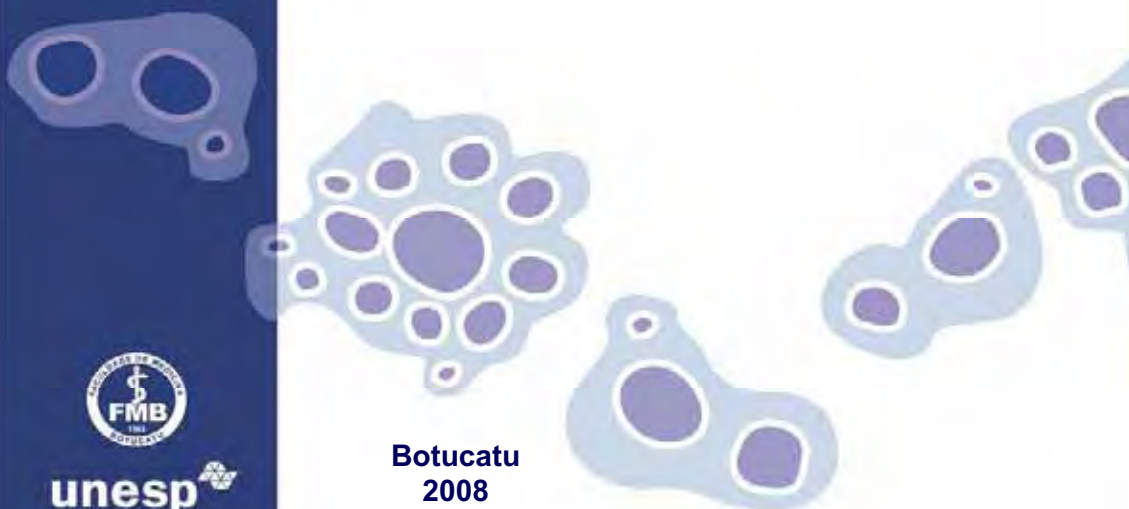


Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Faculdade de Medicina de Botucatu
Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais

EFEITO DE PROSTAGLANDINAS SOBRE A ATIVIDADE FUNGICIDA DE MONÓCITOS HUMANOS DESAFIADOS COM O *Paracoccidioides brasiliensis*

Ana Paula Bordon Graciani



**Botucatu
2008**

Ana Paula Bordon Graciani

**EFEITO DE PROSTAGLANDINAS SOBRE A
ATIVIDADE FUNGICIDA DE MONÓCITOS
HUMANOS DESAFIADOS PELO *Paracoccidioides*
*brasiliensis***

**Orientadora:
Prof^a Dr^a Ângela Maria Victoriano de Campos Soares**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, para obtenção do Título de Doutor em Doenças Tropicais.

Botucatu – SP

2008

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).

**“ Não desanimes. Persiste mais um tanto.
Não cultives pessimismo. Centraliza-te no bem a fazer.
Esquece as sugestões do medo destrutivo.
Segue adiante, mesmo varando a sombra dos próprios erros.
Avança ainda que seja por entre lágrimas.
Trabalha constantemente. Edifica sempre.
Não te impressiones nas dificuldades.
Convence-te de que a vitória é construção para o dia-a-dia.
Não desistas da paciência. Não creias em realizações sem esforço.
Não permitas que os irmãos desequilibrados te destruam o trabalho
ou te apaguem a esperança. Não contes vantagens nem fracassos.
Não dramatizes provações ou problemas.
Conserva o hábito da oração. Resguarda-te em Deus.
Ama sempre, fazendo pelos outros o melhor que possas realizar.
Age auxiliando. Serve sem apego.
E ASSIM VENCERÁS.”**

Eduardo Araujo

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho

À minha família que sempre me apoiou com muito carinho, sendo a base de todas as minhas realizações.

Ao meu marido Renato que com seu amor e compreensão sempre me incentivou ao longo do desenvolvimento deste estudo.

E à minha orientadora Prof^a Dr^a Ângela M. V. C. Soares pela sua orientação criteriosa e pelo constante estímulo para o desenvolvimento deste estudo e de minha carreira científica.

AGRADECIMENTOS

Ao terminar esta tese de doutorado resta-me registrar os meus sinceros agradecimentos a todos que de várias formas contribuíram para que se tornasse uma realidade:

À Deus, por guiar meus passos, por jamais ter me deixado só, por iluminar meu caminho e por provar, a cada dia, das mais variadas formas que seu amor é infinito.

Ao meu pai Mário, por todo amor e pelos valores transmitidos durante toda minha vida.

Aos meus irmãos Mário Eduardo e Maurício, pelo amor fraterno, companheirismo e pelos exemplos de profissionalismo e dedicação.

Às minhas cunhadas Lúcia e Ester, pelo apoio incondicional, amizade e carinho. E aos meus sobrinhos Filipe, Isabela, Maurício Lima e Daniela, que sempre me deram muitas alegrias.

Ao Renato, pelo amor, companheirismo e respeito durante toda essa caminhada.

Aos meus sogros Sérgio e Nidelsi pela amizade e convivência. E a minha tia Nair por todo carinho e atenção.

À minha orientadora Prof^a Ângela pela confiança, apoio, amizade e pelo exemplo constante de determinação que transformam sua orientação em uma lição de ciência e de vida.

Aos professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Dr^a Maria Terezinha Serrão Peraçoli, Dr Sílvio Luís de Oliveira, Dr^a Alexandrina Sartori, Dr Ramon Kaneno, Dr Maurício Sforcin e Dr João Candeias, pelos ensinamentos e experiências transmitidas e convivência no dia-a-dia.

Ao professor Dr João Pessoa Araújo Junior pela contribuição valiosa para os ensaios de RT-PCR em Tempo Real e pelas ricas sugestões durante a discussão dos resultados.

Aos professores Dr^a Alexandrina Sartori e Dr Ramon Kaneno pelas valiosas sugestões durante o exame de qualificação.

Ao Drº Paulo Câmara Marques Pereira atual coordenador do curso de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. E à ex-coordenadora Drª Jussara Marcondes Machado. E a todos os professores deste curso pelos conhecimentos transmitidos durante as disciplinas.

À minha querida amiga Michele Janegitz com quem tenho convivido durante todos esses anos, pela participação ativa neste trabalho, estando sempre disposta a compartilhar cada experimento, inclusive os realizados de madrugada e por estar ao meu lado nos bons e nos difíceis momentos. E ao amigo Guilherme que contribuiu de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho. Agradeço a vocês que souberam tornar meu cotidiano mais leve graças ao companheirismo e os minutos de descontração.

Aos amigos e colegas do Departamento de Microbiologia e Imunologia Renata, Katty, Érika, Cibele, Elisandra, Priscila, Luciane, Camila, Michelle Bufalo, Ana Carolina, Cláudio, Tati, Fernanda, Tais, Sofia, Larissa, Helan, Juliana e a todos que proporcionaram um ótimo ambiente de trabalho.

Aos colegas do laboratório de virologia Andreza, Sueli, Marcela, Taís, José Augusto (Zé), Flávio pelo suporte, amizade, paciência e disposição durante o tempo execução dos ensaios de biologia molecular.

Às amigas (caronas) Camila, Daniela, Graziela, Adriana e Juliana que sempre descontraíram as viagens diárias Bauru-Botucatu-Bauru.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Luís Alquati e Luiz Severino (Lula) pela colaboração prestada, contribuindo para o bom andamento do trabalho. E as secretárias Sônia Faraldo e Leonice Garcia pela paciência, presteza e simpatia.

Aos funcionários da seção de pós-graduação da faculdade de medicina por toda dedicação, auxílio e serviços prestados.

Às bibliotecárias pela disposição e realização da ficha catalográfica.

À FAPESP pelo apoio financeiro para este projeto. E a Capes pela bolsa concedida.

E a todos que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

“ Os grandes sonhos de conquista exigem firmeza e determinação. As dúvidas e incertezas retardam a nossa vitória e servem de bloqueio para atingirmos nossos objetivos. Não podemos nos deixar distrair pelo que ficou para trás, mesmo que tenham sido duros obstáculos. Afinal, já foram ultrapassados e só nos resta seguir em frente com a confiança de que estamos mais próximos de nossos sonhos. “

(Albert Camuns)

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag: Antígeno

ATP: Adenosina Trifosfato

cDNA: DNA complementar

ConA: concanavalina A

COX: Ciclooxygenase

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

GAPDH: do inglês (“Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase”)

GM-CSF: Fator Estimulador de Colônia Granulócito Macrófago

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio

IFN- γ : Interferon gama

IL-1: Interleucina 1

IL-2: Interleucina 2

IL-4: Interleucina 4

IL-5: Interleucina 5

IL-6: Interleucina 6

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

INDO: Indometacina

iNOS: Óxido Nítrico Sintase Induzível

LPS: Lipopolissacarídeo

MCCC: Meio de Cultura de Células Completo

mRNA: RNA mensageiro

NO: Óxido Nítrico

NOR: Óxido nítrico redutase

ONOO⁻: Peroxinitrito

Pb: *Paracoccidioides brasiliensis*

Pb18: Cepa de alta virulência do *Paracoccidioides brasiliensis*

Pb265: Cepa de baixa virulência do *Paracoccidioides brasiliensis*

PDGF: fator de crescimento derivado de plaqueta

PGs: Prostaglandinas

PGD₂: Prostaglandinas D₂

PGE₂: Prostaglandinas E₂

PGF₂: Prostaglandinas F₂

RNA: Ácido Ribonucléico

RNI: Intermediários Reativos do Nitrogênio

RT-PCR em tempo real: Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição

Reversa em Tempo Real

Th: Linfócito T “helper”

T CD₄⁺: Linfócito T CD₄⁺

T CD₈⁺: Linfócito T CD₈⁺

TNF-α: Fator de Necrose Tumoral alfa

TNFR1: Receptor Fator de Necrose Tumoral-alfa 1

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

SUMÁRIO

1. Resumo	12
2. Abstract	14
3. Introdução	17
4. Objetivos	28
5. Delineamento experimental	30
6. Casuística e Métodos	32
6.1 Casuística	32
6.2 Isolamento e cultura de Monócitos	32
6.3 Obtenção da suspensão de <i>P. brasiliensis</i>	33
6.4 Avaliação da atividade fungicida	34
6.5 Determinação da liberação de água oxigenada (H ₂ O ₂)	35
6.6 Determinação da liberação de óxido nítrico (NO)	36
6.7 Obtenção de sobrenadantes de cultura de monócitos	36
6.8 Determinação da produção das citocinas TNF- α , IL10 e IL-6	37
6.9 Determinação da produção de prostaglandina E ₂ (PGE ₂)	38
6.10 Quantificação relativa de mRNA para enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) por RT-PCR em tempo real	38
6.10.1 Extração de RNA:	39
6.10.2 Obtenção do cDNA	39
6.10.3 RT-PCR em tempo real	39
7. Análise estatística	41
8. Resultados	43
8.1- Atividade Fungicida	43
8.2- Produção de H ₂ O ₂	45
8.3- Expressão de mRNA para a enzima iNOS e Produção de NO	47
8.4- Produção de TNF- α	51
8.5- Produção de IL-10	53

8.6- Produção de IL-6	55
8.7- Produção de Prostaglandina E ₂ (PGE ₂)	57
9. Discussão	59
10. Conclusões	70
11. Visualização dos mecanismos envolvidos no efeito modulador da PGE ₂ na atividade fungicida	72
12. Referências Bibliográficas	75

RESUMO

Paracoccidioides brasiliensis (Pb), agente etiológico da paracoccidioidomicose, é um fungo dimórfico que sobrevive no interior de monócitos/macrófagos humanos não ativados. Estudos anteriores em nosso laboratório têm demonstrado que os monócitos humanos não ativados são incapazes de realizar atividade fungicida, e esse processo está associado com a capacidade do fungo induzir a produção de prostaglandinas (PGs), uma vez que, essas células são capazes de realizar atividade fungicida significativa após o tratamento com indometacina (INDO), um inibidor da produção de ciclooxigenase. No entanto, o processo de pré-ativação com IFN- γ , resulta em um parcial efeito compensatório sobre os efeitos inibidores das PGs, principalmente quando essas células são desafiadas com a cepa de baixa virulência do fungo. Assim, a proposta deste presente estudo foi avaliar se a ativação de monócitos humanos com outras citocinas como TNF- α e GM-CSF resulta em um efeito similar ao observado com IFN- γ . Uma outra questão a ser respondida é se esse processo poderia estar associado com alterações nos níveis de H₂O₂ e NO, que são moléculas efetoras envolvidas na atividade fungicida contra o *P. brasiliensis*, bem como nos níveis das citocinas TNF- α , IL-10 e IL-6. Culturas de monócitos do sangue periférico, obtidos de 20 indivíduos normais foram tratadas somente com INDO ou ativados com IFN- γ , TNF- α ou GM-CSF na presença ou ausência de INDO por 18h, e posteriormente desafiados com cepas de alta (Pb18) ou baixa (Pb265) virulência do *P. brasiliensis* por 4h. Após esse período, as culturas foram avaliadas quanto à atividade fungicida, produção de H₂O₂ e NO e expressão de mRNA para enzima óxido nítrico sintase (iNOS) por RT-PCR em tempo real. As concentrações de TNF- α , IL-6 e IL-10 nos sobrenadantes das coculturas foram avaliadas por ELISA. Nossos resultados mostram que monócitos humanos desafiados com cepas de alta ou de baixa virulência do *P. brasiliensis* produzem prostaglandinas que, via indução de IL-10 e IL-6, inibe a produção de TNF- α . Esse processo resulta na inibição de H₂O₂ com conseqüente inibição da atividade

fungicida. No entanto, esse efeito inibidor das PGs pode ser compensado pelo processo de ativação com citocinas que induz o aumento

na produção de $\text{TNF-}\alpha$ e H_2O_2 , e que, o $\text{TNF-}\alpha$ e o GM-CSF são mais eficazes do que o $\text{IFN-}\gamma$. Ao contrário do observado para a H_2O_2 , uma associação entre a atividade fungicida e a produção de NO não foi detectada. Chama atenção que, independente da citocina utilizada no processo de ativação dos monócitos, a reversão do efeito inibidor das PGs é mais eficiente quando as células são desafiadas com a cepa Pb265 em relação à Pb18, devido à capacidade dessa cepa induzir a produção de maiores níveis $\text{TNF-}\alpha$.

PALAVRAS-CHAVE: Prostaglandinas, Monócitos humanos, citocinas, atividade fungicida, *Paracoccidoides brasiliensis*

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis (Pb), the etiological agent of paracoccidioidomycosis, is a dimorphic fungus that survives within nonactivated human monocytes/macrophages. Previous studies have demonstrated that the lack of fungicidal activity by nonactivated human monocytes is associated to fungus capacity to inducing prostaglandins release, since a significative fungicidal activity was detected after monocytes treatment with indomethacin (INDO), a cyclooxygenase inhibitor. However, cells activation with IFN- γ seems to partially compensating this inhibitory effect, mainly when cells were challenged with low virulent strain of the fungus. Here, we extended our studies, addressing whether monocytes activation with other cytokines such as TNF- α and GM-CSF results in a similar effect to that observed with IFN- γ . Moreover, we asked if this process could be associated with alterations on H₂O₂ and NO levels, the molecules involved in Pb killing, as well as in the levels of the cytokines TNF- α , IL-10 and IL-6. Peripheral blood monocytes obtained from 18 healthy donors were treated only with INDO or activated with IFN- γ , TNF- α or GM-CSF in presence or absence of INDO for 18h, and further challenged with high (Pb18) or low (Pb265) virulent strain of Pb for 4h. After, cultures were evaluated for fungicidal activity, H₂O₂ and NO release and expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA by real-time RT-PCR. The concentrations of TNF- α , IL-6 and IL-10 on supernatants of cocultures were evaluated by ELISA. Our results provided evidence that human monocytes challenged with both strains of *P. brasiliensis* release prostaglandins that via induction of IL-10 and IL-6 inhibits TNF- α production. This process results in defective cell activation with consequent release of low H₂O₂ levels and lack of fungicidal activity by cells. However the inhibitory effect of PGs may be

compensated by activation process with cytokines that induces cells to release higher TNF- α and H₂O₂ levels, being TNF- α and GM-CSF more effective than IFN- γ in this process. Unlike H₂O₂ an association between killing and NO levels was not detected. Of note, independent of the cytokine used for cell activation, the overcoming process is more efficient for Pb265, due to its capacity to induce higher TNF- α levels in relation to Pb18.

KEYWORDS: Prostaglandin, human monocytes, cytokines, fungicidal activity, *P. brasiliensis*

INTRODUÇÃO



3- 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* (*P. 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^{1,2}.

Acredita-se que os agentes infectantes do *P. brasiliensis* sejam propágulos micelianos presentes no solo, água e plantas 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 paracoccidioidina³. Ao contrário, o processo pode progredir para a paracoccidioidomicose-doença com conseqüente disseminação para outros órgãos como fígado, baço e adrenais, pela via linfo-hematogênica⁴. As manifestações clínicas da micose podem ser agrupadas em dois padrões que definem as formas aguda e crônica da doença. A forma aguda é habitualmente grave, de evolução rápida e compromete o sistema fagocítico mononuclear (baço, fígado, linfonodos e medula óssea). A forma crônica tem duração prolongada, instalação lenta e gradual e as lesões permanecem localizadas ou envolvem mais de um órgão ou sistema^{5, 6}.

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 de sua capacidade de desenvolver uma resposta imune^{5, 7-9}. Em relação a este último fator, estudos clínicos e experimentais mostram a interação entre mecanismos

inespecíficos e específicos de defesa que atuam na resistência ao *P. brasiliensis*^{4, 10-12}.

A imunidade inespecífica ou inata apresenta grande importância no combate a fungos patogênicos constituindo-se na primeira linha de defesa contra infecções, reconhecendo um amplo espectro de patógenos sem necessidade de sensibilização prévia. Além disso, a ativação da resposta imune inata desencadeia a produção de uma rede de citocinas, resultando em resposta inflamatória e podendo ser um pré-requisito para o desencadeamento da imunidade adquirida¹²⁻¹⁵. Entre os vários mecanismos naturais de defesa, as células fagocitárias desempenham papel central na resistência ao *P. brasiliensis*, destacando-se a participação na reação inflamatória e na atividade fungicida.

Neste contexto, monócitos humanos ou macrófagos murinos não ativados não apresentam atividade fungicida ou fungistática contra o *P. brasiliensis*, permitindo a multiplicação do mesmo no interior das células. Brummer et al,¹⁶ 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,¹⁷ 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 à 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 fungo¹⁸.

Citocinas, em especial o IFN- γ , parecem ser fundamentais para aumentar a atividade fungicida das células fagocíticas. Estudos experimentais mostram que 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*¹⁶⁻¹⁹. Cano et al,²⁰ 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 leveduras²¹.

