTEN, K.F., SOBERMAN, R.J. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. **N. Engl. J. Med.**, v.323, p.645-55, 1990. Review.
- LOOSE, D.S., STOVER, E.P., RESTREPO, A., STEVENS, D.A., FELDMAN, D. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.80, p. 7659-63, 1983.
- MANCUSO, P., STANDIFORD, T.J., MARSHALL, T., PETERS-GOLDEN, M. 5-Lipoxygenase reaction products modulate alveolar macrophage phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. **Infect.Immun.**, v.66, p.5140-6, 1998.
- MANDAL, A.K., SKOCH, J., BACSKAI, B.J., HYMAN, B.T., CHRISTMAS, P., MILLER, D., YAMIN, T.T., XU, S., WISNIEWSKI, D., EVANS, J.F., SOBERMAN, R.J. The membrane organization of leukotriene synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.101, p. 6587-92, 2004.
- MEDEIROS, A.I., SÁ-NUNES, A., SOARES, E.G., PERES, C.M., SILVA, C.L., FACCIONI, L.H. Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. **Infect. Immun.**, v.72, p.1637-44, 2004 .
- MELLOR, E.A., AUSTEN, K.F., BOYCE, J.A. 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, v.195, p. 583-92, 2002.

- MENCACCI, A., CENCI, E., BACCI, A., MONTAGNOLI, C., BISTONI, F., ROMANI, L. Cytokines in candidiasis and aspergillosis. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, v.1, p. 235-51, 2000. Review.
- MENDES, R.P. The gamut of clinical manifestations. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, (Eds). *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton. CRC Press. 1994; p. 233-58.
- MOREIRA, A.P., DIAS-MELICIO, L.A., PERAÇOLI, M.T.S., CALVI, S.A., SOARES, A.M.V.C. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells by IFN- γ and TNF- α activated murine peritoneal macrophages: evidence of H₂O₂ and NO effector mechanisms. **Mycopathologia**, v. 166, p.17-23; 2008.
- MOREIRA S.F., BAILÃO A.M., BARBOSA M.S., JENUÍNO R.S.A., PEREIRA M., SOARES C.M.A. Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, characterization, molecular cloning and expression analysis. **Yeast**, v. 21, p. 173-182, 2004
- MOSCARDI-BACCHI, M., BRUMMER, E., STEVENS, D.A. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. **J. Med. Microbiol.**, v.40, p.159-64, 1994.
- MUSSATTI, C.C., PERAÇOLI, M.T.S., SOARES, A.M.V.C, REZKALLAH-IWASSO, M.T. et al. Cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. In: Franco MF, et al. *Paracoccidioidomycosis*. Flórida, USA, CRC Press Boca raton 1994; 175-86.
- PAINE, R.. 3RD., MORRIS, S.B., JIN, H., WILCOXEN, S.E., PHARE, S.M., MOORE, B.B., COFFEY, M.J., TOEWS, G.B. Impaired functional activity of alveolar macrophages from GM-CSF-deficient mice. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, v.281, p.1210-8, 2001.
- PERAÇOLI, M.T., FORTES, M.R., DA SILVA, M.F., MONTENEGRO, M.R. Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v.37, p. 129-36, 1995.

- PERES, C.M., DE PAULA, L., MEDEIROS, A.I., SORGI, C.A., SOARES, E.G., CARLOS, D., PETERS-GOLDEN, M., SILVA, C.L., FACCIOLI, L.H. Inhibition of leukotriene biosynthesis abrogates the host control of *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbes Infect.**, v.9, p.483-9, 2007
- PETERS-GOLDEN, M., COFFEY, M. Role of leukotrienes in antimicrobial defense of the lung. **J. Lab. Clin. Med.**, v.132, p. 251-7, 1998. Review.
- PICK, E., KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **J. Immunol. Methods**, v.38, p.161-70, 1980.
- PICK, E., MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **J. Immunol. Methods**, v.46, p. 211-26, 1981.
- POULIOT, M., MCDONALD, P.P., KHAMZINA, L., BERGEAT, P., MCCOLL, S.R. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances 5-lipoxygenase levels in human polymorphonuclear leukocytes. **J. Immunol.**, 1994, v.152, p.851-8, 1994.
- QADRI, F., RAQIB, R., AHMED, F., RAHMAN, T., WENNERAS, C., DAS, S.K., ALAM, N.H., MATHAN, M.M., SVENNERHOLM, A.M. Increased levels of inflammatory mediators in children and adults infected with *Vibrio cholerae* O1 and O139. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v.9, p.221-9, 2002.
- RESTREPO, A, TOBÓN, A.M. *Paracoccidioides brasiliensis*. In Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier. 2005; 3062-8.
- RESTREPO, A., SALAZAR, M.E., CANO, L.E., STOVER, E.P., FELDMAN, D., STEVENS, D.A. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v.46, p.346-53, 1984.
- RIBEIRO, L.R.R, CALICH, V.L.G. The role of leukotrienes in pulmonary paracoccidioidomycosis (pcm) and in the fungicidal and secretory ability of peritoneal

- macrophages infected by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.47 (suppl. 14), p.27, 2005.
- ROMANO, C.C., MENDES-GIANNINI, M.J., DUARTE, A.J., BENARD, G. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. **Cytokine**, v.18, p.149-57, 2002.
- ROUZER, C.A., FORD-HUTCHINSON, A.W., MORTON, H.E., GILLARD, J.W. MK886, a potent and specific leukotriene biosynthesis inhibitor blocks and reverses the membrane association of 5-lipoxygenase in ionophore-challenged leukocytes. **J. Biol. Chem.**, v.25, p.1436-42, 1990.
- SALAZAR, M.E., RESTREPO, A., STEVENS, D.A. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect. Immun.**, v.56, p.711-3, 1988.
- SAMUELSSON, B., FUNK, C.D. Enzymes involved in the biosynthesis of leukotriene B₄. **J. Biol. Chem.**, v.264, p.19469-72, 1989.
- SEREZANI, C.H., ARONOFF, D.M., 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**, v.106, p.1067-75, 2005.
- SEREZANI, C.H., PERRELA, J.H., 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.**, v.177, p.3201-8, 2006.
- SOBERMAN, R.J., CHRISTMAS, P. The organization and consequences of eicosanoid signaling. **J. Clin. Invest.**, v.111, p.1107-13, 2003. Review.
- STOVER, E.P., SCHÄR, G., CLEMONS, K.V., STEVENS, D.A., FELDMAN, D. Estradiol-binding proteins from mycelial and yeast-form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect. Immun.**, v.51, p.199-203, 1986.

- TALVANI, A., MACHADO, F.S., SANTANA, G.C., KLEIN, A., BARCELOS, L., SILVA, J.S., TEIXEIRA, M.M. Leukotriene B(4) induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected murine macrophages and mediates resistance to infection. **Infect. Immun.**, 2002, v.70, p.4247-53, 2002.
- TAGER, A.M., LUSTER, A.D. BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v.69, p.123-34, 2003. Review.
- WALSH, T.J., ROILIDES, E., CORTEZ, K., KOTILIL, S., BAILEY, J., LYMAN, C.A. Control, immunoregulation, and expression of innate pulmonary host defenses against *Aspergillus fumigatus*. **Med. Mycol.**, v.43, Suppl 1, S165-72, 2005
- WIRTH, J.J., KIERSZENBAUM, F. Stimulatory effects of leukotriene B4 on macrophage association with and intracellular destruction of *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, v.134, p.1989-93, 1985.