Guilherme Augusto Biondo

Identificação e purificação de prostaglandinas e leucotrienos produzidos por *Paracoccidioides brasiliensis*.

Orientadora: Prof^a Titular Ângela M. V. C. Soares Co-orientador: Dr^a Ana Paula Bordon-Graciani

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

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Biondo, Guilherme Augusto.

Identificação e purificação de prostaglandinas e leucotrienos produzidos por *Paracoccidioides brasiliensis /* Guilherme Augusto Biondo. – Botucatu : [s.n.], 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Ângela Maria Victoriano de Campos Soares Coorientador: Ana Paula Bordon-Graciani Capes: 21104000

Paracoccidioides brasiliensis. 2. Paracoccidioidomicose. 3. Micoses.
Fungos patogênicos.

Palavras-chave: Eiconsanóides; Leucotrieno; *Paracoccidioides brasiliensis;* Prostaglandina.

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista campus Botucatu e Nucleo de Pesquisas Acançadas em Matologia da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Estadual Paulista campus Botucatu - Fazenda Lageado.

Dedicatória

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

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

À Damiana Tortolero Pierine. Pela paciência e companheirismo. Mesmo distante me apoiou em minhas escolhas e decisões.

À Maria Eduarda Castilho Biondo, que me trouxe muitas felicidades e aligrias em momentos difíceis de minha vida.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Ângela Maria Victoriano de Campos Soares. A você sou grato por me orientar em mais esta jornada e por depositar em mim a sua confiança.

Agradecimentos

A Deus, pela presença, bênçãos, força e paciência que me ajudaram a ir até o fim.

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

A minha coorientadora Dr^a Ana Paula Bordon-Graciani por me ajudar no desenvolvimento deste trabalho até o fim.

Ao Professor Adj. Edivaldo Domingues Velini e à Dr^a Maria Lúcia Bueno Trindade e a José Roberto Marques Silva pela sua importente colaboração a este trabalho, cedendo as intalações do Nucleo de Pesquisas Avançadas em Matologia.

Aos meus amigos da 1ª Turma de 2012 do Curso de Formação de Oficiais da Marinha.

Aos meus amigos do Centro da Marinha em São Paulo (CTMSP), por me acompanharem nesta nova fase de minha vida.

Aos queridos Devanir, Ulisses, Andréia e Felipe, por estarem presentes sempre que possível.

Aos amigos de laboratório Helan, Régis, Tatiane e Daniela pela amisade de vocês.

Aos Professores, Dr^a Terezinha, Dr Maurício, Dr^a Alexandrina, Dr João Candeias, Dr João Pessoa, Dr Eduardo, Dr^a Lurdinha, Dr^a Sandra e Dr Ary.

Aos Funcionários e amigos do Departamento de Microbiologia e Imunologia Luis, Lula, Sônia e Nice. Sempre prontos a ajudar quando necessário.

Aos Professores Dr Ramon Kaneno e Dr Silvio Luis de Oliveira pelas valiosas sugestões no meu exame geral de qualificação.

Aos funcionários da Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, Nathanael, Janete, Andréa, Diego, Lílian, Márcia e Regina, pela dedicação e auxílio.

Ao Professor Dr Paulo Câmara Marques Pereira, coordenador do Curso de Pós-Graduação em Doenças Tropicais e à Solange, secretária da Pós-Graduação do Departamento de Doenças Tropicais. Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.

Fernando Pessoa

Mantenha seus pensamentos positivos, porque seus pensamentos tornam-se suas palavras. Mantenha suas palavras positivas, Porque suas palavras tornam-se suas atitudes. Mantenha suas atitudes positivas, Porque suas atitudes tornam-se seus hábitos. Mantenha seus hábitos positivos, Porque seus hábitos tornam-se seus valores. Mantenha seus valores positivos, Porque seus valores... Tornam-se seu destino.

Mahatma Gandhi

Resumo

BIONDO, G.A. Identificação e purificação de prostaglandinas e leucotrienos produzidos por *Paracoccidioides brasiliensis*. 2013. 106f. Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada pelo fungo Paracoccidioides brasiliensis. O estabelecimento da paracoccidioidomicose-infecção ou paracoccidioidomicose-doença depende das interações parasita-hospedeiro que podem resultar em uma resposta imune mais ou menos eficaz por parte deste último. Embora vários dos mecanismos decorrentes dessa interação já estejam descritos, estudos sobre a participação de outros fatores potenciais podem ampliar sobremaneira o nosso entendimento sobre a imunopatogênese da PCM. Nesse sentido, os eicosanóides como as prostaglandinas (PGs) e leucotrienos (LTs) devem ser avaliados. Em trabalhos anteriores detectamos que o fungo induz a produção de PGs e LTs por monócitos humanos que, de uma forma autócrina, suprimem ou aumentam respectivamente, as atividades antifúngicas dessas células. No entanto, os estudos têm mostrado que além de induzir a produção de eicosanóides, os próprios fungos podem produzir esses mediadores, revelando um mecanismo de virulência que tem potencialmente grandes implicações para o entendimento dos mecanismos das infecções fúngicas. Baseados nesses estudos detectamos que o P. brasiliensis produz tanto PGs como LTs, usando fontes endógenas e exógenas de ácido araquidônico, e que ambos são importantes para a manutenção da viabilidade do fungo. Adicionalmente, os resultados sugeriram que o fungo utiliza as vias metabólicas da ciclooxigenase (COX) para a produção de PGs e da lipoxigenase (5-LO) para LTs. No presente trabalho, aprofundamos esses estudos objetivando avaliar se o fungo produz outras classes de eicosanóides, além da PGE₂ e LTB₄, se as PGs e LTs liberados pelo P. brasiliensis podem ser considerados como PGE₂ e LTB₄ autênticos, isto é semelhantes aos detectados para os mamíferos, assim como estabelecer de uma forma definitiva se a COX e a 5-LO são as vias metabólicas utilizadas para essa produção. Detectamos que o fungo produz outras classes de eicosanóides além da PGE₂ e LTB₄, como PGF₂a, PGD₂, TBX e 5-HETE. Adicionalmente mostramos que os eicosanóides produzidos possuem estrutura molecular idêntica às dos mamíferos, podendo ser considerados como autênticos. No entanto, não foram identificados genes codificadores das enzimas COX e 5-LO no genoma do fungo, sugerindo a utilização de vias enzimáticas diferentes das utilizadas pelos mamíferos.

Palavras-Chave: Prostaglandina; Leucotrieno; Ácido araquidônico; Eicosanódes; *Paracoccidioides brasiliensis;* Cicloxigenase; Lipoxigenase.

Abstract

Biondo G.A. Identification and purification of prostaglandins and leukotrienes produced by *Paracoccidioides brasiliensis*. 2013. 106f. Thesis (Doctorate) - Faculty of Medicine of Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by the dimorphic fungus Paracoccidioides brasiliensis. The establishment of paracoccidioidomycosis-infection or the evolution to paracoccidioidomycosis-disease in its more or less severe forms, primarily depends on complex host-parasite interaction, in which immune response mechanisms play an essential role. While many of these mechanisms have been elucidated, studies on the participation of other potential factors can greatly expand our understanding of PCM immunopathogenesis. Accordingly, eicosanoids such as prostaglandins (PGs) and leukotrienes (LTs) should be evaluated. In previous studies we found that the fungus induces the production of prostaglandins and leukotrienes by human monocytes that in an autocrine way suppress and increase, respectively, the antifungal activities of these cells. However, studies have shown that in addition to inducing the production of eicosanoids, fungi themselves can produce these mediators, showing a mechanism for virulence that has potentially important implications for understanding the mechanisms of fungal pathogenicity. Based on these studies, we found that P. brasiliensis produces both PGs and LTs, using exogenous and endogenous sources of arachidonic acid and that both are important for fungus viability. Additionally, the results suggested that the fungus uses cyclooxygenase (COX) and lipoxygenase (5-LO) metabolic pathways for PGs and LTs production, respectively. Here, we profound these studies evaluating whether PGs and LTs released by P. brasiliensis can be considered as authentic LTB₄ and PGE₂, i.e. similar to those detected for mammals. We also asked whether the fungus, in addition to PGE₂ and LTB₄, produces other classes of eicosanoids. Finally, we intended to definitively determine whether COX and 5-LO are the metabolic pathways used for this production. We found that fungus PGE_2 and LTB_4 have molecular structure identical to mammals and then, can be considered as authentic eicosanoids. Moreover, in addition of PGE₂ and LTB₄, the fungus produces other classes of eicosanoids, such as PGF₂a, PGD₂, TBX and 5-HETE. However, no genes have been identified encoding the 5-LO and COX enzymes in the genome of the fungus, suggesting the use of enzymatic pathways different than those used by mammals for this production.