No que se refere às células humanas, os resultados obtidos por Moscardi-Bacchi et al,¹⁷ revelam que monócitos e macrófagos de indivíduos normais quando ativados por IFN- γ inibem o crescimento intracelular do *P. brasiliensis*. Trabalhos em nosso laboratório, mostraram que monócitos humanos não ativados não desenvolvem atividade fungicida efetiva contra cepa de alta virulência do *P. brasiliensis*. Esta atividade, no entanto, mostrou-se ligeiramente aumentada após o processo de ativação com IFN- γ . Baixa atividade também foi detectada para as células desafiadas com a cepa de baixa virulência do fungo que, no entanto, foi maior que a detectada para a cepa de alta virulência. Da mesma forma, após a ativação com IFN- γ esta atividade mostrou-se significativamente aumentada quando comparada à detectada após o desafio com a cepa de alta virulência²². Em função desses resultados tivemos interesse em aprofundar os nossos estudos relativos aos fatores moduladores da atividade fungicida de monócitos humanos contra o *P. brasiliensis*. Consideramos como fatores em potencial, mediadores inflamatórios, como as prostaglandinas.

As prostaglandinas (PGs) são mediadores lipídicos, pertencentes a uma grande família de produtos 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 ciclooxigenases, que dará origem as PGs (PGE₂, PGD₂ e PGF₂). Existem duas isoformas de ciclooxigenase (COX), 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 celulares, particularmente no estômago, intestino, rins e plaquetas²³. A COX-2 é uma isoforma induzível, condicionada a estímulos inflamatórios. Em certos tipos celulares, tais como células sinoviais, fibroblastos, monócitos e macrófagos os níveis da enzima COX-2 são rapidamente aumentados por mitógenos. A IL-1 é considerada um modelo de estímulo para a indução de COX-2. Em células endoteliais submetidas a estímulo com LPS, a COX-2 é induzida prontamente, e em alguns casos, demonstrou-se que a indução ocorre através da liberação de IFN- γ , TNF- α , PDGF (fator de crescimento derivado de plaqueta) e outras citocinas²⁴⁻²⁶.

Enquanto muitas citocinas induzem aumento da COX-2, existem algumas que são capazes de inibir esta enzima. As interleucinas IL-4 e IL-10, conhecidas por antagonizar os efeitos das citocinas pró-inflamatórias,^{26,27} inibem a indução da COX-2 em macrófagos estimulados por LPS ou ConA²⁷⁻³¹.

Por outro lado, drogas anti-inflamatórias são capazes de inibir as ciclooxigenases. A indometacina (INDO) é uma droga utilizada classicamente para a inibição da síntese de PGs. Este anti-inflamatório, em altas doses atua sobre as duas isoformas da ciclooxigenase, contudo, em baixas doses apresenta seletividade pela COX-1³².

A ação de PGs sobre a célula-alvo se dá inicialmente pela ligação a receptores específicos. A ligação da PG ativa seus receptores correspondentes, resultando na transferência de um sinal via proteínas-G ou canais iônicos. Dependendo do tecido e do subtipo de receptor para esse mediador, podem ser ativadas vias de sinalização intracelular diferentes com consequente ativação e inibição^{33,34} da fosfolipase C ou ativação da adenilato ciclase³⁵.

As PGs exercem diversos efeitos sobre a regulação e atividade das células T, particularmente as CD4⁺, modulando a sua proliferação, apoptose e produção de citocinas. A inibição da proliferação das células T pelas PGE₂ pode ser devida, em parte, à inibição da síntese de poliaminas,³⁶ à inibição tanto da liberação de cálcio intracelular como da proteína tirosina quinase^{37,38} ou ainda via

inibição da liberação de IL-2³⁹. 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 ativadas⁴⁰⁻⁴². Um dos efeitos mais importantes da PGE₂ é sobre a produção de citocinas por células T. Embora existam trabalhos mostrando que a PGE₂ aumente a síntese de IFN- γ por células Th₁ estimuladas por antígeno,⁴³ seu efeito preponderante sobre essas 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-2, mas aumenta a produção de citocinas de padrão de resposta Th₂, como a IL-4, IL-5 e IL-10^{44,45}. De forma semelhante ao detectado para células CD₄⁺, a PGE₂ inibe a proliferação das células CD₈⁺⁴⁶ e diminui a produção de IFN- γ por essas células⁴⁷.

A PGE₂ exerce também um efeito importante sobre células apresentadoras de antígeno, como células dendríticas e macrófagos. Em relação às primeiras, os resultados são conflitantes uma vez que, trabalhos têm demonstrado que a PGE₂ aumenta a produção de IL-12 por essas células na ausência de estimulação por LPS^{48,49}. No entanto, a produção de IL-12 por células dendríticas da medula óssea é inibida por PGE₂. Adicionalmente, a presença desse mediador leva a uma inibição da produção de IL-12 por essas células, com um aumento na produção de IL-10⁵⁰. Assim, a presença de PGE₂ no primeiro contato das células TCD₄⁺ com o antígeno induz a diferenciação dessas células em Th₂. A PGE₂ regula também, de forma bastante acentuada, a produção de citocinas por macrófagos ativados. Assim, esse mediador inibe a produção de TNF- α , IL-1 β e IL-12, assim como a expressão de receptor para essas citocinas, aumentando, no entanto, a produção de IL-10^{51,52}.

Os efeitos das PGs citados acima, particularmente os que demonstram uma inibição da atividade de células T, têm levado os pesquisadores a investigar o papel desse mediador nos mecanismos de imunossupressão detectados em algumas infecções. Nesse sentido Edwards et al,⁵³ demonstraram que em camundongos infectados com *Mycobacterium avium intracellulare*, a PG suprime a

produção de IFN- γ pelos linfócitos com consequente inibição da atividade microbida de macrófagos. Farrel e Kirkpatrick,⁵⁴ demonstraram que células esplênicas de camundongos infectados com *Leishmania major* produzem elevados níveis de PGs associados à exacerbação da doença cutânea nesses animais e depressão da resposta linfoproliferativa à ConA. Da mesma forma, camundongos infectados com *Mycobacterium leprae* liberam PGE₂, que atua como um modulador negativo endógeno da resposta imune que ocorre no microambiente da reação granulomatosa induzida por esse microrganismo⁵⁵.

Alguns autores demonstraram que camundongos BALB/c infectados com *L. major*, susceptíveis à infecção, desenvolvem resposta imune preferencialmente mediada por Th₂. No entanto, quando tratados com INDO passam a desenvolver resposta do tipo Th1, mostrando o efeito da PGE₂ na indução de resposta não protetora mediada por Th₂⁵⁶.

Schleifer e Mansfield,⁵⁷ demonstraram que a ativação de macrófagos durante a infecção por *Trypanosoma brucei rhodesiense* leva à liberação de óxido nítrico (NO) e PG que inibem a resposta proliferativa de células T durante a infecção. De forma semelhante, Pinge-Filho et al.,⁵⁸ demonstraram que grandes quantidades de PGE₂, TNF- α e NO são produzidas durante a infecção por *T. cruzi* e que esses mediadores participam de um circuito que controla as respostas de linfoproliferação e de citocinas à infecção por esse microrganismo. Assim, o TNF- α estimula a síntese de PG e NO que inibem a síntese de TNF- α . A inibição combinada de PG e NO restaura a capacidade proliferativa das células em resposta a ConA e Ag.

Estudos em modelo experimental murino de tuberculose demonstraram uma participação significativa da PGE₂ na patogênese da tuberculose pulmonar, uma vez que durante a fase inicial da infecção, foram detectadas baixas concentrações de PGE₂ associadas à expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), permitindo o controle do crescimento do bacilo. Já, durante uma fase mais tardia da infecção, altas concentrações de PGE₂ estiveram associadas

com diminuição da expressão de IFN- γ , TNF- α , iNOS e alta expressão de IL-4, permitindo a progressão da doença⁵⁹.

Barros-Mazon et al.,⁶⁰ demonstraram que existe uma regulação diferenciada da resposta linfoproliferativa a antígenos do *T. cruzi* em pacientes com a forma cardíaca ou indeterminada da doença de Chagas. A IL-10 está envolvida na supressão da resposta em pacientes com a forma cardíaca, enquanto que as PGs regulam a linfoproliferação de células tanto de pacientes com forma cardíaca, como indeterminada da doença.

Estudos semelhantes aos descritos acima, foram realizados em modelo experimental de paracoccidiodomicose⁶¹. 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.

Apesar desses achados mostrando o efeito supressor da PGE₂ sobre a resposta imune de camundongos infectados com o *P. brasiliensis*, são raros os trabalhos na literatura que tiveram o objetivo de avaliar o efeito desse mediador sobre a interação do fungo com células fagocitárias humanas, particularmente o relacionado com a atividade fungicida dessas células. Nesse sentido, foi avaliado em nosso laboratório o efeito modulador das PGs sobre a atividade fungicida de monócitos humanos desafiados com cepa de alta (Pb18) e baixa (Pb265) virulência⁶². O papel modulador das PGs foi avaliado utilizando-se um protocolo de pré-incubação das células com INDO e posterior desafio com as duas cepas do fungo. Detectamos, como esperado, que células não tratadas não desenvolvem atividade fungicida efetiva contra o fungo. No entanto, esta atividade é significativamente aumentada após a incubação com INDO. Estes resultados mostram que quando as células são impedidas de liberarem prostaglandinas, passam a apresentar atividade fungicida eficiente contra o fungo. Adicionalmente, observamos que o tratamento com INDO aumentou significativamente os níveis de TNF- α , mostrando que o efeito modulador das PGs seria via inibição da produção dessa citocina. Resultados semelhantes aos obtidos após o tratamento com INDO foram detectados após a ativação das células com IFN- γ e principalmente após o

tratamento simultâneo com INDO e IFN- γ . No entanto, os níveis de TNF- α antes e após os tratamentos, sempre foram significativamente maiores na coculturas desafiadas com a cepa Pb265 em relação à Pb18. Esses diferentes níveis podem explicar as diferenças na atividade fungicida apresentada contra as duas cepas do fungo. Assim, a atividade fungicida contra as duas cepas pode ser modulada por PGs, mostrando que ambas induzem as células a liberarem esse mediador. Após o tratamento com INDO, as células passam a não mais sofrer o efeito das PGs sobre a produção de TNF- α . Os níveis aumentados dessa citocina induzem as células a desenvolverem atividade fungicida. No entanto, a capacidade da cepa Pb265 em induzir uma maior produção de TNF- α faz com que a atividade fungicida das células sobre esta cepa seja ainda maior quando comparada à cepa Pb18.

Diferenças em relação à capacidade de induzir a produção de TNF- α tem sido relatadas para as diferentes cepas do *P. brasiliensis*. Segundo Figueiredo et al,⁶³ tanto cepas do *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. As frações e a β -glucana purificada estimularam a secreção de TNF- α *in vitro* por macrófagos murinos, sugerindo que essa citocina é produzida em resposta ao *P. brasiliensis* e regulada por vários constituintes da parede celular do fungo. Calvi et al.,²² estudando pacientes com paracoccidioidomicose, verificaram que a produção de TNF- α por monócitos infectados, *in vitro*, com a cepa de baixa virulência (Pb265), induzia níveis mais elevados de TNF- α em comparação à cepa de alta virulência (Pb18). Além disso, níveis mais elevados dessa citocina apresentaram correlação com 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 β -glucana, induziu o aumento da produção de TNF- α , com conseqüente aumento da atividade fungicida⁶⁴. 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.

Em conjunto, nossos resultados fizeram-nos sugerir 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 citocinas, como o IFN- γ . A ativação das células compensaria os efeitos inibitórios das PGs, induzindo as células a produzirem maiores níveis de TNF- α , com conseqüente aumento da atividade fungicida dessas células .

Dando continuidade aos nossos estudos em relação aos mecanismos através dos quais as PGs inibem a atividade fungicida de monócitos humanos contra o *P. brasiliensis*, desenvolvemos trabalho cuja hipótese foi testar se esse efeito ocorreria através da inibição da liberação de H₂O₂⁶⁵, uma vez que trabalhos realizados em nosso laboratório mostraram que esse metabólito é pelo menos uma das moléculas efetoras dos monócitos humanos envolvidos na destruição do fungo. Os ensaios foram realizados apenas com a cepa de alta virulência (Pb18) do fungo e utilizando monócitos ativados ou não com IFN- γ . Além da H₂O₂, avaliamos novamente os níveis de TNF- α nos sobrenadantes das coculturas. Observamos, como esperado que células não ativadas, mas tratadas com INDO ou células ativadas com IFN- γ apresentam um aumento na atividade fungicida em relação às células não tratadas associada a níveis maiores de TNF- α e H₂O₂. Esses valores foram ainda maiores para as células incubadas simultaneamente com IFN- γ e INDO. Esses resultados indicam que a modulação da atividade fungicida de monócitos pelas PGs envolve inibição da produção de TNF- α , processo que resulta em menor ativação celular e conseqüente menor liberação de H₂O₂. No entanto, além de modularem a produção de H₂O₂, as PGs poderiam atuar sobre outros mecanismos efetores das células fagocitárias contra o fungo. O mecanismo efector adicional envolveria a liberação de NO, um metabólito envolvido na destruição do fungo por células murinas ativadas^{66,67}.

Com relação às células humanas, essa hipótese merece ser testada, uma vez que embora alguns estudos tenham demonstrado a incapacidade dessas

células produzirem NO⁶⁸⁻⁷¹, numerosos outros trabalhos têm discutido que essas células, em certas condições podem produzir esse metabólito, assim como expressar a enzima iNOS⁷²⁻⁸³.

Uma outra questão a ser respondida é se os efeitos inibidores das PGs envolvem alterações na produção de outras citocinas, além do TNF- α , como a IL-10 e IL-6. Adicionalmente, torna-se importante avaliar como ocorreria o desenvolvimento da modulação da atividade fungicida por PGs, após a ativação com outras citocinas, além do IFN- γ , como o TNF- α e o GM-CSF. Finalmente, estudos devem ser dirigidos no sentido de avaliar a influência da cepa do fungo sobre os processos citados.

OBJETIVOS



4- OBJETIVOS

2.1- Avaliar o efeito modulador das PGs sobre a atividade fungicida de monócitos humanos antes e após a ativação com IFN- γ , TNF- α ou GM-CSF.

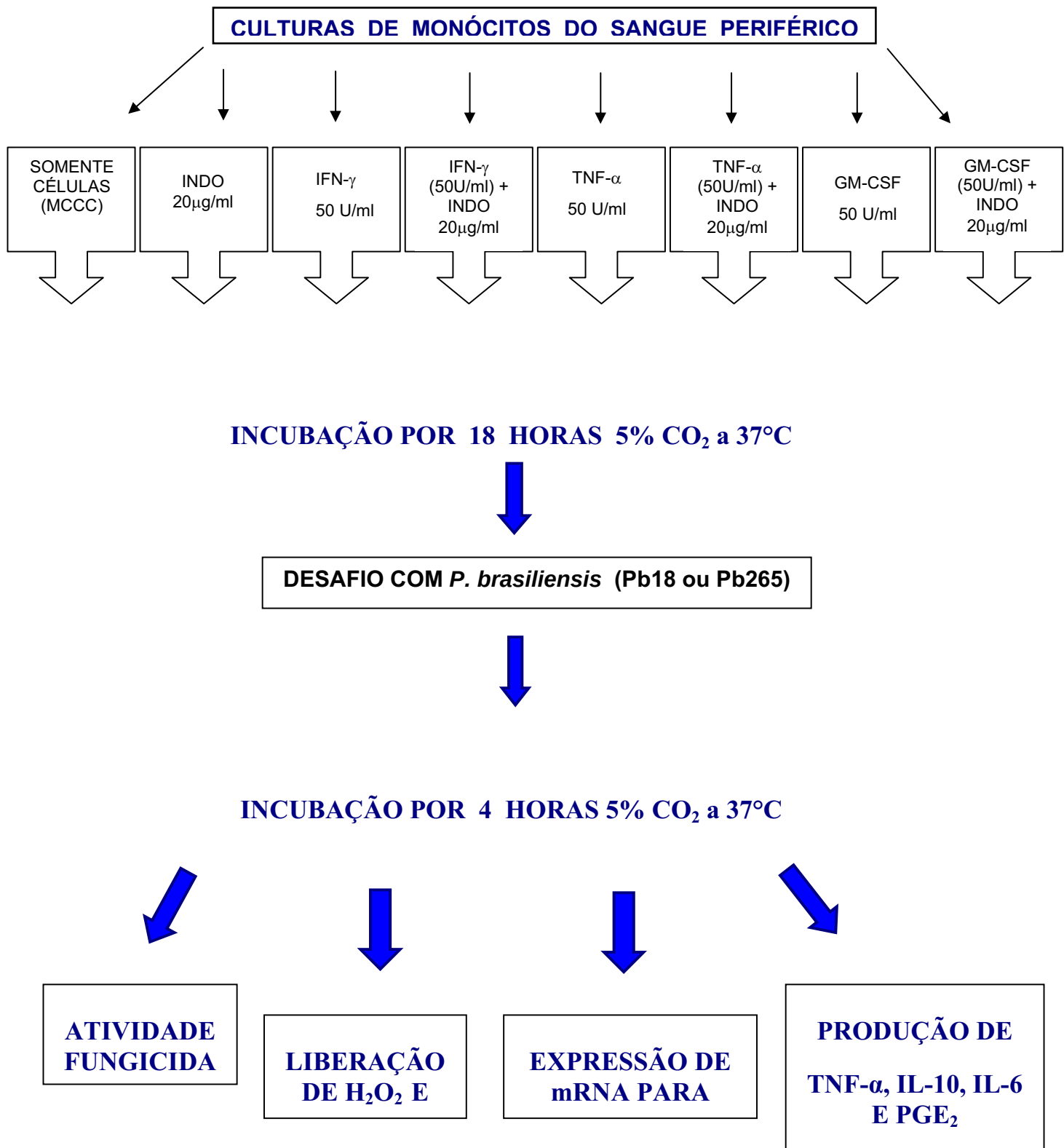
2.2. Avaliar se esse efeito está associado com alterações na produção de H₂O₂ e NO, e nos níveis das citocinas TNF- α , IL-10 e IL-6.

2.3 Avaliar se esse processo tem correlação com o grau de virulência da cepa do fungo.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



5- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



CASUÍSTICA E MÉTODOS



6- CASUÍSTICA E MÉTODOS

6.1- Casuística

Foram avaliados monócitos do sangue periférico de 20 indivíduos saudáveis, 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, tendo aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (OF:132/2005-CEP).