Key word: Prostaglandin; Leukotriene; Arachidonic acid; Eicosanods; *Paracoccidioides brasiliensis;* Cyclooxygenase; Lipoxygenase.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	
2. OBJETIVOS	
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Cultivo do <i>P. brasiliensis</i>	32
3.2. Obtenção das suspensões de P. brasiliensis	
3.3. Culturas de células leveduriformes de Pb18 e Pb265	
3.4. Análise da produção de PGE $_2$ e LTB $_4$ por Pb 18 e Pb265 utilizando	a técnica
de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)	
3.4.1. Purificação das amostras para análise por HPLC	
3.4.2. Análise por HPLC	
3.5. Avaliação quantitativa e caracterização de PGE $_2$ e LTB $_4$ produzido	os pelo <i>P</i> .
brasiliensis utilizando a técnica de Cromatografia líquida acoplada	a
Espectrometria de Massas (LC/MS-MS)	
3.5.1. Coleta das frações contendo PGE2 ou LTB4	
3.5.2. Análise por LC/MS-MS	
3.6. Avaliação qualitativa da produção de diferentes classes de PGs e L'	Гs pelo <i>P</i> .
brasiliensis utilizando a técnica LC/MS-MS	35
3.7. Pesquisa de genes que codificam as enzimas COX e 5-LO, ou enzim	as
funcionalmente homólogas no P. brasiliensis	
3.8. Quantificação relativa de mRNA para enzima Linolate diol sintase	(LDS) por
RT-PCR em tempo real	
3.8.1. Extração de RNA	
3.8.2. Obtenção do cDNA	37
3.8.3. RT-PCR em tempo real	
3.9. Análise Estatística	
4. RESULTADOS	40
4.1. Avaliação da produção de PGE ₂ e LTB ₄ por <i>P. brasiliensis</i> pela técr	nica de
HPLC	

4.2. Confirmação da produção de PGE ₂ e LTB ₄ autênticos pelo <i>P. brasilien</i>	nsis pela
técnica de LC/MS-MS	47
4.3. Análise qualitativa das diferentes classes de PGs e LTs pelo P. brasilie	ensis
pela técnica de LC/MS-MS	53
4.4. Avaliação da expressão genes que codificam a enzima Linoleate Diol S	Sintase
(LDS) pelo P. brasiliensis	57
4.5. Expressão de mRNA para a enzima LDS	62
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÃO	
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	



Introdução 13

1- Introdução

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica que se manifesta endemicamente na maioria dos países da América Latina, especialmente Brasil, Argentina, Colômbia e Venezuela. Seu agente etiológico, o *Paracoccidioides brasiliensis*, é um fungo imperfeito e dimórfico, que se apresenta sob a forma de levedura *in vivo* e quando cultivado a 37°C em meios de cultura enriquecidos, e na forma de micélio à temperatura ambiente com variação de 4 a 28°C¹⁸⁵.

Acredita-se que os agentes infectantes do *P. brasiliensis* sejam propágulos micelianos provavelmente presentes no solo, na água e nas plantas que penetram no hospedeiro pelas vias aéreas, atingindo primeiramente os pulmões, provocando um 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, mas com desenvolvimento de uma resposta imune específica, que pode ser evidenciada pelo teste intradérmico com paracoccidioidina¹⁶⁷. Ao contrário, o processo pode progredir para a paracoccidioidomicose-doença com consequente disseminação para outros órgãos como fígado, baço e adrenais, pela via linfo-hematogênica⁸². 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^{81, 148}.

O estabelecimento da paracoccidioidomicose-infecção ou paracoccidioidomicosedoença nas suas formas mais ou menos graves depende principalmente das complexas interações parasita-hospedeiro que podem resultar em uma resposta imune mais ou menos eficaz por parte deste último. Neste contexto, muitos estudos clínicos e experimentais realizados com o objetivo de caracterizar a resposta imune do hospedeiro infectado mostraram uma importante participação tanto da resposta imune inata como da especifica^{17, 41}.

Entre os vários mecanismos naturais de defesa, as células fagocitárias desempenham papel central na resistência aos fungos, destacando-se a participação na reação inflamatória e na atividade fungicida/fungistática³⁴.

No caso do *P. brasiliensis*, cuja infecção atinge primeiramente os pulmões, acredita-se que a resposta inicial seja mediada pelos macrófagos alveolares. Estudos têm mostrado que

após serem inalados, os conídios do fungo são fagocitados por essas células e convertidos em leveduras¹⁴⁴. Estas células podem fagocitar o *P. brasiliensis* através de receptores opsônicos e não opsônicos. Nesse sentido, estudos têm mostrado que o reconhecimento e fagocitose podem ocorrer através do receptor para complemento (CR3) presente nos macrófagos⁴² uma vez que o *P. brasiliensis* é capaz de ativar esse sistema pela via alternativa¹⁵⁷ ou pela via da lectina²²⁸. O reconhecimento pode ainda ocorrer via receptores do tipo Toll (TLRs)^{26, 43} ou ainda do tipo manose¹⁸¹. Além da fagocitose do fungo, essas células liberam quimiocinas importantes para o recrutamento de novas células ao pulmão. Assim, peptídeos de baixo peso molecular, detectados no sobrenadante de macrófagos peritoneais murinos são capazes de atrair neutrófilos para a cavidade peritoneal⁴⁵. Outros estudos mostraram a liberação de quimiocinas especificas para neutrófilos e células mononucleares no pulmão de camundongos infectados²¹⁴.

As células fagocitárias residentes ou as recrutadas deverão após o processo de fagocitose, destruir o fungo. No entanto, as funções efetoras diretas dessas células contra o fungo, como atividade fungicida e ou fungistática, assim como sua atividade moduladora sobre a resposta inflamatória que está se formando, vão depender das complexas interações que essas células irão estabelecer com o fungo. Esse processo poderá culminar em ativação ou desativação dessas células, à medida que o fungo lançar mão de seus mecanismos de escape. Entre os mecanismos de ativação está a liberação de citocinas ativadoras das funções celulares, como IFN- γ , TNF- α e GM-CSF e outras como a IL-15. Vários trabalhos *in vitro* têm evidenciado a participação dessas citocinas no processo de ativação de monócitos, macrófagos e neutrófilos humanos e murinos para que essas células adquiram atividade fungicida contra o fungo^{35-37, 46, 47, 50-52, 55, 88, 122, 124, 154, 156, 190, 215, 225}. Por outro lado, fatores que levam a uma desativação dessa resposta têm sido relatados, como a IL-10, que bloqueia a ativação por IFN- γ ou TNF- α de macrófagos murinos¹⁵⁵ e neutrófilos humanos⁶², culminando com inibição da atividade fungicida dessas células. Estes resultados in vitro permitem inferir que durante a resposta imune inata a ação de macrófagos contra o fungo estaria inibida, uma vez que estas células, em resposta ao fungo, poderiam produzir concentrações proporcionalmente baixas de citocinas ativadoras como o TNF-α e altas concentrações de IL-10 que, de uma forma autócrina, desativaria as células. Nesse sentido, monócitos de pacientes produzem baixos níveis de TNF-α e IL-6, mas altos níveis de IL-1, IL-8 e IL-10 quando comparados aos indivíduos controles¹⁷². Outro mecanismo de supressão das células fagocitárias foi relatado por nosso grupo. Diferente de outros microrganismos que induzem apoptose nas células fagocitárias, como um mecanismo de escape, o P. brasiliensis através da indução de IL-8, aumenta o tempo de sobrevivência de neutrófilos humanos. Esse processo provavelmente permite que o fungo permaneça por mais tempo dentro de um ambiente celular propicio à sua multiplicação¹.

Outros mecanismos que culminam em inibição das células fagocitárias envolvem a ligação do fungo a determinados receptores de reconhecimento de estruturas padrões (PRRs). Calich et al⁴³, usando camundongos TLR4 deficientes e nocautes para TLR2 mostraram que tanto o TLR2, como o TLR4 estão envolvidos no reconhecimento do fungo. Esse reconhecimento resulta em um aumento da capacidade fagocítica com infecção de macrófagos e secreção de NO. No entanto, esse processo parece não levar a uma atividade macrofágica eficiente e nem à diminuição significativa da carga fúngica, pois tanto animais normais quanto os deficientes apresentaram a mesma taxa de sobrevida à infecção. Estudos em nosso laboratório, avaliando o papel dos receptores TLRs na atividade de neutrófilos humanos desafiados com a cepa Pb18 de P. brasiliensis, sugerem que a interação do fungo com os receptores TLR2 e TLR4 pode ser considerada um mecanismo de patogenicidade, uma vez que esse fungo usa o TLR2 e principalmente o TLR4 para a sua entrada nas células e escapar das suas funções efetoras, através da produção de IL-8 e IL-10². Nakaira-Takahagi et al¹⁵⁹ mostraram que tanto o fungo como a gp43, seu principal antígeno, são capazes de modular a expressão de TLR2 e TLR4 e consequentemente a produção de citocinas pró e antiinflamatórias por monócitos humanos. Além disso, foi mostrado que a fração gp43 se liga ao receptor de manose (MR) para inibir a capacidade fagocítica e fungicida de macrófagos peritoneais de camundongos resistentes e suscetíveis¹⁸⁰. Esta descoberta levou os autores a postular que a secreção de gp43 é um dos mecanismos de escape apresentados pelo P. brasiliensis e que essa proteína exerce seus efeitos ligando-se ao MR. Trabalho recente em nosso laboratório mostrou que a IL-18 induz um aumento do crescimento do P. brasiliensis em monócitos humanos. Esse efeito foi atribuído ao fato da IL-18 aumentar a expressão de MR. Após a ligação do fungo a esses receptores, seriam emitidos sinais de ativação importantes para a produção de substâncias, que de uma forma direta ou indireta estimulariam o crescimento do fungo⁶⁸.

Além dos fagócitos, as células "Natural Killer" (NK) podem ter uma importante atividade antifúngica e moduladora durante a resposta imune inata. Estudos *in vitro* demonstraram que células NK murinas podem inibir o crescimento do fungo¹⁰⁹. No entanto, essas células apesar de serem encontradas em número elevado em pacientes com PCM, desempenham baixa atividade citotóxica¹⁷³. Na infecção experimental no hamster foi detectada uma significativa atividade dessas células no início da infecção que, no entanto, foi

diminuindo à medida que a infecção progrediu¹⁷¹. Estudos recentes mostraram que células NK podem participar ativamente da resposta contra o fungo, destruindo as leveduras através da liberação de granulisina ou reconhecendo e destruindo células infectadas pelo fungo. Essa atividade pode ser aumentada pela incubação com IL-15. Além dessa atividade efetora direta essas células podem ter um importante efeito modulador, uma vez que são capazes de liberar citocinas próinflamatórias como IFN- γ e TNF- α em resposta a IL-15. No entanto, o mesmo estudo mostrou que pacientes com PCM apresentam menor atividade citotóxica dessas células em comparação com os indivíduos controles¹³⁰.

Em relação à resposta imune adaptativa, a resistência na PCM relaciona-se a um padrão de resposta do tipo Th1^{135, 136, 167}. Nesse sentido, estudos mostraram que pacientes com a forma aguda ou juvenil apresentam produção aumentada de IgG4, enquanto pacientes com a forma crônica apresentam níveis mais elevados de IgG1. Na forma juvenil, além de IgG4, ocorre produção aumentada de IgE, IgA, eosinofilia periférica e baixos níveis de IL-8^{10, 136}, sugerindo que na PCM existe a predominância de uma resposta do tipo Th2, particularmente nas formas mais graves e disseminadas da doença. Confirmando esses achados, animais sensíveis à infecção apresentam altos níveis de anticorpos IgA, IgM, IgG1 e IgG2b específicos para o fungo^{40, 53}. Reforçando os dados de subclasses de anticorpos, estudos sobre o padrão de citocinas caracterizaram que o grupo de indivíduos com paracoccidioidomicoseinfecção apresenta resposta imune associada ao padrão Th1, com alta resposta linfoproliferativa a antígenos do fungo, teste cutâneo de HT positivo, ausência de anticorpos, níveis indetectáveis de IL-4, IL-5 e IL-10, e aumentados de IFN-γ. No entanto, pacientes com a forma juvenil, apresentaram depressão da resposta linfoproliferativa e maiores níveis de IL-4 e IL-5, citocinas representativas do padrão Th2, quando comparados aos indivíduos somente infectados e àqueles com a forma crônica da doença¹⁶⁷. Outros trabalhos reforçam esses achados demonstrando que pacientes com PCM produzem baixos níveis de IL-2 e IFN-y, e altos níveis de IL-10, que foram associados à depressão da resposta imune celular¹⁸, assim como altos níveis de IL-4, IL-5 e IL-1β. Outros estudos ainda mostraram que indivíduos com paracoccidioidomicose-infecção expressam níveis altos e precoces de RNAm para IFN-y, TNF- α e CXCL-9 e CXCL-10 quando comparados aos indivíduos com as formas mais graves da infecção. Os pacientes com a forma menos grave apresentaram níveis semelhantes de CXCL-10 e IFN-y e maiores de CXCL-9, quando comparados aos indivíduos paracoccidioidomicose-infecção. As citocinas de padrão Th2, IL-4, IL-10, IL-5 e TGF-B foram sempre maiores nas duas formas da doença em relação aos indivíduos do grupo

paracoccidioidomicose-infecção¹³⁶. Outros trabalhos associaram mais uma vez indivíduos paracoccidioidomicose-infecção ao polo Th1 de resposta, uma vez que estes possuem maior número de células CD8 produtoras de IFN- γ e CD₄ produtoras de IL-2 e TNF- α , assim como maior número de células CD₃ expressando CXCL-9 e CXCL-10 e CXCR4 e um baixo número de monócitos expressando IL-10¹³⁵.

Os pacientes com PCM ainda liberam baixas concentrações de IL-12¹⁹², assim como expressam baixos níveis dos receptores para essa citocina¹⁹². Os trabalhos com animais de experimentação, mais uma vez reforçam os achados humanos. Os camundongos suscetíveis liberam um padrão de citocinas do tipo Th2 e os resistentes um padrão Th1^{7, 44, 116, 128}. Estudos têm mostrado que outros mecanismos, além de polarização para uma resposta do tipo Th2, podem estar envolvidos na depressão da resposta imune celular na PCM. Um deles seria a produção de óxido nítrico que, embora seja um dos metabólitos envolvidos na destruição do fungo pelos macrófagos, quando produzido em excesso torna-se imunossupressor^{24, 160, 215}. Células T com fenótipo regulador podem também contribuir para esse processo. Essas células têm sido detectadas em pacientes^{57, 76} e modelo experimental, no qual foi demonstrado que a migração das mesmas, mediada por CCR5, acarreta intensa imunossupressão e sobrevivência do fungo¹⁵³.

Outros estudos têm mostrado uma associação entre hiporresponsividade de células T de pacientes com aumento na expressão de enzimas indutoras de apoptose³⁹, assim como alta expressão de moléculas de superfície celulares relacionadas a esse processo, como FAS-FASL. A expressão de moléculas co-estimulatórias responsáveis pelo envio de sinais de desativação das células T, como a CTLA-4, também tem sido associada a não resposta de células T aos antígenos fúngicos⁴⁸. Outro mecanismo imunossupressor que envolve as células T citotóxicas. Células CD8 de pacientes encontram-se menos ativadas e expressam níveis mais baixos de receptores para a IL-15 e de grânulos citotóxicos quando comparadas aos dos indivíduos com paracoccidioidomicose-infecção³⁸.

Os trabalhos citados acima mostram que os processos decorrentes da interação do *P. brasiliensis* com o hospedeiro que culminam em proteção ou não desse último são altamente complexos. Embora vários deles já estejam relatados, estudos sobre a participação de outros potenciais fatores podem ampliar sobremaneira o nosso entendimento sobre a imunopatogênese da PCM. Nesse sentido, os eicosanóides são mediadores que devem ser avaliados.

Eicosanóides são lipídios biologicamente ativos derivados da oxidação do ácido araquidônico (AA), que por sua vez, se originam de fosfolipídios da membrana celular,

através da ação de enzimas denominadas fosfolipases (PLs), especificamente a fosfolipase A_2 (PLA₂). Em seguida, o AA é metabolizado pela ação de diferentes enzimas dando origem as prostaglandinas (PGs) e aos leucotrienos (LTs)²¹⁰.

As PGs são produzidas via ação da enzima prostaglandina G/H sintase (ciclooxigenase), originando um precursor comum, a prostaglandina H (PGH), que serve como substrato para um número de diferentes hidrolases e sintases específicas que produzem as diferentes classes de PGs (PGD₂, PGE₂ e PGF_{2α}) e tromboxanas (TBXs)^{79, 140}.

Em mamíferos existem duas isoformas de ciclooxigenases (COX), sendo que há diferenças significantes entre as mesmas, na distribuição tecidual e nos níveis de expressão. A COX-1 é expressa constitutivamente em muitos tipos celulares, particularmente no estômago, intestino, rins e plaquetas²¹⁰. A COX-2 é uma isoforma induzível, condicionada a estímulos inflamatórios^{5, 6}. Essas enzimas são inibidas por ação de uma classe de drogas conhecidas como antiinflamatórios não esteróides os quais incluem aspirina, indometacina, ibuprofeno e outros²³⁴. Além do seu tradicional papel como mediador dos primeiros estágios do processo inflamatório promovendo vasodilatação local, quimiotaxia e ativação de neutrófilos, macrófagos e mastócitos, as PGs, particularmente a PGE₂ desempenham um importante papel modulador sobre as funções das células da resposta imune inata e adaptativa⁹⁷.