6.2- Isolamento e Cultura de Monócitos

Sangue periférico de indivíduos saudáveis foi obtido por punção venosa, sendo 20 mL colocados em tubos estéreis contendo 200 µL de heparina (Liquemine-Roche). As células mononucleares foram obtidas por meio da separação em gradiente de Ficoll-Hypaque⁸⁴. O anel rico em linfócitos e monócitos foi lavado por 2 vezes com meio de cultura RPMI (Gibco Laboratories, Grand Island, N. Y.) por 10 minutos a 200 g, cada lavagem. Após este período, a suspensão celular foi ressuspensa em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) 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). A contagem, identificação e a viabilidade dos monócitos foram realizadas 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%). Para realização das culturas de monócitos, a concentração celular foi ajustada para 2×10^6 monócitos/mL, com posterior plaqueamento da suspensão celular (100 µL/orifício) em placas de microcultura de fundo chato com 96 orifícios, para os ensaios de atividade fungicida, dosagem de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de óxido nítrico (NO). Para a obtenção de sobrenadante de cultura para dosagem de TNF- α , IL-10, IL-6 e PGE₂, bem como para a realização da técnica de RT-PCR

(Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa) em Tempo Real, a concentração foi ajustada para 1×10^6 monócitos/mL, com posterior plaqueamento da suspensão celular (500 μ L/orifício) em placas de macrocultura de fundo chato com 24 orifícios.

Após o plaqueamento, as culturas celulares foram incubadas por 2 horas à 37°C em tensão de 5% de CO₂ para aderência dos monócitos. Após esse período, as células não aderentes foram removidas através da lavagem das placas com meio de cultura RPMI 1640 (Gibco). Em seguida, as culturas de monócitos foram submetidas aos tratamentos com MCCC, MCCC + INDO (Sigma) 20 μ g/mL MCCC + IFN- γ recombinante humano (R&D Systems) 50U/mL, MCCC + IFN- γ + INDO 20 μ g/mL, MCCC + TNF- α recombinante humano (R&D Systems) 50U/mL, MCCC + TNF- α + INDO 20 μ g/mL, MCCC + GM-CSF recombinante humano (R&D Systems) 50U/mL ou MCCC + GM-CSF + INDO 20 μ g/mL no volume final 100 μ L para as microculturas e de 500 μ L para as macroculturas. As placas foram então incubadas durante 18 horas, em tensão de 5% de CO₂ à 37°C, para posterior desafio com o *P. brasiliensis* (Pb18 ou Pb265) durante 4 horas.

Para a realização da técnica de RT-PCR em tempo real, os monócitos das macroculturas foram incubados durante 18 horas, em tensão de 5% de CO₂ à 37°C, na presença dos diferentes tratamentos, com posterior desafio com *P. brasiliensis* (Pb18 ou Pb265) durante 4 horas.

A indometacina (INDO) foi inicialmente preparada, a uma concentração de 1000 μ g/mL em etanol (Sigma), diluído à 25% em RPMI 1640 (Gibco). Posteriormente, essa solução foi diluída na concentração de 100 μ g/mL de MCCC. Para o tratamento das culturas foi utilizada a concentração de 20 μ g/mL

6.3- Obtenção da Suspensão de *P. brasiliensis*

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

esse período, as células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram coletadas da superfície de cultivo com auxílio de alça de platina e transferidas para tubos estéreis com pérolas de vidro de 4 mm de diâmetro e aproximadamente 10 mL de meio RPMI 1640 (Gibco), e homogeneizadas em agitador de tubos tipo Vortex por 30 segundos. Em seguida, as suspensões celulares foram mantidas a 37° C durante 5 minutos para sedimentação de grumos não desfeitos durante a agitação. Após este período, o sobrenadante dessa suspensão foi coletado, sendo utilizada uma alíquota para contagem em câmara hemocitométrica tipo Neubauer, utilizando microscópio com contraste de fase. Foram consideradas como células viáveis as que se apresentaram com aspecto brilhante (refringente), uma vez que as células mortas apresentam-se com coloração escura. Foram utilizadas as suspensões que apresentaram pelo menos 95% de viabilidade⁶².

6.4- Avaliação da Atividade Fungicida

Após o período de 18 horas de incubação com os estímulos descritos no item 6.2, os sobrenadantes das microculturas foram retirados e os monócitos desafiados com 0,1mL de suspensão de *P. brasiliensis*, contendo 4×10^4 fungos/mL diluídos em RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma) 40 µg/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 permite que os monócitos sejam 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 suspensões controles, contendo apenas o fungo (culturas controles).

Ao final do processo, o material obtido a partir das lavagens com água destilada, das culturas controles e das culturas experimentais resultaram em um volume de 2 mL. 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 47 g/L, acrescido de 4% de soro de cavalo, 50 µg/mL de gentamicina e 5% de extrato aquoso. O extrato aquoso foi preparado segundo o método de Kurita et al.,⁸⁵ a partir de filtrado de cultura de células leveduriformes do fungo (cepa Pb192), 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:

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

6.5- Determinação da liberação de água oxigenada (H₂O₂)

A produção de H₂O₂ foi determinada segundo o método descrito por Pick e Keisari em 1980⁸⁶, e adaptado por Pick e Mizel em 1981⁸⁷.

Após 18 horas de incubação com os diferentes tratamentos descritos no item 6.2, os sobrenadantes das microculturas foram retirados e os monócitos aderidos foram desafiados com 0,1 mL de suspensão de *P. brasiliensis*, contendo 4x10⁴ fungos/mL diluídos em solução vermelho fenol contendo 140 mM de NaCl; 10 mM de tampão fosfato pH 7; 5,5 mM de dextrose; 0,56 mM 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 ensaiadas com pelo menos triplicatas de cada grupo. A absorbância foi determinada em leitor automático de ELISA, com filtro de 620 nm, contra um branco constituído de solução vermelho fenol e NaOH a 1N. Os resultados da dosagem de H₂O₂ foram

expressos em nanomoles de $\text{H}_2\text{O}_2/2 \times 10^5$ 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 .

6.6 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^- foi avaliada pelo método colorimétrico baseado na Reação de Griess⁸⁸. Aos sobrenadantes obtidos das microculturas (100 μL) de monócitos humanos incubados durante 18 horas com os diferentes tratamentos descritos no item 6.2, e desafiados por 4 horas com o *P. brasiliensis* (Pb18 ou Pb265), 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%. Os dois reagentes foram misturados em volumes iguais no momento da reação e as amostras (triplicatas) foram lidas em leitor automático de ELISA, com filtro de 540nm, contra um branco constituído por reagente de Griess. Os resultados foram expressos em micromoles de $\text{NO}/2 \times 10^5$ células, a partir de curva padrão estabelecida em cada ensaio, constituída com concentrações molares conhecidas de NO_2^- variando de 200 a 0,39 μM .

6.7 Obtenção de sobrenadantes de cultura de monócitos

Monócitos de indivíduos saudáveis, na concentração de 1×10^6 células/mL, foram colocados em placas de macrocultura com 24 orifícios (500 μL /orifício) e submetidos aos diferentes tratamentos, como descrito no item 6.2, durante 18 horas em tensão de 5% de CO_2 à 37°C. Após esse período, sobrenadantes das culturas foram retirados e os monócitos desafiados com 500 μL de solução RPMI 1640 (Gibco) 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 contendo células leveduriformes de *P. brasiliensis* na proporção de

50 monócitos para uma célula fúngica. Após 4 horas de incubação, os sobrenadantes foram coletados, centrifugados a 400 g e, as alíquotas desse material conservadas a -70°C até o momento de sua utilização para a dosagem de TNF- α , IL-10, IL-6 e prostaglandina E₂ (PGE₂).

6.8 Determinação da produção de TNF- α , IL-10 e IL-6

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 , anti-IL-10 ou anti-IL6 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. A seguir, a placa foi lavada conforme descrito acima e em alguns orifícios da placa foi adicionado 100 μ L de TNF- α , IL-6 ou IL-10 recombinante humano (R&D Systems) diluído de forma seriada em concentrações variando de 39 a 5000 pg/mL para obtenção de curva padrão; e nos orifícios restantes foram colocados 100 μ L dos sobrenadantes gerados conforme descrito no item 6.7. Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente, as amostras foram retiradas, realizada nova lavagem da placa e adicionado o anticorpo revelador policlonal de cabra anti-TNF- α , anti-IL-10 ou anti-IL-6 humano conjugado com biotina (R&D Systems), na concentração de 100 ng/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, a placa foi lavada novamente com PBST e adicionado 100 μ L do substrato enzimático, constituído por 12,5 mL de tampão citrato-fosfato 0,1M, pH5.0 contendo 1 mg/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 492 nm. Os níveis de TNF- α , IL-10 ou IL-6 nos sobrenadantes de culturas de monócitos foram calculados utilizando-se a curva padrão.

6.9 Determinação da produção de Prostaglandina E₂ (PGE₂)

Para determinação dos níveis de PGE₂ produzidos nos sobrenadantes das culturas de monócitos incubados com IFN- γ , TNF- α , GM-CSF e/ou INDO e desafiados com *P. brasiliensis*, foi utilizado Kit comercial de ELISA Competitivo para dosagem de PGE₂ (R&D Systems) com sensibilidade de 8,25 pg/mL. O ensaio foi realizado segundo as indicações do fabricante. A concentração de PGE₂ foi determinada utilizando como referência uma curva padrão diluída de forma seriada, sendo o menor valor detectado de 19.6 pg/mL. A leitura da placa foi realizada em leitor de ELISA (Multiskan EFLAB, Helsinki, Finland) com comprimento de onda de 492 nm.

6.10 Quantificação relativa de mRNA para enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) por RT-PCR em tempo real

Conforme descrito no item 6.2, as macroculturas de monócitos normais (1×10^6 monócitos/ml) foram incubados durante 18 horas, em tensão de 5% de CO₂ à 37°C, na presença dos diferentes tratamentos, com posterior desafio com *P. brasiliensis* (Pb18 ou Pb265) durante 4 horas. Após cada período, os sobrenadantes foram retirados e as células aderentes foram avaliadas pela técnica de RT-PCR em tempo real para a detecção de mRNA para iNOS.

6.10.1. Extração de RNA:

O RNA total dos monócitos cultivados foi extraído utilizando o Kit de extração RNAspin (GE Healthcare, Reino Unido). Com o objetivo de eliminar o DNA residual genômico extraído junto com o RNA, as amostras foram tratadas com a enzima DNase (DNase I), que acompanha o Kit. Ao final, o RNA foi eluído em 50 µl de água livre de RNase.

O RNA obtido foi quantificado com o auxílio de espectrofotômetro NanoDrop (NP-1000) a 260nm e 280nm.

6.10.2 Obtenção do cDNA

Após a extração do RNA foi obtido o cDNA utilizando o Kit de Transcrição Reversa High-Capacity (Applied Biosystems). A cada 2 µg de amostra de RNA foram adicionados 2,0 µL de Tampão da reação (RT 10X), 0,8 µL da mistura de nucleotídeos (dNTP- 25x) 100 mM, 2,0 µl de Random Primers, 1,0 µL da enzima Transcriptase Reversa, 1,0 µL de inibidor de RNase (GeneAmp – Applied Biosystems) e 3,2 µL de H₂O deionizada tratada com DEPC.

Para obtenção do cDNA, foi programado o aparelho Termociclador Mastercycler (Eppendorf) com as condições especificadas pelo Kit de Transcrição Reversa High-Capacity com ciclo de 25°C por 10min para ligação dos primers, 37°C por 120 min para a transcrição reversa e 85°C por 5 min para a desnaturação da Transcriptase Reversa. O volume final da reação foi de 20 µL.

6.10.3 RT-PCR em tempo real

Para detecção da produção de mRNA para iNOS foram utilizados *primers* específicos. Para iNOS *primer sense* 5'- GCG TTA CTC CAC CAA CAA TGG CAA -3' e *anti-sense* 5' ATA GAG GAT GAG CTG AGC ATT CCA -3'. Como controle endógeno foram utilizados seqüências de primers para GAPDH (Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase) , *primer sense* 5'- TGG TAT CGT GGA AGG ACT CAT GAC -3' e *primer anti-sense* 5'-ATG CCA GTG AGC TTC CCG

TTC AGC -3'. Os primers foram desenhados utilizando o software IDTSciTools ([http:// www.idtdna.com](http://www.idtdna.com)) a partir de seqüência publicada no *Genebank*.

A reação de RT-PCR em tempo real para a quantificação relativa de mRNA de iNOS, foi desenvolvida no aparelho de PCR em tempo real modelo 7300 (APPLIED Biosystems, EUA) com o uso do Kit Power Syber Green PCR Máster Mix (Applied Biosystems, EUA) conforme as instruções do fabricante, em um volume final de 20 µL, com adição de 4 µL da amostra de cDNA (obtido conforme item 5.12.2) por reação e 300 nM de cada primer. As condições da reação foram: 95°C /10 minutos, 40 ciclos de 95°C /15 segundos, 60°C /1 minuto e o estágio de dissociação foi de 95° /15 segundos, 60°C /15 segundos e 95° /15 segundos. Em todos os ensaios as amostras foram processadas em duplicata.

Em todas as placas foi adicionado o cDNA de uma mesma amostra utilizada para a construção da curva padrão, sendo que, para a análise da expressão de iNOS, a amostra foi diluída de forma seriada na concentração de 1:2 e, para a análise do controle endógeno de GAPDH a amostra foi diluída da mesma forma, na concentração 1:10. Os valores de expressão relativa para iNOS foram então obtidos com o auxílio do programa SDS versão 1.2.3 (*Sequence Detection Systems 1.2.3 – 7300 Real Time PCR System – Applied Biosystems, EUA*) e posteriormente normalizados pelos valores de expressão relativa do GAPDH.

7- ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software Graphpad Instat San Diego, California – USA⁸⁹. 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



8- RESULTADOS

8.1 ATIVIDADE FUNGICIDA

Os resultados referentes ao efeito das prostaglandinas sobre a atividade fungicida são mostrados na Figura 1. Em relação à dose de INDO utilizada nos experimentos, seguimos protocolo já estabelecido em nossos laboratórios, usando a dose de 20 $\mu\text{g/mL}$. Podemos observar que as células não ativadas não apresentam atividade fungicida contra a cepa Pb18. No entanto, essa atividade foi significativa após a incubação das células com INDO, IFN- γ e principalmente IFN- γ +INDO. Chama a atenção que após a ativação com TNF- α ou GM-CSF as porcentagens de atividade fungicida foram significativamente maiores do que as detectadas após ativação com o IFN- γ , bem como após a incubação simultânea destas células com estas citocinas e INDO. O mesmo perfil de resposta foi detectado para a cepa Pb265. No entanto, as porcentagens detectadas em todas as coculturas foram sempre significativamente maiores do que as detectadas para a cepa Pb18.

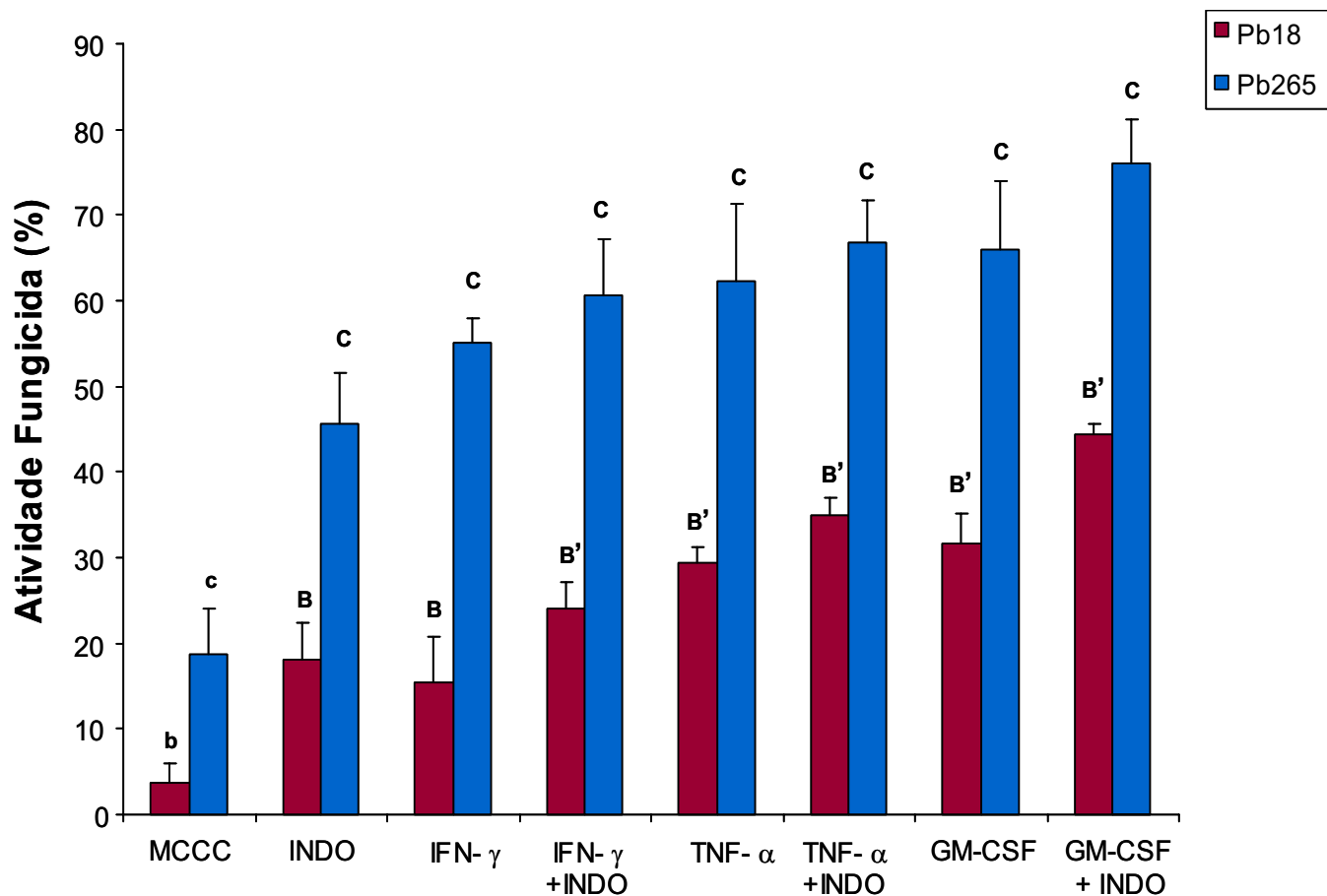


FIG.1 Atividade fungicida de monócitos humanos pré-incubados com MCCC, INDO (20 µg/ml), IFN-γ (50U/ml), IFN-γ (50U/ml) + INDO (20 µg/ml), TNF-α (50U/ml), TNF-α (50U/ml) + INDO (20 µg/ml), GM-CSF (50U/ml) ou GM-CSF (50U/ml) + INDO (20 µg/ml), e desafiados com as cepas Pb18 ou Pb265 de *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em média ± erro padrão. (n=20 indivíduos)

Análise estatística: Teste de Tukey

b < B < B' p<0,001

c < C p<0,01

B - B' < C p<0,001

MCCC = Meio de Cultura de Células Completo

8.2- PRODUÇÃO DE H_2O_2

Como observado na Figura 2, detectamos que monócitos incubados somente com MCCC liberaram níveis substanciais de H_2O_2 que, no entanto, aumentaram de forma significativa após todos os tratamentos.