No que se refere à resposta imune inata, estudos pioneiros mostraram o papel supressor da PGE₂ sobre a fagocitose e secreção de enzimas lisossomais por neutrófilos²⁰⁹. Esse mediador ainda atua sobre macrófagos alveolares inibindo a sua capacidade fagocitica^{9, 49}. Outros estudos mostraram que a alta produção de PGE₂ após o transplante de medula óssea é um fator critico para a diminuição da resposta imune contra patógenos. Nessas condições, esse mediador além de inibir a fagocitose, atua sobre a capacidade bactericida de macrófagos alveolares e neutrófilos, assim como sobre a produção de TNF- α^{12} . Os efeitos da PGE₂ sobre a atividade bactericida das células fagocitárias envolvem a redução do metabolismo do oxigênio²⁰¹. Outros estudos sugerem o papel para a (IRAK)-M (IL-1R–associated kinase) como mediadora da imunossupressão induzida pela PGE₂ no modelo de transplante de medula. Uma das ações dessa enzima é bloquear a fagocitose mediada pelo receptor do tipo scavenger¹⁰².

Ainda no que se refere à resposta imune inata, a PGE_2 inibe a atividade citolítica das células $NK^{14, 93}$. Esse efeito supressor sobre as células NK envolve a atuação da PGE_2 sobre as citocinas importantes para a ativação dessas células como a IL-12, IL-18²³⁶ e IL-15¹¹¹. A PGE_2 ainda inibe as atividades imunoregulatórias das células NK. Nesse sentido, essas células podem se diferenciar em células com alta capacidade de migração aos linfonodos, produzirem

IFN-γ após exposição às células dendríticas (DCs) ou sinais de ativação de células TCD₄, e ainda, promoverem a produção de IL-12 por DCs, e consequentemente o desenvolvimento de respostas envolvendo células CD₄ Th1 e células CD₈ citotóxicas. Esse processo é altamente induzido por IL-18, mas bloqueado pela PGE₂¹³⁴.

A PGE₂ também desempenha um importante papel modulador sobre a resposta imune especifica, desde a fase de indução até a de efetuação dessa resposta. Embora o seu efeito preponderante sobre o desenvolvimento da resposta imune especifica seja o de supressão, alguns trabalhos mostram que a adição de PGE₂ a um coquetel de citocinas como TNF-α, IL-1ß e IL-6 aumenta consideravelmente o processo de maturação das DCs com consequente aumento da sua capacidade de migração aos tecidos linfóides secundários, assim como a de expressar moléculas coestimulatórias e de ativar células T. Assim, DCs cultivadas na presença das citocinas citadas acima, mais PGE₂ tornam-se ótimas células indutoras de células CD_4/CD_8^+ produtoras de IFN- $\gamma^{110, 113, 187}$. No entanto, outros trabalhos têm demonstrado que DCs diferenciadas na presença de PGE₂ não induzem uma resposta do tipo Th1, de células T citotóxicas ou de NK, enquanto aumentam respostas do tipo Th2, sendo esse efeito mediado pela supressão da produção de IL-12 95, 112. Esse mediador ainda suprime diretamente a função das células T inibindo a produção de IL-2²³⁷ e da expressão do seu receptor¹⁸⁸. Inibe ainda os níveis da proteína JAK3¹¹⁹ e da expressão do receptor para IL-12²⁴⁵. Além desse efeito supressor inespecífico sobre as células T, esse mediador regula o balanço entre as atividades das células Th1 e Th2 em favor de uma resposta do tipo Th2, uma vez que inibe seletivamente a produção de citocinas de padrão Th1 como o IFN-y, mas não as de padrão Th2 como IL-4 e IL-5^{20, 211}. Adicionalmente a PGE₂, por alterar o balanço IL-12/IL-23 em favor da IL-23, promove diferenciação das células T em Th17^{27, 73, 116, 205, 244.}

A PGE₂ ainda inibe a atividade de células T citotóxicas indiretamente por induzir DCs não produtoras de IL- 12^{241} e diretamente, atuando sobre a indução de atividade dessas células^{96, 179} e sobre a capacidade dessas células já totalmente diferenciadas em interagirem com seus alvos^{217, 234}. A PGE₂ também diminui a produção de IFN- γ pelas células CD₈^{+ 83}.

Além desse efeito supressor sobre as células efetoras da resposta imune, vários trabalhos têm demonstrado que esse mediador induz a diferenciação de células que suprimem a resposta imune, como as Tregs, tanto em processos tumorais^{19, 204} como em outros processos de imunossupressão²¹³. O mecanismo de ação nesse caso envolve aumento da expressão do gene para o fator de transcrição FOXP3¹⁵. A PGE₂ ainda pode mediar a atividade das Tregs¹³³ e expandir as populações de células Tregs preexistentes, provavelmente por aumentar a

interação dessas células com as DCs^{13, 158}. Durante o desenvolvimento de processos tumorais a PGE₂ ainda pode induzir o acúmulo e retenção de células supressoras de origem mieloide $(MDSC)^{207}$ que têm capacidade de bloquear a imunidade adaptativa inibindo a ativação de células CD₄ e CD₈^{33, 127, 143, 208} e a imunidade inata inibindo as células NK²²¹.

A PGE₂, liberada pelas células tumorais é ainda capaz de induzir macrófagos teciduais a liberar grandes concentrações de IL- $10^{101, 219}$. Esse mediador ainda inibe a migração de monócitos em direção a estímulos quimiotáticos e de aderirem às células endoteliais provavelmente via modulação do receptor CCR5 e da β 2 integrina: Mac- 1^{247} . A PGE₂ ainda é uma das moléculas liberadas por macrófagos que se tornam supressores após a fagocitose de linfócitos apoptóticos e não conseguem conter a replicação de microrganismos⁸².

Os efeitos da PGE₂ citados acima, de caráter nitidamente supressor sobre a resposta imune, têm levado os pesquisadores a investigar o papel desse mediador nos mecanismos de imunossupressão detectados em várias infecções. Assim, estudos utilizando inibição farmacológica ou deleção genética da COX demonstraram uma substancial melhora da infecção in vivo e /ou aumento das funções das células fagocitárias in vitro, em infecções por várias bactérias como Klebsiella pneumonia⁹, Pseudomonas aeruginosa¹⁹⁴, Streptoccoccus pneumonia^{8, 218}. Edwards et al⁷⁰, demonstraram que em camundongos infectados com Mycobacterium avium intracellulare, a PG suprime a produção de IFN-γ pelos linfócitos com consequente inibição da atividade microbicida de macrófagos. 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 microrganismo³. 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 doença¹⁸². Farrel & Kirkpatrick⁷⁴, 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. Alguns autores demonstraram que camundongos BALB/c infectados com Leishmania major, suscetíveis à infecção, desenvolvem resposta imune preferencialmente mediada por Th2. No entanto, quando tratados com indometacina passam a desenvolver resposta do tipo Th1, mostrando o efeito da PGE₂ na indução de resposta não protetora, mediada por Th2⁶³. Da mesma forma, tratamento com *Glycyrrhizic acid* de camundongos infectados com *Leishmania donovani* com drogas inibidoras da expressão da COX-2 por macrófagos infectados resultou em aumento da expressão de No-sintase, IL-12, TNF- α e proliferação de células T associado à inibição de IL-10 e TGF- β e da carga parasitária no fígado e baço²¹.

Schleifer e Mansfield¹⁹⁷ 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 al¹⁷⁹, demonstraram que grandes quantidades de PGE₂, TNF- α e NO são produzidas durante a infecção por Trypanosoma 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 PGE₂, e NO que inibem a síntese de TNF- α . A inibição combinada de PGE₂ e NO restaura a capacidade proliferativa das células em resposta a ConA e antígeno. Da mesma forma, o tratamento durante a infecção com melatonina e meloxicam inibe a produção de PG com consequente aumento da resposta Th1, NO e redução da parasitemia¹⁶⁶. Barros-Mazon et al¹⁶, demonstraram que existe uma regulação diferenciada da resposta linfoproliferativa a antígenos do Trypanosoma 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.

Os LTs são mediadores lipídicos derivados do metabolismo do AA, pela ação da enzima 5-lipoxigenase (5-LO), em conjunto com uma proteína auxiliadora, a "5-LO-activating protein" (FLAP). Esses metabólitos são formados a partir de um hidroperóxido (5-HPETE) o qual é transformado em leucotrieno A₄ (LTA₄). Este, por sua vez, é instável e pode sofrer hidrólise enzimática gerando leucotrieno B₄ (LTB₄) ou então receber um resíduo de glutationa gerando o leucotrieno C₄ (LTC₄). A retirada enzimática do ácido glutâmico do LTC₄ dá origem ao leucotrieno D₄ (LTD₄) e com a retirada da glicina do LTD₄ forma-se o leucotrieno E₄ (LTE₄)¹⁷⁶. As funções biológicas dos LTs dependem da ativação de receptores que são mediadas via ligação da proteína G. Os LTB₄ e os membros da família dos CysLTs interagem com dois receptores distintos, os BLT1/2 e CysLTs1/2 respectivamente¹¹⁴. Esses mediadores próinflamatórios são produzidos por várias células como mastócitos e eosinófilos

que sintetizam principalmente CysLTs, e neutrófilos, macrófagos e DCs que secretam LTB₄. Estão envolvidos na patogênese de várias doenças incluindo a asma, na qual atuam como broncoconstritores e vasoativos¹²⁶. No entanto, outros estudos *in vivo* utilizando pacientes e modelos animais, assim como outros usando células *in vitro* têm mostrado que vários microrganismos induzem a produção de LTs, chamando a atenção para o papel desses mediadores, particularmente na resposta imune inata a infecções^{176, 178}.

Nesse sentido, os LTs foram identificados inicialmente como potentes agentes estimuladores da quimiotaxia e adesão de leucócitos às células endoteliais, com consequente maior migração de neutrófilos^{25, 59, 80, 94, 117, 132, 206}. No entanto, várias outras funções moduladoras tanto sobre a resposta imune inata, quanto sobre a adaptativa têm sido atribuídas a esses mediadores nos últimos anos⁶⁷. Assim sendo, em adição aos neutrófilos, os monócitos e macrófagos produzem leucotrienos e respondem a esses mediadores. O LTB₄ induz recrutamento de macrófagos e monócitos⁴ e produção de TNF- α^{87} e MCP-1 por monócitos¹⁰⁰. Da mesma forma, o LTC₄ e LTD₄ induzem a liberação de MCP-1 e seu receptor, o CCR2B¹⁰⁴, de TNF- α e metaloproteinase¹⁰⁵ por essas células, resultados que reforçam o papel desses leucotrienos nas funções de monócitos e macrófagos no processo inflamatório.

Outros numerosos estudos com modelos *in vitro* e *in vivo*, têm revelado o importante papel desses mediadores no aumento da fagocitose por monócitos/macrófagos^{139, 242, 243} e neutrófilos¹³⁸. Além da fagocitose, esses mediadores aumentam a capacidade microbicida dessas células contra vários microrganismos^{11, 60, 61, 65, 224, 246}. Esse efeito dos LTs está associado a sua capacidade de estimular os mecanismos efetores das células fagocitárias, como o metabolismo oxidativo. Nesse sentido, esse mediador promove a geração de NO por neutrófilos humanos^{125, 198} e macrófagos¹⁰³ e dos metabólitos do oxigênio em neutrófilos^{66, 125}. Estimula ainda a liberação de enzimas lisossomais^{106, 203} e de peptídeos antimicrobianos por neutrófilos, como as α - defensinas^{77, 78, 85} e as catelicidinas^{78, 238}.

As células dendriticas também produzem e respondem aos leucotrienos²¹⁵. O LTB₄ promove a migração das DCs maduras e imaturas aos sítios inflamatórios e aumenta a função e expressão do receptor para quimiocina CCR7, envolvido no acúmulo e organização dessas células e das células T nos linfonodos⁶⁴. O LTB₄ também está envolvido na indução de IL-12 pelas DCs, mostrando o importante papel desse mediador na instrução de uma resposta do tipo Th1²²⁷. Além do LTB₄, os CYsLTs têm uma importante participação na circulação de DCs para o sítios de encontro com o antígeno assim como para os linfonodos^{169, 189}.

No que se refere à resposta imune adaptativa, o LTB_4 especificamente, é um importante mediador para o recrutamento de linfócitos T efetores dos órgãos linfóides para os tecidos periféricos^{89, 222}. Adicionalmente, modula a ativação e adesão de células B por aumentar a expressão de CD23 e CD54 respectivamente¹⁹⁴.

Os estudos citados acima, mostrando as ações estimuladoras dos LTs sobre a resposta imune, associados aos achados que vários microrganismos induzem a sua produção chamam a atenção para o papel desses mediadores na proteção contra as diversas infecções^{176, 177}. Neste contexto, trabalhos pioneiros mostraram que LTB₄ adicionado à cultura de macrófagos murinos peritoneais aumentou a capacidade dessas células fagocitarem e destruírem *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*⁶⁵. Outros estudos mostraram um aumento na produção de LTs por macrófagos de camundongos infectados por *Klebsiella pneumonia*. Esse aumento esteve associado ao aumento da fagocitose, atividade microbicida e ativação da enzima NADPH oxidase^{11, 139, 200}. Peres et al¹⁷⁴, mostraram que os leucotrienos por aumentarem a atividade microbactericida das células fagocíticas, desempenham um papel protetor na infecção *in vivo* com *Mycobacterium tuberculosis*.

Coffey et al⁶¹, observaram que a síntese de LT endógeno por PMNs após a fagocitose de *Mycobacterium bovis* tem um importante papel na capacidade bactericida destas células. Em relação aos vírus, Chen et al⁵⁸, mostraram que os LTs estão envolvidos na proteção contra a encefalite causada pelo vírus da estomatite vesicular e na inibição da reativação do citomegalovirus após transplantes de medula⁹¹. Esse mediador também é importante na defesa contra o vírus da AIDS, pois pacientes com baixos níveis de CD₄ apresentam uma expressão diminuída de 5-LO e FLAP⁶⁰. Adicionalmente, a administração de LTB₄ a pacientes induziu o aumento de dois peptídeos anti-HIV importantes como as α -defensinas e a MIP-1 beta ("macrophage inflammatory protein"), que evita a entrada do HIV e ou inibe a sua replicação⁷⁷.

O papel protetor dos LTs foi identificado também em infecções por protozoários e helmintos e envolve a ação desses mediadores sobre os mecanismos das respostas imunes inata e adaptativa que incluem o aumento da atividade microbicida de macrófagos, a indução da quimiotaxia de células CD_4^+ e a produção de citocinas de perfil Th1, como o IFN- γ . No caso da infecção por helmintos, os LTs são produzidos por eosinófilos e mastócitos e especificamente os CysLTs contribuem para a expulsão desses microrganismos aumentando a produção de muco, contração da musculatura lisa intestinal e aumentando a permeabilidade das células CD₄ induz quimiotaxia de células CD₄ e regula a produção de IL-5

por essas células, assim como recruta e ativa eosinófilos, importantes na destruição dos helmintos¹⁹¹.

Os primeiros trabalhos sobre o papel dos LTs na infecção por protozoários foram realizados com Leishmania e mostraram que células esplênicas e macrófagos de camundongos infectados produzem LTC₄ in vitro^{183, 184}. Camundongos resistentes à Leishmania amazonensis produzem maiores níveis de LTB₄ quando comparados à cultura de células dos animais suscetíveis que produzem níveis baixos desse mediador. Adicionalmente, maiores níveis de LTs nos camundongos resistentes estiveram associados à maior produção de NO e atividade leishmanicida de macrófagos²⁰². No caso da toxoplasmose, os primeiros estudos mostraram que macrófagos peritoneais infectados in vitro com taquizoitos de Toxoplasma gondii liberam concentrações substanciais de LTC₄ e D₄²²⁶. Por outro lado, macrófagos de camundongos resistentes não liberam LTs após a fagocitose de Toxoplasma gondii¹²⁹. Outros estudos com macrófagos humanos mostraram que o toxoplasma inibe a produção de LTB₄, por essas células. Essa inibição representa um mecanismo de escape do Toxoplasma gondii do importante papel desempenhado por esse mediador na atividade antitoxoplasma induzida pelo IFN- γ^{246} . Os LTs também exercem um importante papel protetor na infecção pelo Trypanosoma cruzi. O LTB₄ e o LTC₄ aumentam as atividades fagocitica e microbicida de macrófagos incubados com as formas tripomastigotas do protozoário^{242, 243}. Talvani et al²²⁴, descreveram que a adição de LTs nas culturas de macrófagos peritoneais murinos, induzem produção de NO, aumento da síntese de TNF- α e da atividade microbicida contra o Trypanosoma cruzi. Outros estudos mostraram que apesar de os LTS desempenharem um papel não protetor durante a infecção chagásica participando do stress oxidativo dos eritrócitos mediado por NO, podem desempenhar ao mesmo tempo um papel protetor controlando o parasitismo cardíaco durante a fase aguda da infecção³¹. Estudos mais recentes têm confirmado o papel do LTs no controle da parasitemia, mediado por NO durante a infecção¹⁶⁸. Em relação aos helmintos, trabalhos têm mostrado que o LTC₄ e LTB₄ liberado de mastócitos intestinais participam de uma resposta protetora contra Trichinella spiralis, induzindo rápida expulsão desse helminto provavelmente devido aos efeitos do LTC₄, aumentando a contração da musculatura lisa, permeabilidade vascular, secreção de muco e do LTB₄ no recrutamento e ativação de células inflamatórias¹⁵¹. Nas infecções por Strongyloides venezuelensis, o LTB₄ está envolvido no aumento da produção de IgE e IL-5 e consequente no controle da carga parasitária¹³¹. Os LTs ainda têm um importante papel na inflamação eosinofílica durante a infecção por Toxocara canis, por induzirem recrutamento de leucócitos

e modularem a expressão de moléculas de adesão⁵⁴. O LTB₄ aumenta a destruição mediada pelo sistema complemento da larva de *Schistosoma mansoni* por neutrófilos e eosinófilos¹⁵⁰.