Após o desafio com a cepa Pb18, tanto monócitos não ativados como monócitos submetidos aos diversos tratamentos 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 os tratamentos. Níveis maiores do metabólito foram obtidos após a incubação com INDO, $IFN-\gamma$ ou $TNF-\alpha$, quando comparados aos detectados pelas células não ativadas (MCCC+Pb18). Níveis ainda maiores foram observados após os tratamentos com $IFN-\gamma$ +INDO, $TNF-\alpha$ +INDO, GM-CSF ou GM-CSF+INDO.

Em relação às culturas desafiadas com a cepa Pb265, níveis menores do metabólito, em relação às culturas não desafiadas, foram detectados somente nas culturas não tratadas. No entanto, essa inibição foi menor do que a observada após o desafio com a cepa Pb18. De forma semelhante ao observado para a cepa Pb18, diferenças importantes foram detectadas entre os tratamentos. Quando os monócitos foram incubados com INDO, $IFN-\gamma$, $IFN-\gamma$ +INDO ou $TNF-\alpha$, houve um aumento na produção de H_2O_2 , quando comparada à detectada para as células não ativadas (MCCC+Pb265). Níveis ainda maiores foram detectados após os tratamentos dessas células com $TNF-\alpha$ +INDO, GM-CSF ou GM-CSF+INDO. Chama a atenção, que os níveis de H_2O_2 obtidos para todas as culturas foram sempre maiores que os detectados com a cepa Pb18.

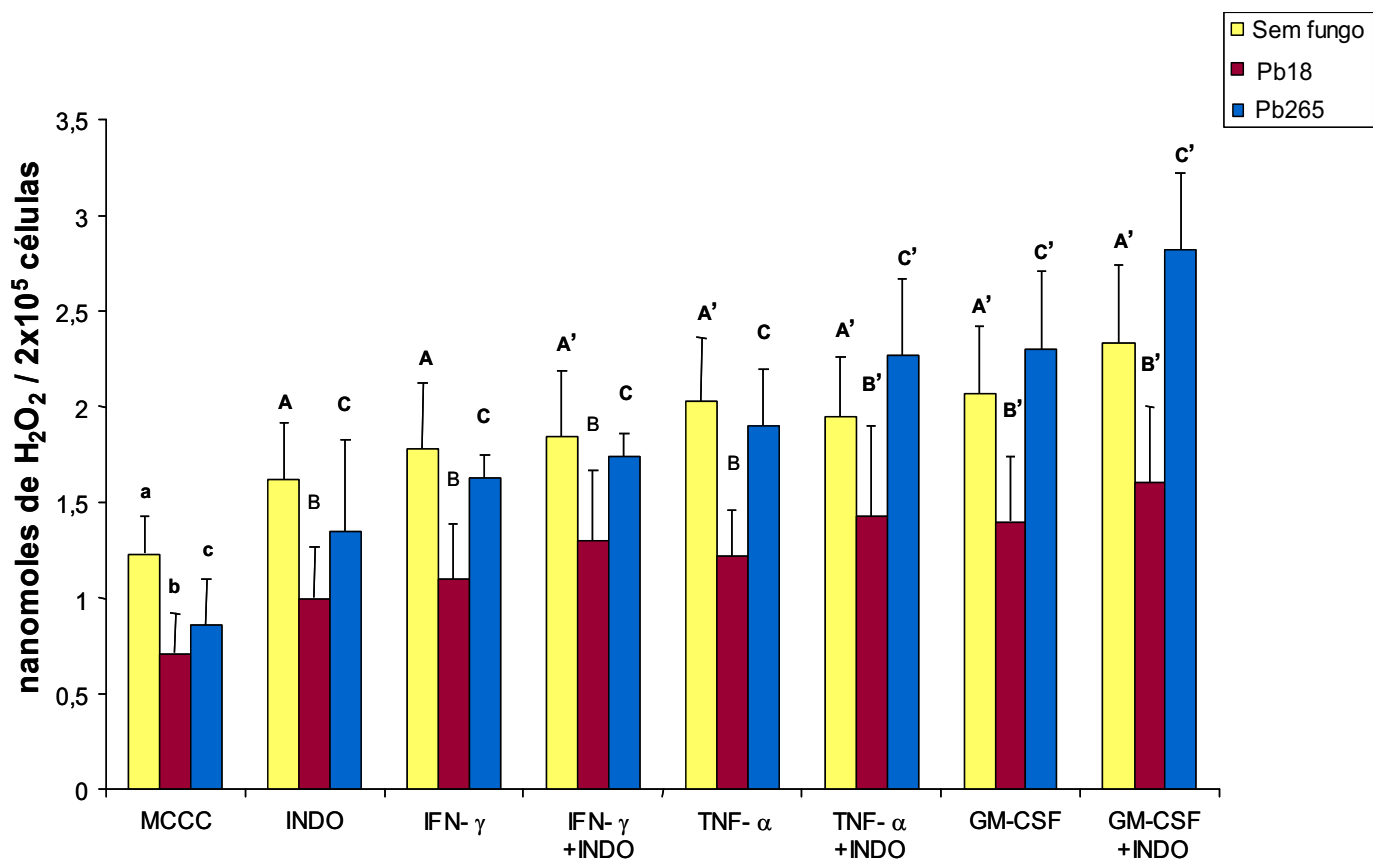


FIG.2 Produção de H_2O_2 por monócitos humanos pré-incubados com MCCC, INDO (20 $\mu g/ml$), IFN- γ (50U/ml), IFN- γ (50U/ml) + INDO (20 $\mu g/ml$), TNF- α (50U/ml), TNF- α (50U/ml) + INDO (20 $\mu g/ml$), GM-CSF (50U/ml) ou GM-CSF (50U/ml) + INDO (20 $\mu g/ml$), e desafiados com as cepas Pb18 ou Pb265 de *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão. (n=20 indivíduos)

Análise estatística: Teste de Tukey

a < A < A' p<0,001

b < B < B' p<0,01

c < C < C' p<0,001

b < c < a p<0,01

B - B' < A - A' p<0,01

B - B' < C - C' p<0,01

MCCC = Meio de Cultura de Células Completo

8.3- EXPRESSÃO DE mRNA A PARA ENZIMA iNOS E PRODUÇÃO DE NO

Para avaliar se o NO, da mesma forma que H₂O₂, está envolvido nas diferenças observadas na atividade fungicida contra o *P. brasiliensis* realizamos experimentos utilizando duas abordagens. A primeira foi avaliar o papel deste metabolito, indiretamente, através da quantificação da expressão de NO sintase, a enzima responsável pela conversão da L-arginina em NO. A segunda, foi analisar os níveis desse metabólito nos sobrenadantes das coculturas. Os resultados referentes a estes ensaios são mostrados na Figura 3 e 4.

Podemos observar na Figura 3 que todas as culturas expressaram maiores concentrações de mRNA para iNOS em relação à cultura controles de 0h. Com relação aos tratamentos observamos um aumento significativo na expressão de mRNA somente após a incubação com IFN- γ e IFN- γ +INDO em relação às culturas tratadas somente com meio (MCCC).

Após o desafio com a cepa Pb18 do fungo detectamos, para todas as culturas, uma diminuição significativa da expressão de iNOS quando comparada à detectada para as culturas não desafiadas, com exceção das tratadas com TNF- α ou TNF- α +INDO. No entanto, quando analisamos os resultados obtidos após o desafio, detectamos um aumento significativo da expressão da enzima após todos os tratamentos em relação às culturas não tratadas (MCCC+Pb18).

Em relação à cepa Pb265, de forma diferente ao observado para a cepa Pb18, não detectamos uma diminuição nos níveis do metabólito, quando comparados ao obtidos com as culturas não desafiadas. Quando analisamos os resultados obtidos após o desafio, detectamos um aumento significativo da expressão da enzima após todos os tratamentos em relação às culturas não tratadas (MCCC+Pb265). Além disso, a expressão de mRNA foi sempre significativamente maior que a detectada para a cepa Pb18, em todos os tratamentos.

Os resultados referentes à expressão de mRNA para GAPDH (controle endógeno), foram constantes em todos os tratamentos (dados não mostrados).

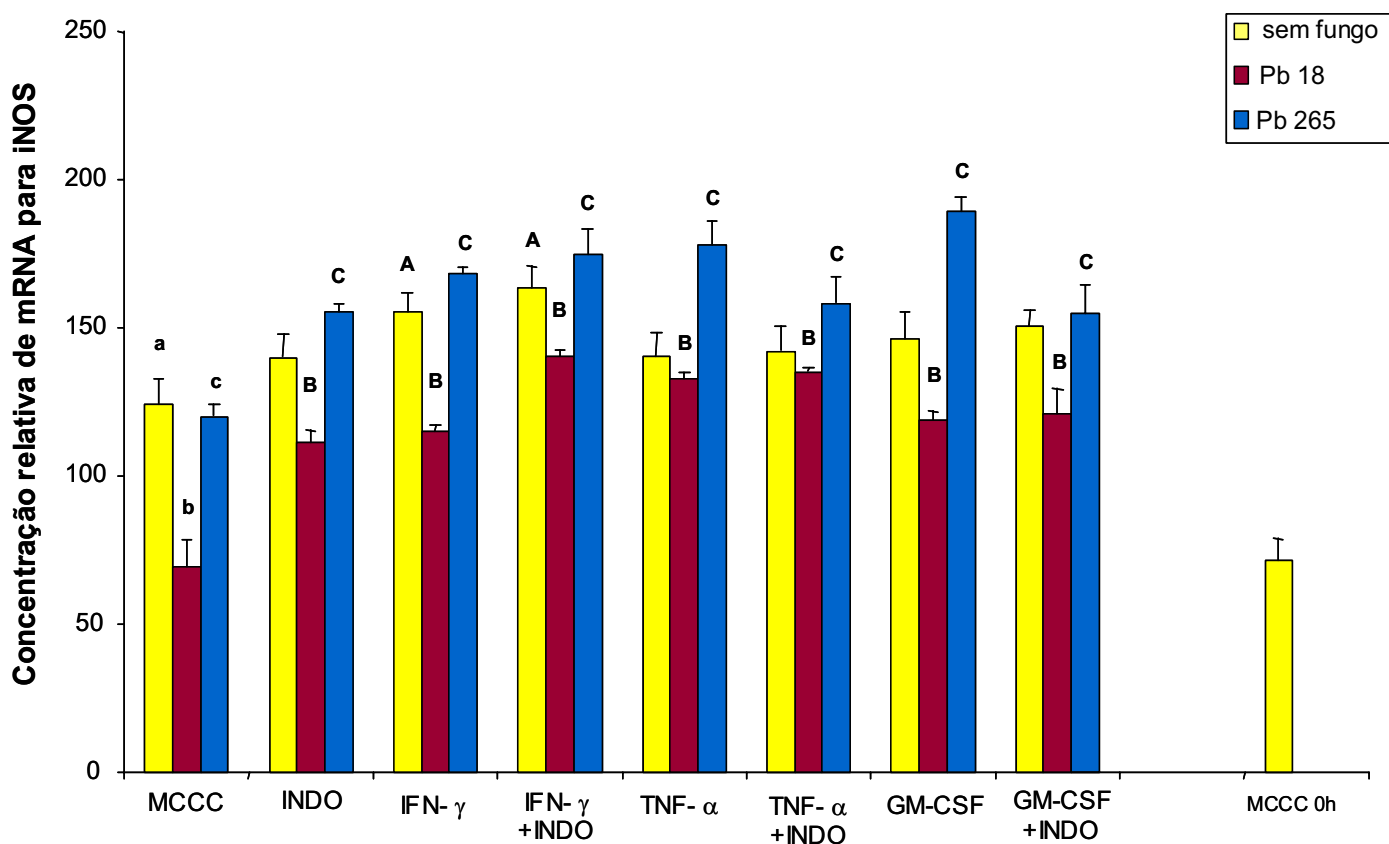


FIG.3 Concentração relativa de mRNA para iNOS expressa por monócitos humanos pré-incubados com MCCC, INDO (20 µg/ml), IFN-γ (50U/ml), IFN-γ (50U/ml) + INDO (20 µg/ml), TNF-α (50U/ml), TNF-α (50U/ml) + INDO (20 µg/ml), GM-CSF (50U/ml) ou GM-CSF (50U/ml) + INDO (20 µg/ml), e desafiados com as cepas Pb18 ou Pb265 de *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em média ± erro padrão. (n=20 indivíduos)

Análise estatística: Teste de Tukey

a < A p<0,05

b < B p<0,01

c < C p<0,01

b - B < a - A p<0,05

b - B < c - C p<0,01

MCCC = Meio de Cultura de Células Completo

Com relação à dosagem de NO, a Figura 4 mostra os resultados referentes à dosagem desse metabólito nas diferentes culturas. As células incubadas somente com MCCC liberaram níveis consideráveis de NO, que aumentaram significativamente após todos os tratamentos, não havendo diferenças importantes entre eles. No entanto, após o desafio com as cepas Pb18 e Pb265, observamos uma diminuição significativa dos níveis desse metabólito em todas as culturas quando comparadas com as culturas sem desafio. Assim, nenhum dos tratamentos empregados foi capaz de reverter o efeito inibitório do fungo sobre a produção desse metabólito.

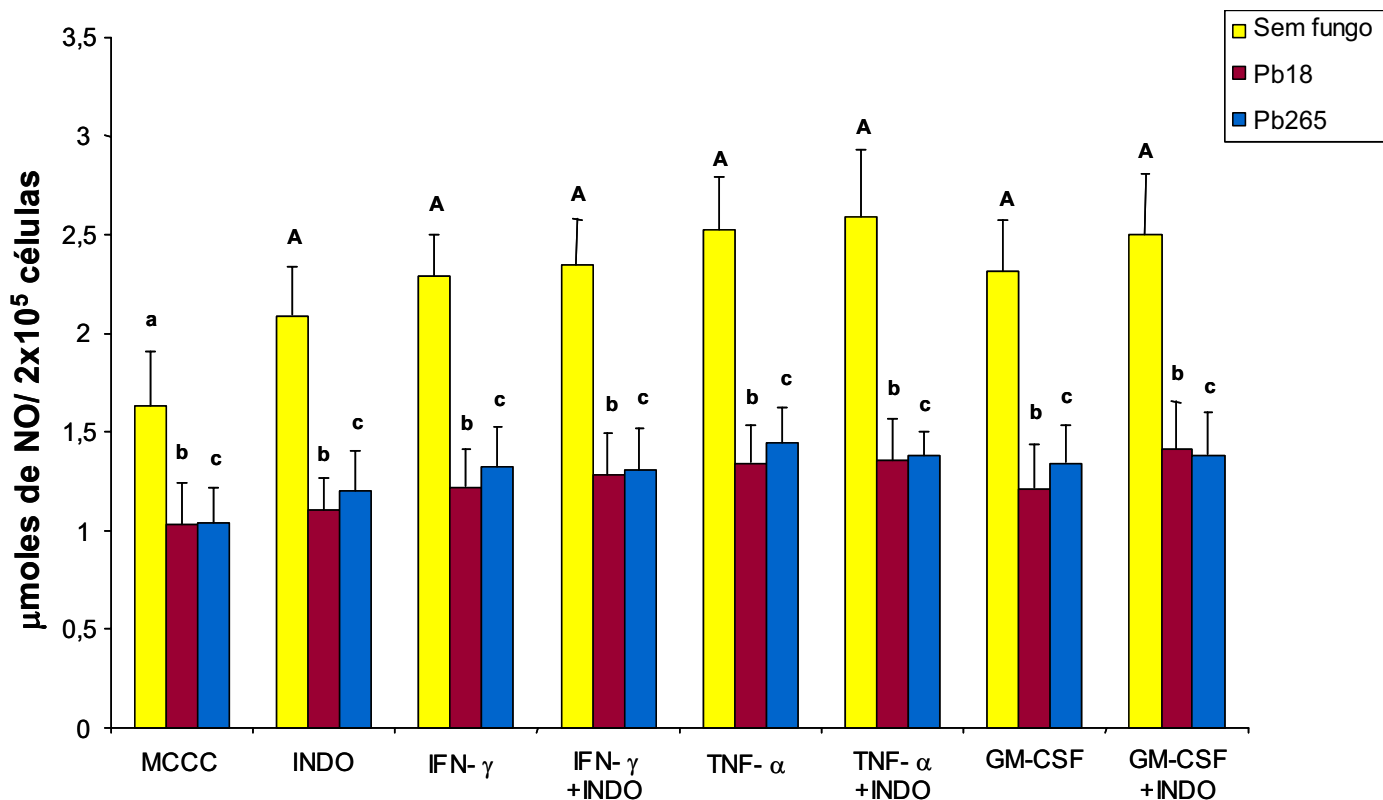


FIG.4 Produção de NO por monócitos humanos pré-incubados com MCCC, INDO (20 µg/ml), IFN-γ (50U/ml), IFN-γ (50U/ml) + INDO (20 µg/ml), TNF-α (50U/ml), TNF-α (50U/ml) + INDO (20 µg/ml), GM-CSF (50U/ml) ou GM-CSF (50U/ml) + INDO (20 µg/ml), e desafiados com as cepas Pb18 ou Pb265 de *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em média ± erro padrão.

Análise estatística: Teste de Tukey

a < A p < 0,05

b - c < a - A p < 0,001

MCCC = Meio de Cultura de Células Completo

8.4- PRODUÇÃO DE TNF- α

Os resultados relativos a esse ensaio são mostrados na Figura 5. Observamos que monócitos incubados somente com MCCC liberaram baixos níveis de TNF- α que aumentaram ligeiramente após a incubação com INDO, mas foram significativamente maiores quando as células foram ativadas com IFN- γ , TNF- α ou GM-CSF, ou incubados simultaneamente com as citocinas e INDO.

Após o desafio com a cepa Pb18, tanto monócitos não ativados como os submetidos aos diversos tratamentos liberaram níveis significativamente maiores da citocina, quando comparados aos liberados pelas culturas não desafiadas. Adicionalmente, quando analisamos os resultados obtidos após o desafio, detectamos diferenças importantes entre os tratamentos. Com exceção das culturas ativadas com TNF- α , todas as demais liberaram concentrações significativamente maiores da citocina quando comparadas às culturas controle (MCCC).

Em relação às culturas desafiadas com a cepa Pb265, observamos que os monócitos são capazes de produzir níveis ainda maiores de TNF- α quando comparados aos não ativados e não desafiados pelo fungo ou com as culturas de monócitos desafiados com a cepa Pb18. Esse aumento foi ainda maior nas culturas ativadas com IFN- γ e GM-CSF, ou incubadas com IFN- γ +INDO, TNF- α +INDO e GM-CSF+INDO, em relação às culturas não ativadas.

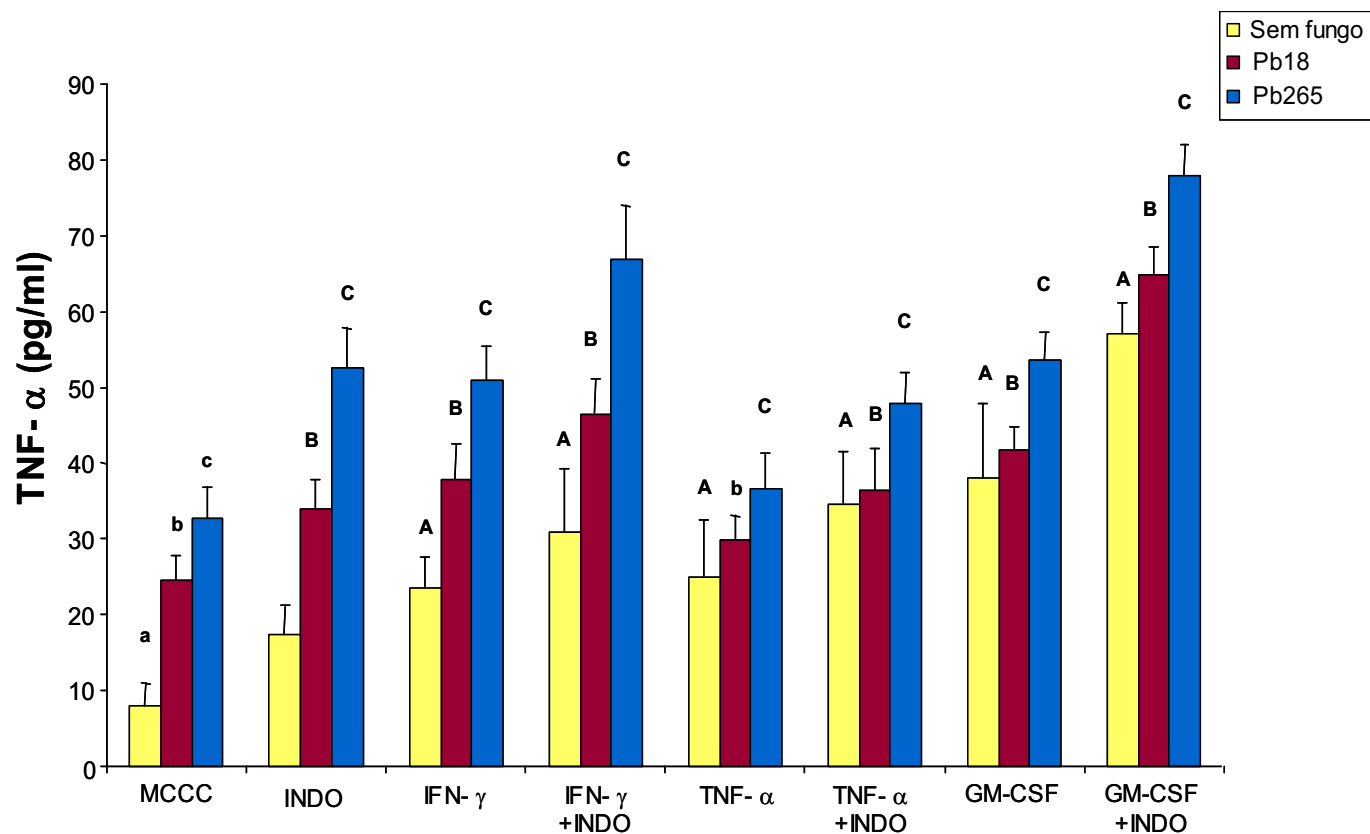


FIG.5 Produção de TNF- α por monócitos humanos pré-incubados com MCCC, INDO (20 μ g/ml), IFN- γ (50U/ml), IFN- γ (50U/ml) + INDO (20 μ g/ml), TNF- α (50U/ml), TNF- α (50U/ml) + INDO (20 μ g/ml), GM-CSF (50U/ml) ou GM-CSF (50U/ml) + INDO (20 μ g/ml), e desafiados com as cepas Pb18 ou Pb265 de *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão. (n=20 indivíduos)

Análise estatística: Teste de Tukey

a < A $p < 0,01$

b < B $p < 0,01$

c < C $p < 0,01$

a < b - c $p < 0,001$

A < B - C $p < 0,001$

MCCC = Meio de Cultura de Células Completo

8.5- PRODUÇÃO DE IL-10

Os resultados relativos à esse ensaio podem ser analisados na Figura 6. Observamos que os monócitos incubados somente com MCCC são capazes de produzir IL-10. No entanto, quando as células são tratadas com INDO observamos uma diminuição significativa na produção desta citocina, quando comparadas com as culturas não tratadas (MCCC). Ao contrário, um significativo aumento foi detectado após a ativação com as 3 citocinas. Quando as culturas foram ativadas com as diferentes citocinas e tratadas concomitantemente com INDO observamos uma diminuição significativa na produção quando comparados com as culturas não tratadas.

As células desafiadas com a cepa Pb18 foram capazes de produzir maiores níveis de IL-10 em todos os tratamentos, quando comparadas às não desafiadas. No entanto, quando as células são tratadas com INDO observamos uma diminuição na produção desta citocina, em relação às culturas não tratadas (MCCC+Pb18). Ao contrário, um significativo aumento foi detectado após a ativação com as 3 citocinas. Quando as culturas foram ativadas com as diferentes citocinas e tratadas concomitantemente com INDO observamos uma diminuição significativa na produção quando comparados com as culturas não tratadas. O mesmo perfil de resposta foi detectado para a cepa Pb265. No entanto, os níveis em todas as culturas foram menores que os detectados para a cepa Pb18.

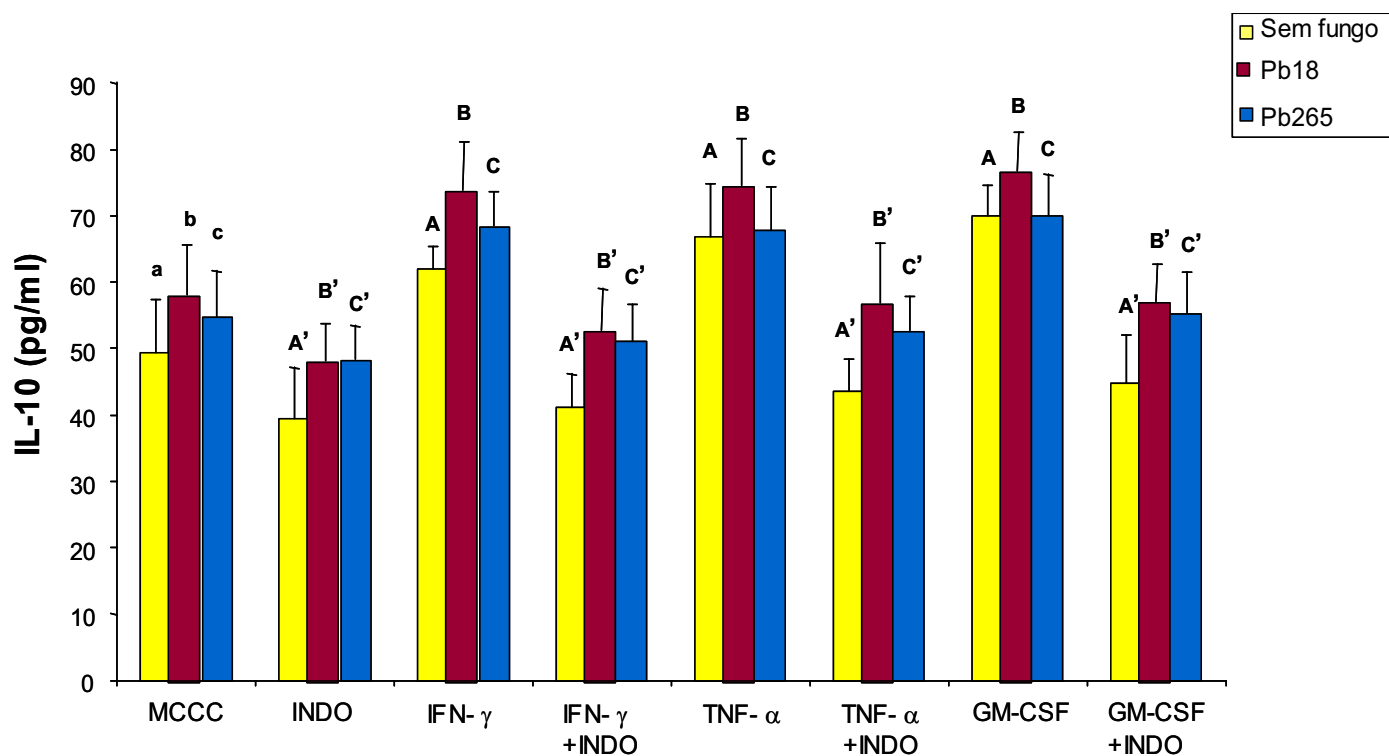


FIG.6 Produção de IL-10 por monócitos humanos pré-incubados com MCCC, INDO (20 μ g/ml), IFN- γ (50U/ml), IFN- γ (50U/ml) + INDO (20 μ g/ml), TNF- α (50U/ml), TNF- α (50U/ml) + INDO (20 μ g/ml), GM-CSF (50U/ml) ou GM-CSF (50U/ml) + INDO (20 μ g/ml), e desafiados com as cepas Pb18 ou Pb265 de *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão. (n=20 indivíduos)

Análise estatística: Teste de Tukey

a < A p<0,01

A' < a < A p<0,05

b < B p<0,001

B' < b < B p< 0,05

c < C p<0,05

C' < c < C p< 0,05

MCCC = Meio de Cultura de Células Completo

8.6- PRODUÇÃO DE IL-6

Os resultados relativos a produção de IL-6 podem ser analisados na Figura 7. De forma semelhante ao observado para IL-10 detectamos que os monócitos incubados somente com MCCC são capazes de produzir IL-6. Quando as células são tratadas com INDO observamos uma diminuição na produção desta citocina. Níveis significativamente maiores foram observados após a ativação com IFN- γ , TNF- α ou GM-CSF, quando comparados com MCCC. No entanto, nas culturas ativadas com as diferentes citocinas e tratadas concomitantemente com INDO observamos uma diminuição na produção de IL-6, quando comparados com as culturas não tratadas.(dados não significativos).

Nas culturas não ativadas e desafiadas com a cepa Pb18 ou a cepa Pb265, observamos um aumento na produção de IL-6. Esse aumento foi significativo após a ativação das culturas com IFN- γ , TNF- α ou GM-CSF, quando comparados com as culturas não ativadas (MCCC+Pb18 ou Pb265). Quando as culturas foram ativadas com as diferentes citocinas e tratadas concomitantemente com INDO observamos uma diminuição na produção quando comparados com as culturas não tratadas.

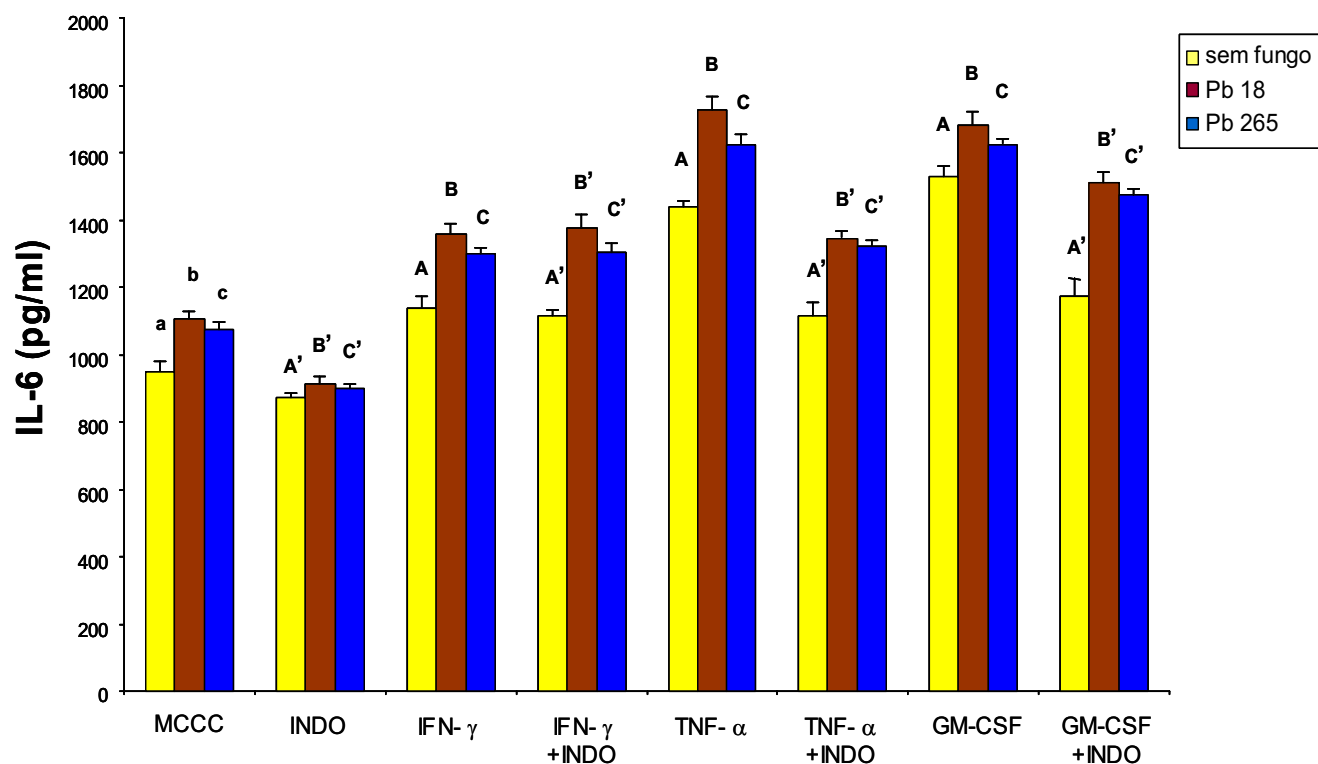


FIG.7 Produção de IL-6 por monócitos humanos pré-incubados com MCCC, INDO (20 µg/ml), IFN-γ (50U/ml), IFN-γ (50U/ml) + INDO (20 µg/ml), TNF-α (50U/ml), TNF-α (50U/ml) + INDO (20 µg/ml), GM-CSF (50U/ml) ou GM-CSF (50U/ml) + INDO (20 µg/ml), e desafiados com as cepas Pb18 ou Pb265 de *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em média ± erro padrão. (n=20 indivíduos)
Análise estatística: Teste de Tukey

a < A p<0,01
A' < a < A p<0,05
b < B p<0,001
B' < b < B p<0,05
c < C p<0,05
C' < c < C p<0,05

MCCC = Meio de Cultura de Células Completo

8.7- PRODUÇÃO DE PROSTAGLANDINA E₂ (PGE₂)

Para confirmarmos que os efeitos sobre a atividade fungicida, produção de H₂O₂, NO, TNF- α , IL-10 e IL-6, bem como sobre a expressão de mRNA para a enzima iNOS, estão relacionados com a produção de PGE₂ por monócitos, induzida pelo *P. brasiliensis*, avaliamos a concentração deste mediador nos sobrenadantes das mesmas culturas usadas para os ensaios anteriores.

Conforme observado na Figura 8, os monócitos não ativados e não desafiados com o *P. brasiliensis* liberaram níveis substanciais de PGE₂. Esses níveis foram ainda maiores quando essas células foram ativadas com IFN- γ , TNF- α ou GM-CSF. No entanto, os resultados obtidos com os monócitos tratados com INDO, ou incubados simultaneamente com as citocinas e INDO, revelaram uma diminuição significativa nos níveis de PGE₂ em relação às culturas não tratadas.

Após o desafio com as cepas Pb18 e Pb265, observamos um aumento significativo nos níveis de PGE₂ em todas as culturas quando comparadas com as culturas sem desafio. No entanto, os níveis foram significativamente menores nas culturas tratadas com INDO quando comparadas às não tratadas.

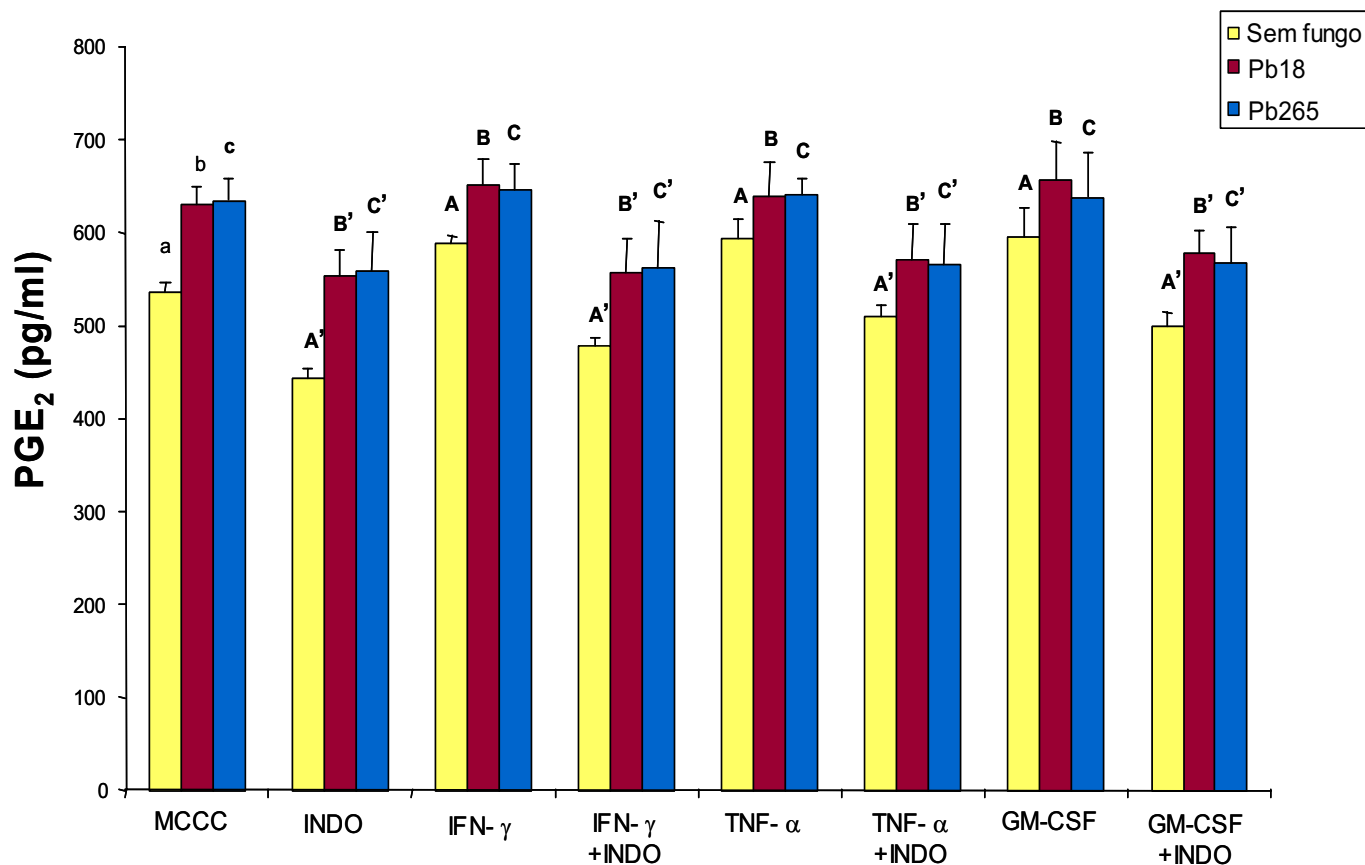


FIG.8 Produção de PGE_2 por monócitos humanos pré-incubados com MCCC, INDO (20 $\mu\text{g/ml}$), IFN- γ (50U/ml), IFN- γ (50U/ml) + INDO (20 $\mu\text{g/ml}$), TNF- α (50U/ml), TNF- α (50U/ml) + INDO (20 $\mu\text{g/ml}$), GM-CSF (50U/ml) ou GM-CSF (50U/ml) + INDO (20 $\mu\text{g/ml}$), e desafiados com as cepas Pb18 ou Pb265 de *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão. (n=20 indivíduos)