No que se refere a infecções fúngicas, os estudos sobre o papel dos LTs têm sido realizados principalmente na histoplasmose^{69, 145-147, 161, 199}. Nesse sentido, trabalhos iniciais mostraram que os LTs estão envolvidos no recrutamento de leucócitos induzidos pelo Histoplasma ou componentes de sua parede¹⁴⁷. Adicionalmente, mostraram que a administração de MK886, um inibidor da síntese de leucotrieno, induz alto índice de mortalidade em camundongos infectados ao mesmo tempo em que diminui a síntese de IL-2, IL-5 e IL-12 e IFN- γ^{145} . Outros estudos mostraram que a proteção de camundongos imunizados com antígenos de Histoplasma esteve associada a um aumento na produção de LTB₄ e IFN- γ assim como o recrutamento de células T de memória no pulmão¹⁴⁶. Estudos recentes mostraram que animais nocautes para a 5-LO apresentam maior carga fúngica no pulmão, diminuição da capacidade fagocitica dos macrófagos, da produção de NO e na geração e recrutamento de células T efetoras ao pulmão¹⁹⁹. O papel dos LTs também tem sido estudado nas infecções por Candida albicans. Estudos iniciais mostraram que o fungo estimula macrófagos a liberarem LTB₄ e LTD₄ via seus componentes de parede como β glucana e a α -manana⁵⁶. Trabalhos mais recentes mostraram que LTB₄ e CysLTs liberados por macrófagos alveolares em resposta a Candida albicans, estão envolvidos no aumento da fagocitose e destruição do fungo por essas células, por um mecanismo que envolve ativação da enzima NADPH oxidase. Adicionalmente, os resultados mostraram que o LTB₄ aumenta a fagocitose mediada pelos receptores de manose e dectina-1, enquanto que o LTD₄ é necessário para que ocorra uma ótima resposta via dectina-1¹⁵².

Os trabalhos avaliando os efeitos moduladores dos eicosanóides na PCM são bastante escassos. Estudos pioneiros foram realizados em relação ao efeito das PGs. Os resultados mostraram que durante a infecção experimental pelo fungo ocorre uma grande liberação de PGE₂ que medeia à imunossupressão em fases precoces da infecção por um mecanismo dependente de IL-4 e IL- 10^{149} . Com relação aos efeitos dos LTs na PCM, um estudo demonstrou que a infecção *in vitro* ou *in vivo* com o *P. brasiliensis* induz a produção de LTs. Nesse estudo, camundongos susceptíveis (B10.A) apresentam maiores níveis de LTs nos pulmões bem como aumento da infecção, quando comparados com os animais resistentes. Além disso, foi avaliado o efeito do inibidor de LTs (MK-0591) na infecção *in vitro* e *in vivo* com o *P. brasiliensis*. O tratamento de macrófagos alveolares com MK-0591 reduziu significantemente a recuperação de células leveduriformes do fungo; por outro lado, o

tratamento *in vivo* dos animais com MK-0591 não alterou a severidade da PCM pulmonar. Assim, os autores sugerem que os LTs atuam na resposta de macrófagos após a interação com o fungo, como importante modulador da resposta destas células em murinos¹⁸⁶.

Nos últimos anos, estudos em nosso laboratório têm avaliado o papel modulador desses eicosanóides sobre as atividades antifúngicas de monócitos humanos. Os resultados mostraram que o *P. brasiliensis* induz monócitos humanos a produzirem PGs que inibem a atividade fungicida dessas células. O mecanismo de ação das PGs envolve diminuição da produção de TNF- α pelas células, com consequente redução dos níveis de H₂O₂, o metabólito envolvido na destruição do fungo por monócitos humanos. Esse efeito inibidor das PGs pode ser revertido pela pré-ativação das células com IFN- γ e principalmente TNF- α e GM-CSF. Essas citocinas induziriam as células a produzir mais TNF- α e consequentemente mais H₂O₂^{29, 30, 212} compensando a inibição desses fatores pelas PGs. Além das PGs, estudos preliminares em nosso laboratório, mostraram que o fungo induz a produção de LTs que, ao contrário das PGs, modulam positivamente a atividade fungicida de monócitos humanos⁷⁵. Esses estudos demonstraram de forma clara a capacidade do *P. brasiliensis* em induzir a produção de eicosanóides por monócitos humanos que, de uma forma autócrina, modulam a função dessas células.

Os estudos citados acima mostram claramente a capacidade dos diversos microrganismos, incluindo o P. brasiliensis de induzir a produção de eicosanóides pelas células do hospedeiro. No entanto, a literatura tem mostrado cada vez mais que os próprios microrganismos, têm capacidade de produzir esses mediadores^{71, 72, 164, 165, 229}. Os autores discutem que a descoberta de que fungos patogênicos produzem e respondem aos eicosanóides imunomoduladores revela um mecanismo de virulência que pode ter grandes implicações para o entendimento dos mecanismos das infecções fúngicas¹⁶². Assim, além da investigação da produção de eicosanóides, os estudos se voltaram para a investigação do papel desses mediadores lipídicos na biologia fúngica. Noverr et al¹⁶⁴, demonstraram que Cryptococcus neoformans e Candida albicans produzem PGs através da conversão do AA de fonte endógena e/ou exógena. Essa produção está diretamente relacionada com o crescimento destes fungos, uma vez que o tratamento com inibidores da síntese de COX reduz significativamente a viabilidade das leveduras. Esses autores mostraram ainda que a adição de diferentes ácidos graxos como AA, ácidos oléico, linoléico ou y-linoléico e também de PGs ou tromboxanas nas culturas de Candida albicans, induzem o crescimento deste fungo e também a formação de tubo germinativo¹⁶³. Em outro estudo, Noverr et al¹⁶⁵, mostraram que outros fungos patogênicos como *Aspergillus fumigatus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum* e *Penicillium notatum* produzem PGs e LTs na ausência ou presença de fonte exógena de AA.

Além da participação na biologia dos fungos, alguns autores testaram a capacidade desses mediadores modularem a atividade de algumas células da resposta imune. Para isso, purificaram PGs das culturas de células fúngicas e adicionaram a outras culturas de células fúngicas e a culturas de células de camundongos. As PGs purificadas foram capazes de induzir o crescimento e também a transição de micélio-levedura nas culturas fúngicas. Nas culturas de esplenócitos isolados de camundongos da linhagem CBA/J, as PGs modularam de forma negativa a produção de quimiocinas e de TNF- α bem como a proliferação celular, enquanto estimularam a produção de IL-10¹⁶⁴.

Em estudos posteriores, o mesmo grupo de autores, investigou se a PG produzida por esses fungos pode ser classificada como PGE₂ autêntica, isto é, semelhante à liberada pelas células de mamíferos e se é derivada da oxidação do ácido araquidônico via a ação da enzima COX. Assim, Erb-Downward & Noverr⁷², mostraram que a *Candida albicans* produz PGE₂ autêntica, utilizando para essa produção a via metabólica da COX. Por outro lado, Erb-Downward & Huffnagle⁷¹, mostraram que o fungo *Criptococcus neoformans* também é capaz de produzir PGE₂ autêntica, no entanto a oxidação do AA para a produção deste metabólito não envolve a participação de COX, uma vez que, o tratamento das culturas com inibidores desta enzima (aspirina e indometacina) não afetou a produção de PGE₂.