Análise estatística: Teste de Tukey

a < A p<0,01

A' < a < A p<0,01

a < b - c p<0,01

b < B p<0,05

B' < b < B p<0,01

c < C p<0,05

C' < c < C p<0,01

MCCC = Meio de Cultura de Células Completo

DISCUSSÃO



9- DISCUSSÃO

O primeiro objetivo do presente trabalho foi avaliar se o efeito modulador das PGs sobre a atividade fungicida de monócitos humanos ativados ou não com citocinas e desafiados o *P. brasiliensis*, ocorre através da inibição da liberação de H_2O_2 e/ou NO. Assim, nos primeiros experimentos comparamos a atividade fungicida contra as duas cepas após incubação com INDO ou ativação com as e/ou simultâneo tratamento com INDO. Os resultados mostraram diferenças importantes em relação aos tratamentos e às cepas utilizadas. A atividade fungicida contra as duas cepas foi significativamente maior após a incubação com INDO e principalmente após a ativação com as citocinas quando comparadas às culturas tratadas somente com MCCC. No entanto, maiores respostas foram detectadas com TNF- α ou GM-CSF em relação ao IFN- γ . Chama ainda atenção uma resposta significativamente maior contra a cepa Pb265, após todos os tratamentos, quando comparada à cepa Pb18. Uma atividade fungicida significativamente maior foi detectada para todas as culturas, após tratamento com INDO, confirmando dados anteriores de nosso laboratório, que mostram que as PGs secretadas pelos monócitos em resposta ao *P. brasiliensis* exercem uma regulação autócrina sobre a atividade fungicida dessas células e que, a ativação da célula fagocitária é necessária para compensar os mecanismos inibitórios desses mediadores⁶². No entanto, o presente estudo deixa claro, que o mecanismo compensatório é mais eficaz na resposta à cepa de baixa virulência e com a incubação com TNF- α e GM-CSF em relação ao IFN- γ .

Dentro deste contexto, analisamos as possíveis associações entre essas diferenças e os níveis de H_2O_2 liberados. Os resultados mostram claramente que as duas cepas, inibem a liberação de H_2O_2 por monócitos humanos, revelando um mecanismo de escape do fungo frente aos mecanismos efetores da célula fagocitária. Após o tratamento com INDO observamos maiores níveis de H_2O_2 do que as células não tratadas, mostrando que o efeito modulador negativo das PGs sobre a atividade fungicida é mediado, pelo menos parcialmente, pela inibição dos níveis de H_2O_2 . No entanto, fica claro que após a

ativação pelas citocinas, esse efeito inibidor é revertido, devido a uma maior capacidade das células produzirem o metabólito. Esse processo ainda é muito mais evidente quando as células são ativadas e desafiadas com a cepa Pb265.

O escape do metabolismo oxidativo tem sido relatado para diversos outros microrganismos. Enquanto em alguns patógenos, este escape se manifesta como não indução da liberação de metabólitos do O_2 (*Leishmania donovani*⁹⁰, *H. capsulatum*⁹¹ e *M. leprae*⁹²), em outros ocorre uma inibição destes metabólitos (*Yersinia pestis*⁹³ e o *H. capsulatum*⁹⁴). Alguns autores sugerem uma associação entre a indução da produção de produtos do metabolismo do ácido araquidônico principalmente os da via da ciclooxygenase, como as PGs, e a falha de certos microrganismos em desencadear o *burst* oxidativo⁹⁴.

Em uma tentativa de estabelecer para a liberação de NO as mesmas associações detectadas para a H_2O_2 , realizamos experimentos utilizando duas abordagens. A primeira foi a quantificação dos níveis desse metabólito nos sobrenadantes das coculturas. Outra foi, a avaliação indireta desses níveis através da análise da expressão da enzima responsável pela transformação da arginina em NO. Detectamos que, de forma semelhante ao observado para a H_2O_2 , o desafio com o fungo Pb18 induziu uma diminuição na expressão de mRNA para a enzima NO sintase induzível. No entanto, após o tratamento com INDO e/ou ativação com as citocinas detectamos um aumento na expressão de mRNA. Após a incubação com a cepa Pb265, detectamos apenas uma ligeira diminuição na expressão da enzima, em relação às células não desafiadas. Após o tratamento com INDO ou ativação com citocinas a expressão apresentou-se bastante aumentada diferindo significativamente da apresentada pela cepa Pb18. Esses resultados levam-nos a um raciocínio semelhante ao elaborado para os ensaios de H_2O_2 . Assim, a cepa Pb18 inibe a expressão da enzima iNOS, pelo menos parcialmente, por um mecanismo dependente de PGs. Essa inibição é compensada pelo processo de ativação com as diferentes citocinas. No caso da cepa Pb265 apesar de não haver um processo de inibição tão evidente, podemos considerar que ocorre também uma modulação por PGs, pois com exceção das

culturas tratadas com TNF- α ou GM-CSF, a expressão apresenta-se aumentada após a incubação com INDO.

Com relação ao processo de ativação celular para a expressão de mRNA para iNOS, estudos têm mostrado que a ativação com TNF- α ou IFN- γ induzem a expressão desta enzima⁹⁵⁻⁹⁷. Weinberg et al,⁹⁸ mostraram que culturas de monócitos humanos estimulados com LPS e/ou IFN- γ por 8 horas, apresentam aumento significativo da expressão de mRNA para iNOS. Outro estudo demonstrou que o tratamento de monócitos humanos com IFN- γ ou IFN- γ +LPS, aumenta significativamente a expressão da enzima iNOS bem como o “killing” de *Plasmodium falciparum*⁹⁹. Segundo Santos et al.,¹⁰⁰ culturas de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 ativadas por IFN- γ são capazes de expressar maiores quantidades de mRNA para a enzima iNOS após o tratamento com LPS. Trabalho na literatura demonstrou que, a produção endógena de IFN- γ induz o aumento de iNOS por macrófagos isolados do baço de camundongos estimulados com LPS. Culturas de macrófagos isolados de baço de camundongos *knockout* para IFN- γ resultaram em inibição significativa na expressão dessa enzima^{100,101}. Esses mesmos autores observaram inibição na expressão de iNOS em camundongos *knockout* para o receptor TNFR1 (TNFR1^{-/-}), estimulados com LPS, quando comparados com camundongos selvagens C57BL/6.

Com relação à modulação direta das PGs sobre da expressão de mRNA para iNOS, a literatura demonstra que esses mediadores são capazes de inibir ou aumentar a expressão da enzima por diferentes células, mesmo após o processo de ativação com TNF- α ou IL-1 β ¹⁰²⁻¹⁰⁴.

Ainda em relação aos ensaios de expressão da enzima iNOS, apesar do perfil de resposta observado, não podemos estabelecer para a liberação de NO, as mesmas associações feitas para a H₂O₂ e atividade fungicida. Verificamos que a modulação positiva da expressão do mRNA para iNOS não se refletiu em maiores níveis de NO liberados, uma vez que não foram detectadas diferenças entre as várias culturas após o desafio com o fungo. Acreditamos que esse efeito esteja relacionado com a capacidade do fungo escapar da ação do NO, produzindo agentes denitrificantes. Esta idéia encontra suporte na literatura uma

vez que Campos et al.,¹⁰⁵ observaram que o *P. brasiliensis* é capaz de expressar o gene PbAEST2685 que é homólogo à um gene expresso por *Fusarium oxysporum* que codifica a enzima NO redutase (NOR) que participa da denitrificação, um processo realizado por bactérias e fungos¹⁰⁶. Essa atividade denitrificante tem sido observada em diferentes fungos leveduriformes¹⁰⁷⁻¹¹⁰. Parte deste processo denitrificante dos fungos está associado com a cadeia respiratória junto com a síntese de ATP¹¹¹. Estudo desenvolvido por Nakahara e Shoun,¹¹² foi o primeiro exemplo da denitrificação pelos fungos, no qual se demonstrou que o fungo *Fusarium oxysporum* produz a enzima NOR, responsável pela detoxificação do NO, convertendo este metabólito em N₂O.

Nittler et al.,¹¹³ demonstraram que após o contato com reativos intermediários do nitrogênio (RNI) o *Histoplasma capsulatum* é capaz de expressar o gene NOR1, responsável pela resistência do fungo contra esses metabólitos. Os autores consideram algumas hipóteses que podem explicar a indução desse gene após o contato com RNI. Primeiro, uma vez que os RNIs são conhecidos por provocarem danos celulares como lise do DNA, degradação de proteínas e lipídios, a indução desses genes pode representar um mecanismo de reparo contra os danos. Segundo, a expressão do gene NOR1 codifica a enzima NO redutase, levando a uma inibição direta na produção de NO e seus intermediários. Terceiro, a presença de RNI pode regular a expressão de genes requeridos para a denitrificação. Assim, o *H. capsulatum* é um fungo que cresce no solo na forma de micélio e expressa constitutivamente o gene NOR1 utilizado no processo de denitrificação. Por outro lado, quando este fungo cresce na forma de levedura, o gene NOR1 é induzido somente na presença de RNIs.

Além dessa atividade denitrificante, estudos mostram que uma outra proteína codificada por genes expressos pelo *P. brasiliensis* é a peroxiredoxina que permite o escape do metabólito do nitrogênio por agir contra a formação do peroxinitrito (ONOO⁻) um composto altamente tóxico formado após a liberação de NO e O₂⁻¹¹⁴.

Um outro objetivo do presente trabalho foi avaliar se o efeito modulador das PGs sobre os mecanismos efetores da atividade fungicida está relacionado com alterações nos níveis das citocinas TNF- α , IL-10 e IL-6. No que se refere ao TNF- α , a análise dos nossos resultados permitiu-nos estabelecer uma clara associação com a produção de H₂O₂. Observamos que, nas células desafiadas com a duas cepas do *P. brasiliensis*, o tratamento com INDO e principalmente a ativação com as 3 citocinas e concomitante tratamento com INDO levou a uma maior produção de TNF- α que esteve associado com aumento nos níveis do metabólito e da atividade fungicida. Além disso, a cepa Pb265 induz uma maior produção de H₂O₂ e atividade fungicida devido a sua maior capacidade de induzir TNF- α . Assim, podemos concluir que apesar do fungo induzir um aumento na produção de TNF- α , esses níveis foram ainda maiores após a diminuição de PGs. Dentro deste contexto, para termos concentrações ideais de TNF- α e de H₂O₂, e conseqüente atividade fungicida, é necessário que ocorra um processo de ativação eficiente das células fagocitárias. Esses resultados concordam com os dados de literatura mostrando que as PGs inibem tanto a expressão de receptores como a produção de TNF- α , além da produção de outras citocinas como IL-1 β e IL-12 por macrófagos⁵¹. De forma semelhante, a PGE₂ reduz a produção de TNF- α por macrófagos peritoneais estimulados por LPS⁵⁰. Adicionalmente, estudos com macrófagos peritoneais de camundongos tratados com zimosan mostraram que a PGE₂ induz uma diminuição na produção de TNF- α , uma vez que, o tratamento com INDO aumenta significativamente a produção desta citocina⁵².

Ainda em relação à associação entre os altos níveis de TNF- α e liberação de H₂O₂, um resultado chama a atenção. Em todas as culturas desafiadas com o fungo, os níveis aumentados de TNF- α não foram capazes de elevar a liberação de H₂O₂, na proporção em que esse efeito foi detectado para as células não desafiadas. Acreditamos que esse processo inibitório após o desafio com fungo, estaria relacionado com a capacidade das duas cepas liberarem catalase, o que explicaria os níveis diminuídos desse metabólito mesmo frente aos altos níveis de TNF- α . Assim, acreditamos que além do processo de inibição da

produção de TNF- α , mediado por PGs que levou a uma diminuição dos níveis de H₂O₂, observamos também um efeito direto do fungo sobre os níveis de H₂O₂, provavelmente pela liberação de catalase.

Trabalhos têm mostrado que o *P. brasiliensis* é capaz de expressar o gene que codifica a enzima catalase peroxissomal (*PbcatP*)^{114,115}. A expressão do gene *PbcatP* foi induzida após o tratamento das culturas fúngicas com H₂O₂, e segundo os autores, a atividade da enzima codificada por este gene está relacionada com a proteção do fungo contra a produção endógena ou exógena deste metabólito. Esses autores ainda observaram que, tanto a transcrição gênica como a produção da proteína é regulada durante o desenvolvimento do *P. brasiliensis*, aumentando durante a transição da forma de micélio para a forma de levedura. Assim, alguns estudos mostram que a catalase participa do desenvolvimento e da patogenicidade dos fungos. Por exemplo, a catalase produzida por *Candida albicans* pode estar envolvida na sobrevivência do fungo no interior de neutrófilos do hospedeiro¹¹⁶. A interrupção da transcrição da enzima catalase em *Candida albicans*, resultou em uma maior sensibilidade à liberação de H₂O₂ pelos neutrófilos. Segundo Johnson et al.,¹¹⁷ a catalase desempenha um importante papel na patogenicidade do *Histoplasma capsulatum*. Os autores mostram que este fungo expressa três genes diferentes que codificam a enzima, como o *CATA*, *CATB* e *CATP*¹¹⁸ e todas as três enzimas são sintetizadas por leveduras do *H. capsulatum* durante o contato com os produtos resultantes do “burst” oxidativo dos neutrófilos.

Paris et al.,¹¹⁹ avaliaram o papel da catalase produzida por conídios e micélios do *Aspergillus fumigatus* na patogenicidade do fungo, e observaram a expressão de três catalases ativas, uma nos conídios e duas no micélio. A catalase encontrada nos conídios não é capaz de proteger esta forma do fungo contra o *burst* oxidativo dos macrófagos *in vivo*, mas protege os conídios contra a liberação de H₂O₂ *in vitro*. Dentro deste contexto, a produção de metabólitos do O₂ por macrófagos alveolares desempenha um papel essencial na defesa contra os conídios de *A. fumigatus*¹²⁰. De acordo com Calera et al.,¹²¹ a deleção do gene

que codifica catalase contribui para a destruição eficiente do *A. fumigatus* após a produção de H_2O_2 pelos fagócitos, mostrando que o gene *CAT1* tem sido considerado um suposto fator de virulência deste fungo.

Apesar de não estabelecermos uma associação entre a modulação da produção de NO e o desenvolvimento da atividade fungicida, chama a atenção, nos nossos ensaios de expressão da enzima iNOS, um mecanismo de regulação por TNF- α , semelhante ao discutido para a H_2O_2 . Assim, altos níveis de TNF- α estiveram relacionados à maior expressão enzimática. Adicionalmente, detectamos mais uma vez, maiores níveis dessa citocina sendo obtidos através de um processo de ativação que compensam os efeitos das PGs.

Para um melhor entendimento dos efeitos inibidores exercidos pelas PGs sobre os mecanismos efetores envolvidos na atividade fungicida dos monócitos humanos contra o *P. brasiliensis*, avaliamos a participação de outras citocinas como a IL-10 e IL-6 nestes processos.

Observamos que o *P. brasiliensis* induz a síntese de altos níveis de IL-10, que foram ainda maiores após a ativação com as 3 citocinas. No entanto, a incubação com INDO, diminui significativamente esses níveis em todas as culturas mostrando o efeito modulador das PGs sobre a produção dessa citocina. Chama a atenção ainda que, a produção de IL-10 após o desafio com a cepa Pb18 foi sempre maior do que com a cepa Pb265. O aumento na produção de IL-10 após o desafio com o fungo está de acordo com resultados obtidos anteriormente em nosso laboratório. Kurokawa et al.,¹²² observaram que a produção desta citocina por monócitos humanos desafiados com o *P. brasiliensis* foi maior quando comparados com as células não desafiadas. Além disso, os autores também mostram que a cepa Pb18 foi capaz de induzir níveis significativamente maiores do que a cepa Pb265. Em relação à ação das prostaglandinas, estes resultados também são esperados, uma vez que, várias publicações mostram efeito estimulatório da PGE_2 sobre a produção de IL-10 por células humanas e murinas¹²³⁻¹²⁵. Niho et al.,¹²⁶ estudando o papel da IL-10 na regulação da produção de prostaglandinas e citocinas em monócitos humanos, demonstraram que após

estimulação dos monócitos por LPS em uma primeira fase, ocorre tanto a produção de TNF- α como de PGE₂. A produção de PGE₂ seria estimulada, pelo menos parcialmente, pelo TNF- α , através de um aumento na expressão de COX-2. Subsequentemente as prostaglandinas inibiram a liberação excessiva de TNF- α e induziram a síntese de IL-10, demonstrando que os efeitos supressores da PGE₂ seriam mediados por essa citocina. Segundo os autores, o TNF- α poderia também induzir diretamente a síntese de IL-10 por um mecanismo independente de PGs. Assim, em um estágio mais tardio, uma grande quantidade de IL-10 é sintetizada inibindo substancialmente a síntese de TNF- α e PGs, assim como sua própria síntese. Dentro deste contexto, podemos considerar que o aumento da liberação de prostaglandinas induzidas pelo fungo, diminui a produção de TNF- α e aumenta os níveis de IL-10, com conseqüente inibição dos níveis de H₂O₂ e atividade fungicida. No entanto, após o processo de ativação com as diferentes citocinas, embora observamos altos níveis de PGE₂ e de IL-10, os níveis aumentados de TNF- α foram suficientes elevar a produção de H₂O₂ e conseqüente a atividade fungicida.

Como discutido em relação ao efeito do TNF- α , apesar de não estabelecermos uma associação entre modulação da produção de NO e atividade fungicida, chama a atenção, nos nossos ensaios de expressão da enzima iNOS, um mecanismo de regulação por IL-10, semelhante ao discutido para a H₂O₂. Trabalhos na literatura, mostram que a IL-10 desempenha importante função no controle de expressão de mRNA para iNOS^{127,128}. Assim, no presente estudo, podemos considerar que existe o efeito modulador da IL-10 sobre a expressão da enzima iNOS principalmente após o desafio com a cepa Pb18. No entanto, mais uma vez, após o processo de ativação celular, os monócitos são capazes de reverter os efeitos inibidores da IL-10 sobre a expressão de iNOS, devido a alta produção de TNF- α . Huang et al.,¹²⁹ observaram que a produção de IL-10 inibe a liberação de NO por atenuar a expressão da enzima iNOS, em culturas de macrófagos murinos estimuladas com LPS. Esses autores discutem a importância da produção de uma citocina antiinflamatória, como a IL-10, para a regulação da

expressão da enzima iNOS, com conseqüente regulação na produção de NO, uma vez que, a produção de níveis elevados de NO exercem efeitos tóxicos nas células próprias do hospedeiro.

Cunha et al.,¹³⁰ demonstraram que macrófagos murinos expressam altos níveis da enzima iNOS e produzem altos níveis de NO quando ativados com IFN- γ . A adição de IL-10 recombinante nas culturas dos macrófagos inibe tanto a expressão de iNOS com a produção de NO. Por outro lado, os autores observaram que nas culturas ativadas com IFN- γ e concomitantemente tratadas com IL-10 recombinante, não ocorreu a inibição de expressão da enzima e da produção de NO.

Com relação aos resultados referentes a produção de IL-6, as culturas de células desafiadas com o *P. brasiliensis* também induzem a produção de altos níveis de IL-6 pelos monócitos não ativados que, no entanto, não se alteraram após incubação das células com os diferentes tratamentos. De forma semelhante ao observado para a produção de IL-10, Kurokawa et al.,¹²² também observaram um aumento significativo na produção de IL-6 após o desafio com o *P. brasiliensis*, que mais uma vez, foi maior após o desafio com a cepa Pb18 do que com a cepa Pb265.

Em relação ao efeito das prostaglandinas sobre a produção de IL-6, os nossos resultados, mais uma vez, estão de acordo com a literatura. Nesse sentido, Berger et al.,¹³¹ observaram que a secreção de citocinas como a IL-6 e IL-10 aumentam devido à síntese de prostaglandinas endógenas, em monócitos humanos estimulados por complexos antígeno-anticorpo. A adição de prostaglandinas exógenas nessas culturas confirmam os resultados.

Outro aspecto importante em relação à IL-6 é a descrição na literatura do efeito supressor dessa citocina sobre a síntese de TNF- α .¹³² Nesse sentido, Paul et al.,¹³³ demonstraram que a IL-6 tem papel antiinflamatório importante, regulando a produção de TNF- α e a infiltração de leucócitos na meningite pneumocócica.

Estudo realizado em nosso laboratório demonstrou que a pré-incubação de monócitos humanos com IL-6, e desafiados com *P. brasiliensis*, apresentaram uma redução nos níveis de TNF- α com conseqüente inibição da atividade fungicida contra o fungo¹³⁴. Dentro deste contexto, da mesma forma como proposto para a produção de IL-10, nos nossos resultados, a ativação com as diferentes citocinas foi capaz de reverter os efeitos supressores da IL-6 induzida por PGs.

A análise conjunta dos nossos resultados permite concluir que as PGs inibem a atividade fungicida de monócitos não ativados, via indução de IL-10 e IL-6 que inibem a produção de TNF- α e conseqüentemente a liberação de H₂O₂. Adicionalmente, concluímos que o efeito inibidor das PGs sobre a atividade fungicida de monócitos humanos é compensado pelo processo de ativação com citocinas e que, o TNF- α e o GM-CSF são mais eficazes do que o IFN- γ . Esse processo envolve a elevação da produção de TNF- α pelos monócitos ativados com essas duas citocinas, com conseqüente aumento dos níveis de H₂O₂. A cepa Pb265 por induzir níveis mais elevados dessa citocina, estimula mais intensamente a produção de H₂O₂, com conseqüente aumento da atividade fungicida. Apesar dos níveis de TNF- α também regularem a expressão de mRNA para a enzima NO sintase induzível, o que de início nos levaria a considerar a participação do NO na atividade fungicida, os níveis desse metabólito foram inibidos pelo fungo, e de forma diferente do detectado para a H₂O₂, não houve compensação desses níveis após o processo de ativação, levando-nos a considerar a não participação desse metabólito nesse processo.

CONCLUSÕES



10. CONCLUSÕES

8.1- As PGs, via indução de IL-10 e IL-6, inibem a produção de TNF- α por monócitos humanos . Esse processo resulta em menor ativação celular com consequente menor liberação de H₂O₂ e o não desenvolvimento de atividade fungicida eficiente.

8.2- O efeito inibidor das PGs pode ser revertido pela ativação das células com citocinas, que resulta em maior produção de TNF- α e H₂O₂ e consequente maior atividade fungicida. O TNF- α e o GM-CSF são mais efetivos que o IFN- γ , nesse processo.

8.3- As PGs inibem a expressão de NO sintase, que é aumentada após a ativação com citocinas. No entanto esse processo não se reflete nos níveis de NO que se mostram semelhantes em todas as culturas, sugerindo a não participação desse metabólito na atividade moduladora das PGs sobre a atividade fungicida .

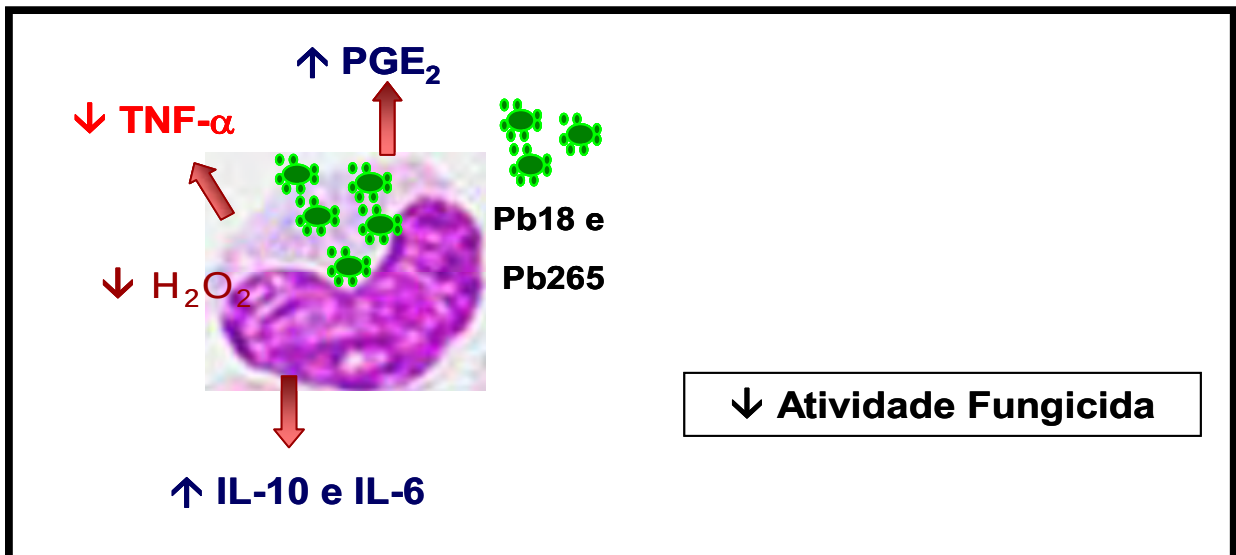
8.4- A reversão do efeito inibidor das PGs é mais eficiente quando as células são desafiadas com a cepa Pb265 em relação à Pb18, devido a capacidade dessa cepa induzir a produção de maiores níveis TNF- α .

VISUALIZAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO MODULADOR DA PGE₂ NA ATIVIDADE FUNGICIDA

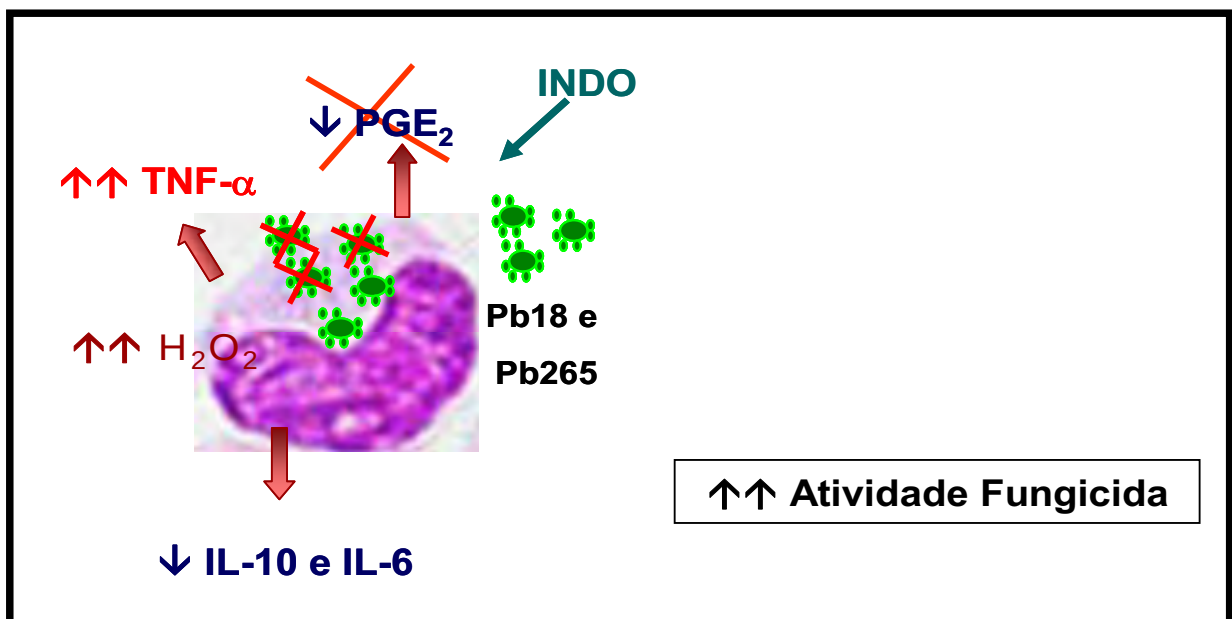


11- VISUALIZAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO MODULADOR DA PGE_2 NA ATIVIDADE FUNGICIDA

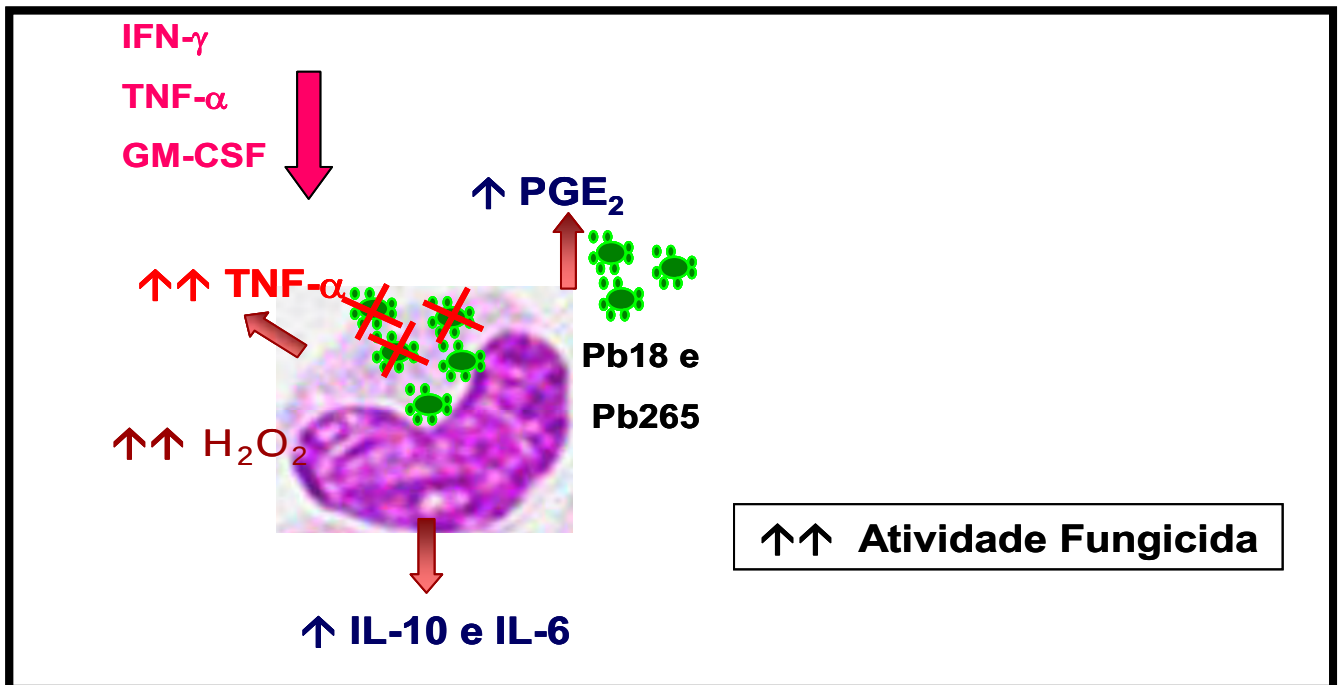
1- Efeito de PGs em monócitos humanos desafiados com *P. brasiliensis*



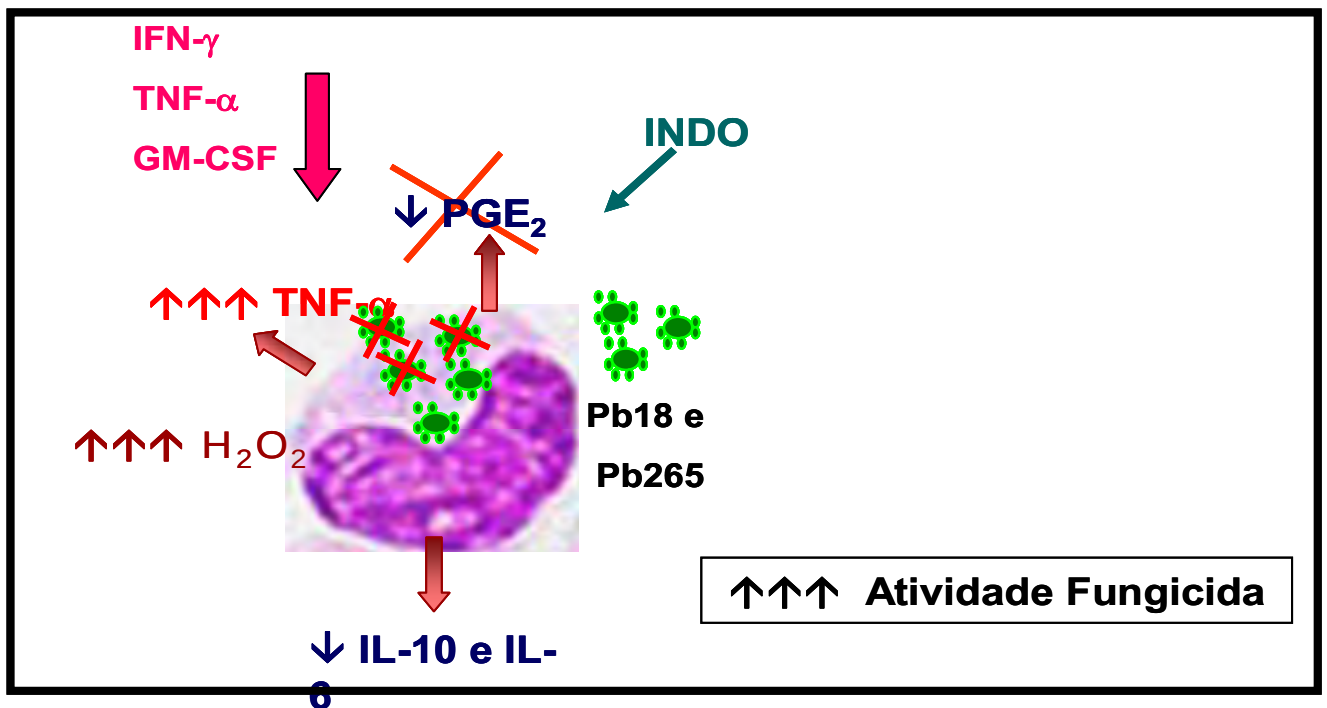
2- Efeito do tratamento com INDO em monócitos humanos desafiados com *P. brasiliensis*



3- Efeito da ativação por citocinas em monócitos humanos desafiados com *P. brasiliensis*



4- Efeito da ativação por citocinas e simultâneo tratamento com INDO em monócitos humanos desafiados com *P. brasiliensis*



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



12- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. J. Med. Vet. Mycol. 1985; 23: 323–334.
2. Restrepo A, and Tobón AM. *Paracoccidioides brasiliensis*. In Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier. 2005; 3062-8.
3. Lacaz CS. South American Blastomycosis. Anais da Faculdade de Medicina de São Paulo 1956; 7-120.
4. Franco M, Mendes RP, Moscardi-Bacchi M, Rezkallah-Iwasso MT, Montenegro MR. Paracoccidioidomycosis. Bailliere's Clin Trop Med Commun Dis. 1989 ; 4:185-220.
5. Franco M, Peraçoli MTS, Soares AMVC, Montenegro MR, Mendes RP, Meira DA. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. Curr Top Med Mycol. 1993; 5:115-49.
6. Mendes RP. 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.
7. 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; 46:346-53.

Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas. Requisitos uniformes para original submetidos a revistas biomédicas. Ann Intern Med 1997; 126:36-47.

8. 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.
9. Peraçoli MTS, Soares AMVC. Imunologia da paracoccidioidomicose. In: Tosta CE. Imunologia das infecções. Uberaba: FUNEPU 1992; 5-36.
10. Calich VLG, Russo M, Vaz CAC, Burger E, Singer-Vermes LM. Resistance mechanism to experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Ciência e Cultura 1994; 46: 455- 461.
11. Musatti CC, Peraçoli MTS, Soares AMVC, Rezkallah-Iwasso MT. et al. Cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. In: Franco MF, et al. Paracoccidioidomycosis. Flórida, USA, CRC Press Boca Raton 1994; 175-86.
12. Peraçoli MTS, Parise-Fortes MR, Pereira da Silva MF, Montenegro MR. Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster. Rev Inst Med Trop de São Paulo 1995; 37: 129-136.
13. Walsh TJ, Roilides E, Cortez K, Kottlil S, Bailey J, Lyman CA. Control, immunoregulation, and expression of innate pulmonary host defenses against *Aspergillus fumigatus*. Med Mycol. 2005;43 Suppl 1:S165-72.
14. Antachopoulos C, Roilides E. Cytokines and fungal infections. Br J Hematol. 2005; 129(5):583-96. Review.
15. 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.
16. 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.

17. 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.
18. Goihman-Yahr M, Isturiz G, Rotthenberg A. Los fagocitos y patogenia de la paracoccidioidomicosis. Interciencia, 1990; 200-5.
19. 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 1988; 140: 2786-9.
20. 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.
21. 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 1992 b ; 30(2): 161-8.
22. Calvi SA, Peraçolli 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.
23. Smith WL, Dewitt DL, Prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. Adv Immunol 1996; 62: 167-215.
24. Akarasereenont P, Bakhle YS, Thiemerman C, Vane JR. Cytokine-mediated induction of cyclooxygenase-2 by activation of tyrosine kinase in bovine endothelial cells stimulated by bacterial lipopolysaccharide. B J Pharmacol 1995; 115: 401-408.