Baseados nesses estudos, tivemos interesse em avaliar se cepas de alta e baixa virulência do *P. brasiliensis* produzem PGs de forma semelhante, e se essa produção envolve a via metabólica da COX, como ocorre nas células dos mamíferos. Os ensaios foram realizados incubando as culturas de células leveduriformes com ou sem indometacina. Os resultados revelaram que as duas cepas produziram níveis similares de PGs mostrando que a produção desses mediadores não está associada a diferentes padrões de virulência. Os níveis apresentaram-se diminuídos na presença de indometacina, sugerindo a utilização da via da COX. Adicionalmente, a produção esteve diretamente relacionada com a manutenção da viabilidade do fungo²⁸. Outros estudos utilizando um número maior de cepas confirmaram a não diferença entre elas em relação à produção de PGs e mostraram que o fungo pode também utilizar fontes exógenas de AA para a produção desses mediadores²². Recentemente, mostramos que o *P. brasiliensis* tem capacidade de produzir LTs, possivelmente utilizando a via metabólica da 5-LO, que de forma semelhante às PGs estão envolvidos na viabilidade e crescimento do fungo²³.

No entanto, os ensaios realizados até o momento, não permitiram identificar se as PGs e LTs liberados pelo *P. brasiliensis* podem ser considerados como PGE₂ e LTB₄ autênticos, como já identificados para os eicosanóides liberados por *Candida albicans*⁷² e *Cryptococcus neoformans*⁷¹. Alem disso, torna-se importante avaliar se o fungo produz os demais metabólitos do AA, como as outras classes de PGs e LTs, e as TBXs. Da mesma forma, há a necessidade de confirmar se as vias metabólicas utilizadas são as mesmas utilizadas pelas células de mamíferos, isto é, a da COX para a produção de PGs e 5-LO para LTs. Em relação a esta última questão, a abordagem experimental utilizada tem sido a identificação de genes codificadores dessas enzimas.

Objetivos

2- Objetivos

- 1. Avaliar a produção de todos os possíveis metabólitos resultantes do metabolismo do ácido araquidônico por cepas de diferentes virulências do *P. brasiliensis*.
- 2. Avaliar se a PGE₂ e LTB₄ produzidos pelo *P. brasiliensis* são eicosanóides autênticos.
- Avaliar se o *P. brasiliensis* produz PGE₂ e LTB₄ usando as vias metabólicas da COX e da 5-LO respectivamente.

Material e Métodos

3- Material e Métodos

3.1. Cultivo 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.

3.2. Obtenção das suspensões de P. brasiliensis

Células leveduriformes de Pb18 e Pb265 cultivadas de acordo com o item 3.1 foram coletadas da superfície de cultivo com auxílio de alça de platina, 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, a suspensões celulares foram mantidas à 37° C durante 5 minutos para sedimentação de grumos não desfeitos durante a agitação. Após este período, os sobrenadantes foram coletados, e uma alíquota foi utilizada para contagem em câmara hemocitométrica tipo Neubauer, em 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 apresentarem pelo menos 95% de viabilidade²¹².

3.3. Culturas de células leveduriformes de Pb18 e Pb265

Para a realização das culturas, a concentração das suspensões de Pb18 e Pb265 (obtidas de acordo com o item 3.1) foi ajustada para $4x10^4$ células leveduriformes/mL de RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), suplementado com 2 nM de L-glutamina (Sigma-Aldrich) e 40 µg de gentamicina. A seguir, a suspensão foi plaqueada em placas de macroculturas (1000 µL/poço) de fundo chato com 24 poços e cultivadas em tensão de 5% de CO₂ à 37°C por diferentes períodos e na presença de diferentes substâncias na dependência do experimento.

3.4. Análise da produção de PGE₂ e LTB₄ por Pb 18 e Pb265 utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

Para avaliação da produção de PGE_2 e LTB_4 pela técnica de HPLC as suspensões de células leveduriformes foram cultivadas como descrito no item 3.2 por 4, 8 ou 12 horas, em agitação orbital (aparelho SteadyShake 757- Amerex Intruments Inc.) somente com meio RPMI (Sigma-Aldrich), ou com RPMI adicionado de ácido araquidônico (AA) (Sigma-Aldrich) nas concentrações de 500 e 1000 μ M. Após os diferentes períodos, os sobrenadantes foram coletados e submetidos a um processo de purificação.

3.4.1. Purificação das amostras para análise por HPLC

Para purificação das amostras a serem analisadas quanto à produção dos diferentes eicosanóides pela técnica de HPLC utilizamos o protocolo anteriormente descrito por Peters-Golden et al (1990). Os sobrenadantes das culturas de células leveduriformes foram coletados e filtrados utilizando filtros PVDF com membrana de 0,22 µm. Após esse processo, foram adicionados 2,0 mL de metanol e 3,0 mL de PBS, aos sobrenadantes, sendo o volume final da solução de 10,0 mL contendo 20% de metanol. Em seguida esta solução foi aplicada em cartucho SepPack Cartridges C18, (Waters Corporation), previamente preparado por lavagens com 20 mL de metanol e em seguida 20 mL de água destilada para acondicionamento do mesmo. Após a aplicação da amostra, foram realizadas seguidas lavagens do cartucho, primeiramente com 5,0 mL de metanol a 20% em PBS, seguido de 5,0 mL de água destilada, sendo estes volumes desprezados. Posteriormente o cartucho foi lavado com 3,0 mL de metanol 80% em água destilada para o desprendimento dos compostos de interesse que ficaram retidos no cartucho e a coleta dos mesmos. As amostras coletadas foram submetidas a centrifuga SpeedVac SC110 (Savant) para evaporação do sobrenadante. Em seguida, os microtubos contendo os compostos concentrados foram submetidos à exposição em nitrogênio líquido, por 5 minutos e posteriormente armazenados em freezer -80°C até o momento da análise.

3.4.2. Análise por HPLC

Para análise por HPLC as amostras foram submetidas à coluna C18 (Phenomenex) de 50 x 4,60 mm, com medida interna de 2,5 μ m e granulação de 2,5 microns. Uma solução composta por acetonitrila, água e ácido acético em uma proporção de 35:65:0,1 respectivamente, foi utilizada como fase móvel para as análises de PGE₂. Outra solução composta pelos mesmos reagentes descritos acima na proporção de 73:27:0,1

respectivamente, foi utilizada como fase móvel para as análises de LTB₄. Todos os reagentes apresentaram alto grau de pureza para HPLC e foram filtrados antes das análises. A fase móvel foi escolhida baseando-se em dados coletados do manual do padrão de Mix Eicosanoid HPLC Mixture (6-keto PGF₁ α , TBX₂, PGF₂ α , PGE₂ e PGD₂) (Cayman Chemicals). As amostras a serem analisadas foram previamente ressuspensas em 500 µl de fase móvel, sendo 100µl injetadas na coluna C18 acoplada ao aparelho de HPLC Shimatzu, com coletor modelo SIL-10AF e detector de fluorescência modelo RF-10AxL com condições de análise de 142 Atm de pressão, com um fluxo de injeção de 1 mL/min e comprimento de onda variando de acordo com o eicosanoide analisado por um período total de 30 minutos. Os resultados da análise são demonstrados através do tempo de retenção (RT) comparados com o RT das concentrações conhecidas dos padrões de PGE₂ e LTB₄ (Cayman-Chemical) com pureza ≥ 99%, que foram diluídos nas concentrações de 62.5, 125, 250 e 500 ng/mL para a obtenção de curva padrão.

3.5. Avaliação quantitativa e caracterização de PGE₂ e LTB₄ produzidos pelo *P*. *brasiliensis* utilizando a técnica de Cromatografia líquida acoplada a Espectrometria de Massas (LC/MS-MS)

Suspensões de células leveduriformes foram cultivadas como descrito no item 3.2, por 4 horas, em agitação orbital (aparelho SteadyShake 757- Amerex Intruments Inc.) somente com meio RPMI (Sigma-Aldrich), ou com RPMI adicionado de AA (Sigma-Aldrich) nas concentrações de 500 e 1000 μ M, à 37°C por 4 horas. Após, os sobrenadantes foram coletados e submetidos a um processo de purificação, como descrito no item 3.3.1.

3.5.1. Coleta das frações contendo PGE2 ou LTB4

As amostras purificadas foram ressuspensas em 500 μ L de fase móvel (descrita no item 3.3.2) para PGs ou LTs respectivamente e submetidos ao aparelho GPC (Gilson), composto de uma bomba injetora modelo 231XL e de um coletor de frações modelo 206. O volume total das amostras foi injetado no aparelho e as frações foram coletadas baseando-se nos tempos de retenção, que foram padronizados inicialmente pelos resultados obtidos na técnica de HPLC, de cada composto. Para PGE₂ foi coletada a fração no tempo de 12 a 15 minutos de retenção e para LTB₄ a fração coletada corresponde ao tempo de 5 a 7,30 minutos de retenção. Em seguida as frações coletadas foram submetidas a analise por LC/MS-MS para avaliação da produção e confirmação da estrutura molecular da PGE₂ e LTB₄.