25. Akarasereenont P, Mitchell JÁ, Bakhle YS, Thiemermann C, Vane JR. Comparison of the induction of ciclooxigenase and nitric oxide synthase by endotoxin in endothelial cells and macrophages. *Eur J Pharmacol* 1995; 273(1-2): 121-128.
26. Flynn JT, Hoff H. Lipopolysaccharide induces time-dependent increases in prostaglandin H synthase-2 and cytosolic phospholipase A2 mRNA in cultured human microvessel-derived endothelial cells. *Shock* 1995; 4(6): 433-440.
27. Te Velde AA, Huijbens RJF, De Vries JE, Figdor CG. Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 β , tumor necrosis factor- α and IL-6 by human monocytes. *Blood* 1990; 76: 1392-1397.
28. Moore KW, O'Garra A, De Wall Maleyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Ann Rev Immunol* 1993; 11: 165-190.
29. Yano T, Hopkins H A, Hempel S L, Monick M M, Hunninghake G W. Interleukin-4 inhibits lipopolysaccharide induced expression of prostaglandin H synthase-2 in human alveolar macrophages. *J Cell Physiol* 1995; 165: 77-82.
30. Mertz PM, DeWitt DL, Stetler-Stevenson WG, Wahl LM. Interleukin 10 suppression of monocytes prostaglandin H synthase-2. Mechanism of inhibition of prostaglandin-dependent matrix metalloproteinase production. *J Biol Chem* 1994; 269: 21322-29.
31. Niiron H, Otsuda T, Tanabe T, Hara S, Kuga S, Nemoto Y, et al. Inhibition by interleukin-10 of inducible cyclooxygenase expression in lipopolysaccharide-stimulated monocytes: its underlying mechanism in comparison with interleukin-4. *Blood* 1995; 85: 3736-45.

32. Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR. Selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(24): 11693-7.
33. Negishi M, Ito S, Hayashi O. Prostaglandin E receptors in bovine adrenal medulla are coupled to adenylate cyclase via G1 and to phosphoinositide metabolism in pertussis toxin-insensitive manner. *J Biol Chem* 1989; 264: 3916-3923.
34. Sonnenburg WK, Smith WL. Regulation of AMPc metabolism in rabbit cortical collecting tubule cells by prostaglandins. *J Biol Chem* 1988; 263: 6155-6160.
35. Sonnenburg WK, Zhu J, Smith WL. A prostaglandin E receptor coupled to a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide regulatory protein in rabbit cortical collecting tubule cells. *J Biol Chem* 1990; 265(15): 8479-83.
36. 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.
37. Choudhry MA, Hockberger PE, Sayeed MM. PGE₂ suppresses mitogen induced Ca²⁺ mobilization in T cells. *Am J Physiol* 1999; 277: 1741-1748.
38. Choudhy MA, Ahmed Z, Sayeed MM. PGE₂ mediated inhibition of T cell p59 (fyn) is independent of cAMP. *Am J Physiol* 1999; 277: 302-309.
39. 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.

40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. Phipps RP, Stein H, Roper RL. A new view of prostaglandin E regulation of immune response. *Immunol Today* 1991; 12: 349-352.
46. 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.
47. 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.

48. 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.
49. 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.
50. Kalinski P, Hilkens C, Snijders A, Snijdewint FG, Kapsenberg ML. Dendritic cells obtained from peripheral blood precursors in the presence of PGE₂ promote Th₂ responses. *Adv Exp Med Biol* 1997; 417: 363-367.
51. Ikegami R, Sugimoto Y, Segi E, Katsumyama M, Karahashi H, Amano F, Maruyama T, et al. The expression of prostaglandin receptors EP2 and EP4 and their different regulation by lipopolysaccharide in C3H/HeN peritoneal macrophages. *J Immunol* 2001; 166: 4689-4696.
52. Shinomya S, Naraba H, Ueno A, Utsunomya I, Maruyama T, Ohuchida S et al. Regulation of TNF- α and interleukin-10 production by prostaglandins I(2) and E(2): studies with prostaglandin receptor-deficient mice and prostaglandin E-receptor subtype-selective synthetic agonists. *Biochem Pharmacol* 2001; 61: 1153-1660.
53. 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.

54. 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.
55. Adams LB, Gills TP, Hwang DH, Krahenbuhl JL. Effects of essential fatty acid deficiency on prostaglandin E₂ production and cell-mediated immunity in a mouse model of leprosy. Infect Immun 1997; 65: 1152-1157.
56. 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.
57. 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.
58. 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.
59. Rangel Moreno J, Estrada Garcia I, Garcia Hernandez ML, Aguilar Leon D, Marquez R, Hernandez Pando R. The role of prostaglandin E₂ in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. Immunology 2002; 106: 257-66.
60. 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.
61. 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.

62. 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.
63. 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.
64. Anjos AR, Calvi SA, Ferracini R, Peraçoli MT, Silva CL, Soares AM. A 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 2002; 40: 377-82.
65. Bordon AP, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Calvi SA, Peraçoli MTS, Soares AMVC. Prostaglandin E₂ inhibits *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human monocytes. Microbes Infect. 2007; 9(6): 744-7.
66. Moreira AP, Dias-Melicio, LA, Peraçoli MTS, Calvi SA, Soares AMVC. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells by IFN- γ and TNF- α activated murine peritoneal macrophages: evidence H₂O₂ and NO effector mechanisms. Mycopathol. 2008; 166: 17-23.
67. Gonzalez A, Gregori W, Velez D, Restrepo A, Cano LE. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. Infect Immun 2000; 2546-2552.
68. Wienberg JB, Misukonis MA, Shami PJ, Mason SN, Sauls DL, Dittman WA. Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. Blood 1995; 86(3):1184-95.

69. Scheemann M, Schoedon G, Hofer S, Blau N, Guerrero L, Schaffner A. Nitric oxide synthase is not a constituent of the antimicrobial armature of human monocuclear phagocytes. *J Infect Dis* 1993; 167: 1358-63.
70. Denis M. Human monocytes/macrophages: NO or no NO? *J Leukoc Biol* 1994; 55: 682-4.
71. Padgett EL, Pruett SB. Evaluation of nitrite production by human monocyte-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Comm* 1992; 186: 775-81.
72. Munoz-Fernandez M A, Fernandez M A, Fresno M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through anitric oxide-dependent mechanism. *Immunol Lett* 1992;33: 35-40.
73. Hunt N C A, Goldin R D. Nitric oxide production by monocytes in alcoholic liver disease. *J Hepatol* 1992; 14:146-150.
74. Pietraforte D, Tritarelli E, Testa U, Minetti M. gp120 Hw envelope glycoprotein increases the production of nitric oxide in human monocyte-derived macrophages. *J Leukoc Biol* 1994; 55: 175-182.
75. Zembala M, Siedlar M, Marcinkiewicz J, Pryjma J. Human monocytes are stimulated for nitric oxide release in vitro by some tumor cells but not by cytokines and lipopolysaccharide. *Eur J Immunol* 1994; 24: 435-439.
76. De Maria R, Cifone M G, Trotta R et al. Triggering of human monocyte activation through CD69, a member of the natural killer cell gene complex family of signal transducing receptors. *J Exp Med* 1994; 180: 1999-2004.
77. Reiling N, Ulmer A J, Duchrow M, Ernst M, Flad H-D, Hauschildt S. Nitric oxide synthase: mRNA expression of different isoforms in human monocytes/macrophages. *Eur J Immunol* 1994; 24: 1941-1944.

78. Kroncke K D, Fehsel K, Alsdorff L, Kolb-Bachofen V. Expression of inducible NO-synthase in human monocytes. *Immunobiology* 1994; 191 : 267-268.
79. Peterson P K, Hu S, Anderson W R, Chao C C. Nitric oxide production and neurotoxicity mediated by activated microglia from human versus mouse brain. *J Infect Dis* 1994; 170: 457-460.
80. Mautino G, Paul-Eugene N, Chanez Pet al. Heterogeneous spontaneous and interleukin-4-induced nitric oxide production by human monocytes. *J Leukoc Biol* 1994; 56:15-20.
81. Bukrinsky M I, Nottet H D L M, Schmidtmayerove N et al. Regulation of nitric oxide synthase activity in human immunodeficiency virus type- 1 (HW-1)-infected monocytes: implications for HW-associated neurological disease. *J Exp Med* 1994; 181: 735-745.
82. Dumarey C H, Labrousse V, Rastogi N, Vargaftig B B, Bachelet M. Selective *Mycobacterium avium*-induced production of nitric oxide by human monocyte-derived macrophages. *J Leukoc Biol* 1994; 56: 36-40.
83. Vouldoukis I, Riveros-Moreno V, Dugas B et al. The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the FcERI/CD23 surface antigen. *Proc Nail Acad Sci USA* 1995; 92: 7804-7808.
84. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 97: 77-89.
85. 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.

86. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide by cells in culture. J Immunol Methods 1980; 36(1-2): 61-70.
87. Pick E, Mizel D. Rapid microassay for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. J Immunol Methods 1981; 46(2): 211-226.
88. Green LC. Nitrite biosynthesis in man. Proc natl Acad Sci 1981; 15: 106-22.
89. Godfrey KAM. Statistics in practice. Comparing the means of several groups. N England J Med 1985; 313: 450-6.
90. Channon JY, Robertes MB, Blackwell JM. A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. Immunology 1984; 53: 345-55.
91. Eissenberg LG, Golman WE. *Histoplasma capsulatum* fails to trigger release of superoxide from macrophages. Infect Immun 1987; 55: 29-34.
92. Holzer TJ, Nelso KE, Crispen RG, Anderse BR. *Mycobacterium leprae* fails to stimulate phagocytic cell superoxide anion generation. Infect Immun 1986; 51: 514-20.
93. Chametzky WT, Shuford WW. Survival and growth of *Yersinia pestis* within macrophages and an effect of the loss of the 47-megadalton plasmid on growth in macrophages. Infect Immun 1985; 47: 234-41.
94. Bromberg Y, Pick E. Unsaturated fatty acids as second messengers of superoxide generation by macrophages. Cell Immunol 1983; 79: 240-52.

95. Liew FY, Li Y, Moss D, Parkinson C, Rogers MV, Moncada S. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. Eur. J. Immuno. 1991; 21: 3009-14.
96. Stenger S, Thuring H, Rollinghoff M, Bogdan C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. J. Exp. Med. 1994; 180: 783-93.
97. Jardim IS, Lima-Santos J, Horta MF. Differential production of nitric oxide by murine macrophages from *Leishmania* resistant and susceptible mice strains. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1999; 94 (Suppl): 1997.
98. Weinberg JB, Misukonis MA, Shami PJ, Mason SN, Sauls DL, Dittman WA, et al. Human Mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): Analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, bioprotein and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. Blood 1995; 86: 1184-95.
99. Skorokhod OA, Schwarzer E, Cereto M, Arese P. Malarial pigment haemozoin, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β e LPS do not stimulate expression of inducible nitric oxide synthase and production of nitric oxide in immunopurified human monocyte. Malaria Journal 2007; 6: 73-80.
100. Santos JL, Andrade AA, Dias AAM, Bonjardim CA, Reis LFL, Teixeira SMR, Horta MF. Differential Sensitivity of C57BL/6 (M-1) and BALB/c (M-2) macrophages to the stimuli of IFN- γ /LPS for the production of NO: Correlation with iNOS mRNA and protein expression. J Interf. Cytok. Res. 2006; 26: 682-88.
101. Salkowski CA, Detore G, McNally R, Rooijen N, Vogel SN. Regulation of inducible nitric oxide synthase messenger RNA expression and nitric oxide production by lipopolysaccharide in vivo. J Immunol 1997; 158:905-912.

102. Chen LY, Salafranca MN, Mehta JL. Cyclooxygenase inhibition decreases nitric oxide synthase activity in human platelets. *Am J Physiol* 1997; 273: H1854-59.
103. Minghetti L, Nicolini A, Polazzi E, Creminon C, Maclouf J, Levi G. Prostaglandin E₂ downregulates inducible nitric oxide synthase expression in microglia by increasing cAMP levels. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1997;433: 181-84.
104. Minghetti L, Levi G. Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Prog Neurobiol* 1998; 54:99-125.
105. Campos EG, Jesuino RSA, Dantas AS, Brígido MM, Felipe MSS. Oxidative stress response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Genetics and Molecular Research* 2005; 4: 409-29.
106. Takaya N and Shoun H. Nitric oxide reduction, the last step in denitrification by *Fusarium oxysporum*, is obligatorily mediated by cytochrome P450nor. *Mol Gen Genet* 2000; 263: 342-48.
107. Shoun H, Kim DH, Uchiyama H, Sugiyama J. Denitrification by fungi. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 73: 277-81.
108. Usuda K, Toritsuka N, Matsuo Y, Kim DH, Shoun H. Denitrificação by the fungus *Cylindrocarpon tonkinense*: anaerobic cell growth and two isozyme forms of cytochrome P450nor. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 883-89.
109. Tsuruta S, Takaya N, Zang L, Shoun H, Kimura K, Hamamoto M, Nakase T. Denitrification by yeast and occurrence of cytochrome P450nor in *Trichosporon cutaneum*. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 168: 105-10.
110. Zhang L, Takaya N, Kitazume T, Shoun H. Purification and cDNA cloning of nitric oxide reductase cytochrome P450nor (CYP55A4) from *Trichosporon cutaneum*. *Eur. J. Bioch.* 2001; 268: 3198-3204.

111. Kobayashi M, Mtsuo Y, Takimoto A, Suzuki S, Maruo F, Shoun H. Denitrification, a novel type of respiratory metabolism in fungal mitochondrion. J Biol Chem 1996; 271: 16263-67.
112. Nakahara K and Shoun H. N-terminal processing and amino acid sequence of two isoforms of nitric oxide reductase cytochrome P450nor from *Fusarium oxysporum*. J Biochem 1996; 120: 1082-87.
113. Nittler MP, Hocking-Murray D, Catherine KF, Sil A. Identification of *Histoplasma capsulatum* transcripts induced in response to reactive nitrogen species. Mol Biol Cell 2005; 16: 4792-813.
114. Felipe MSS, Andrade RV, Arraes FB, Nicola AM, Maranhão AQ, Torres FA, et al. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. J. Biol. Chem. 2005; 280: 24706-14.
115. Moreira SF, Bailão AM, Barbosa MS, Jenuíno RSA, Pereira M, Soares CMA. Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, characterization, molecular cloning and expression analysis. Yeast 2004; 21: 173-182.
116. Wysong DR, Chistin L, Sugar AM, Robbins PW, Diamond RD. Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. Infect Immun 1998; 66: 1953-1961.
117. Johnson CH, Klotz MG, York JL, Kruff V, McEwen JE. Redundancy, phylogeny and differential expression of *Histoplasma capsulatum* catalases. Microbiol 2002; 148: 1129-1142.
118. Zancapè-Oliveira RM, Reiss E, Lott TJ, Mayer LW, Deepe GSJ. Molecular cloning, characterization and expression of the M antigen of *Histoplasma capsulatum*. Infect Immun 1999; 67: 1947-1953.

119. Paris S, Wysong D, Debeaupuis JP, Shibuya K, Philippe B, Diamond RD, Latge JP. Catalases of *Aspergillus fumigatus*. Infect Immun 2003; 71: 3551-3562.
120. Philippe B, Ibrahim-Granet O, Prevost MC, Gougerot-Pocidalo MA, Sanchez perez M, Van der Meeren A, Latge JP. Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. Infect. Immun 2003; 71: 3034-3042.
121. Calera JA, Paris S, Monod M, Hamilton AJ, Debeupuis JP, Diaquin M, Lopez-Medrano R, Leal F, Latge JP. Cloning and disruption of antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus*. Infect immune 1997; 65: 4718-4724.
122. Kurokawa CS, Araujo Jr JP, Soares AMVC, Sugizakin MF, Peraçoli MTS. Pro- and Anti-inflammatory cytokines produced by human monocytes challenged *in vitro* with *Paracoccidioides brasiliensis*. Microbiol Immunol 2007; 51: 421-28.
123. Strassmann G, Patil-Koota V, Finkelman F, Fong M, Kambayashi T. Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophage by prostaglandin E₂. J Exp Med 1994; 180: 2365-2370.
124. Van de Pouw Krann T, Boeiji LCM, Smeenk RJT, Wijdenes J, Aarden LA. Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin-12 production. J Exp Med 1995; 181: 775-9.
125. Platzer C, Meisel CH, Vogt K, Platzer M, Volk HD. Up-regulation of monocyte IL-10 by tumor necrosis factor- α and cAMP elevating drugs. Int Immunol 1995; 7: 517-523.

126. Niho Y, Niino H, Tanaka H, Otsuka T. Role of IL-10 in the crossregulation of prostaglandins and cytokines in monocytes. *Acta Haematol* 1998; 99: 165-170.
127. Becherel PA, Goff LL, Ktorza S, Ouaz F, Mencia-Huerta JM, Dugas B, Debre P, Mossalay MD, Arock M. Interleukin-10 inhibits IgE-mediated nitric oxide synthase induction and cytokine synthesis in normal human keratinocytes. *Eur. J. Immunol.* 1995; 25: 2992-95.
128. Seyler I, Appel M, Devissaguet JP, Ligrand P, Barratt G. Modulation of nitric oxide production in RAW264.7 cells by transformation growth factor-beta and interleukin-10. Differential effects on free and encapsulated immunomodulator. *J. Leukoc. Biol.* 1997; 62:374-80.
129. Huang CJ, Stevens BR, Nielsen SRB, Slovin PN, Fang X, Nelson DR, Skimming JW. Interleukin-10 inhibition of nitric oxide biosynthesis involves suppression of iNOS-2 transcription. *Biol Chemistry* 2002; 6: 79-84.
130. Cunha FQ, Moncada S, Liew FY. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 1992; 182: 1155-59.
131. Berger S, Balló H, Stutte HJ. Immune complex-induced interleukin-6, interleukin-10 and prostaglandin secretion by human monocytes: a network of pro- and anti-inflammatory cytokines dependent on the antigen: antibody ratio. *Eur J Immunol* 1996; 26: 1297-1301.
132. Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 1993; 54: 1-79.
133. Paul R, Koedel U, Winkler F, Kieseir BC, Fontana A, Kopf M. Lack of IL-6 augments inflammatory response but decreases vascular permeability in bacterial meningitis. *Brain* 2003; 126: 1873-82.

134. Siqueira KZ, Soares AMV, Calvi SA, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peraçoli MTS. Interleukin-6 treatment enhances human monocytes permissiveness for *Paracoccidioides brasiliensis* growth by modulating cytokine production. Medical Mycology 2008; in press.