3.5.2. Análise por LC/MS-MS

Para avaliar quantitativamente a produção e a estrutura molecular da PGE_2 e do LTB_4 produzidos nos sobrenadantes das culturas de células leveduriformes do *P. brasiliensis*, as frações coletadas conforme descrito no item 3.4.1, foram analisadas por espectrômetro de massas quadripolo de dupla análise (Applied Biosystems) ligado a um sistema HPLC (Shimatzu) (LC/MS/MS). Um volume de 100 µL das frações foi injetado no aparelho através de um injetor de amostras (SIL-20AC) com um fluxo de injeção de 0,4 mL/min com tempo de análise de 30 minutos.

As análises quantitativas da produção PGE_2 e LTB₄ foram realizadas através da quebra (ionização) dos compostos nas ligações mais fracas entre carbonos. Cada composto analisado apresenta esta fraca ligação em locais específicos e únicos. Os parâmetros de análise para cada amostra foram inicialmente padronizados a partir de padrões comerciais de PGE_2 e LTB₄ (Cayman Chemical). As concentrações de PGE_2 e LTB₄ foram adquiridas a partir de diluições conhecidas dos padrões de PGE_2 (96.6, 49.2, 25.7, 13.8 e 5.85 ng/mL) e de LTB₄ (98.4, 49, 27, 12.6 e 6.02 ng/mL) para obtenção de curva padrão.

3.6. Avaliação qualitativa da produção de diferentes classes de PGs e LTs pelo *P. brasiliensis* utilizando a técnica LC/MS-MS

Para avaliar a produção das diferentes classes de PGs e LTs produzidas nos sobrenadantes das culturas de *P. brasiliensis* obtidas de acordo com o item 3.2, culturas foram incubadas somente com AA 1000 μ M (Sigma-Aldrich) à 37°C por 4 horas, em agitação orbital (aparelho SteadyShake 757-Amerex Intruments Inc.). Após esse período, os sobrenadantes foram coletados, submetidos ao processo de purificação conforme descrito no item 3.3.1 e as frações contendo PGs e LTs foram coletadas em aparelho GPC, conforme descrito no item 3.4.1. Em seguida as amostras foram submetidas a analise por LC/MS-MS para avaliação qualitativa da produção de PGD₂, PGF₂a, TBXs, LTC₄, LTD₄, LTE₄ e 5-HETE, baseados no tempo de retenção e da ionização inicialmente padronizados a partir de padrões comerciais (Cayman Chemical) dos respectivos eicosanoides.

3.7. Pesquisa de genes que codificam as enzimas COX e 5-LO, ou enzimas funcionalmente homólogas no *P. brasiliensis*.

Para avaliar a presença de genes que codificam as enzimas COX e 5-LO, ou enzimas funcionalmente homólogas no *P. brasiliensis*, foi realizada inicialmente a busca por sequências gênicas codificadoras para tais enzimas, utilizando banco de dados genômico do *Broad Institute (BLAST Similarity Search)* (http://www.broadinstitute.org) com o auxílio da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Em seguida as sequências encontradas foram submetidas ao alinhamento gênico e à análise filogenética utilizando o programa MEGA 5.04 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*).

Adicionalmente, as informações obtidas após com o alinhamento das sequências gênicas, foram confirmadas quanto à identidade utilizando o programa de consulta de alinhamentos múltiplos Pfam (*Protein Families Data Base*) (http://www.sanger.ac.uk/software/Pfam).

3.8. Quantificação relativa de mRNA para enzima *Linolate diol sintase* (LDS) por RT-PCR em tempo real

Culturas de células leveduriformes na concentração de $4x10^4$ células leveduriformes/mL foram plaqueadas em placas de culturas contendo 24 poços (1000 μ L/poço) e incubadas somente com meio RPMI (Sigma-Aldrich), ou com AA 1000 μ M (Sigma-Aldrich) à 37°C por 0, 4, 8 ou 12 horas, em agitação orbital (aprelho SteadyShake 757- Amerex Intruments Inc.). Após os diferentes períodos, as amostras foram avaliadas pela técnica de RT-PCR em tempo real para a detecção de mRNA para LDS.

3.8.1. Extração de RNA

Inicialmente foi realizado o processo de digestão da parede celular das leveduras de *P*. *brasiliensis* utilizando Tampão de Liticase, composto por 50 mM de Tris (pH7.5), 10 mM de EDTA, 1mM de sorbitol, 0.1 % de 2-mercaptoetanol e 1 unidade/mL de liticase (todos os reagentes da Sigma-Aldrich). Após os diferentes períodos de incubação, o volume total das culturas foi coletado, transferido para microtubos e centrifugado a 14.000 RMP por 1 minuto. Em seguida o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* contendo células leveduriformes foi ressuspenso em 100 μ L do tampão de liticase e incubado por 10 minutos à 37°C.

Posteriormente, a extração do RNA total das culturas de células fúngicas foi realizada utilizando Kit de extração e purificação de RNA - Total RNA Purification Kit (Norgen
Biotek, Canadá). Com o objetivo de eliminar o DNA residual genômico extraído junto com o RNA, as amostras foram tratadas com a enzima DNAse (DNAse I) (GE Healthcare). 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 260 nm e 280 nm.

3.8.2 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 μ g de amostra de RNA foram adicionados 2,0 μ L de Tampão da reação (RT 10X), 0,8 μ L da mistura de nucleotídeos (dNTP- 25x) 100 mM, 2,0 μ L de Random Primers, 1,0 μ L da enzima Transcriptase Reversa, 1,0 μ L de inibidor de RNAse (GeneAmp – Applied Biosystems) e 3,2 μ L de H₂O deionizada tratada com 0,1% de DEPC (dietilpirocarbonato).

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 10 min 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.

3.8.3. RT-PCR em tempo real

Para detecção da produção de mRNA para LDS foram utilizados 2 primers específicos. Para LDS-1 primer sense 5'-GGAGCCTGGAGACCGGGTCC-3' e anti-sense 5'-CCCCTGTCCCAGGTGGACGT-3' e para LDS-2 primer 5'sense GTTGCGGAGTCGGCGTCGAG-3' e anti-sense 5'-CTGCCGTTGCCAGTTCGGGT-3'. Como controle endógeno foram utilizados sequências de primers para β-tubulina, primer 5'-TTCGCCCAAAGTCTCCGTACAAA -3' e primer 5'sense anti-sense GCTCAACGAGCTGATGAACCGACA -3'. Os primers foram desenhados utilizando o software IDTSciTools (http:// www.idtdna.com) a partir de sequência publicada no Genebank.

A reação de RT-PCR em tempo real para a quantificação relativa de mRNA de LDS, foi desenvolvida no aparelho de PCR em tempo real modelo 7300 (APPLIED Biosystems, EUA) com o uso do *Kit Maxima Syber Green / ROX qPCR Máster Mix* (2X) (Fermentas Molecular Biology) conforme as instruções do fabricante, em um volume final de 20 μ L, com adição de 4 μ L da amostra de cDNA (obtido conforme item 3.7.2) 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.

Para a construção da curva padrão, em todas as placas foi adicionado o cDNA de uma mesma amostra diluída de forma seriada na concentração de 1:10. Os valores de expressão relativa para LDS foram 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 gene controle endógeno β -tubulina.

3.9. Análise estatística

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

Resultados

4- Resultados

4.1. Avaliação da produção de PGE₂ e LTB₄ por *P. brasiliensis* pela técnica de HPL

Inicialmente foi avaliada a capacidade do P. brasiliensis produzir PGE2 e LTB4 utilizando a técnica de HPLC (High-Performance Liquid Cromatography), em diferentes períodos de incubação e com diferentes concentrações de AA. Essa técnica, mostra o tempo de retenção específico para cada eicosanóide. Tempo de retenção é o tempo que o analito leva para percorrer a coluna analítica e atingir o detector-UV, ou seja, o tempo decorrido entre o momento da injeção da amostra até o aparecimento do pico máximo no detector.

Os resultados foram analisados com base em dados obtidos a partir de uma curva com diferentes concentrações dos padrões comerciais para PGE_2 e LTB_4 (Cayman Chemicals), e foram representados em cromatogramas que demonstram o pico de produção dos eicosanóides com tempo de retenção (RT) em minutos e a intensidade de fluorescência (IF). A figura 1 mostra o cromatograma representativo de um ponto da curva para PGE_2 (1A) e LTB_4 (1B) na concentração de 500 ng/ml. Para PGE_2 o tempo de retenção (RT) foi 15.556 e intensidade de fluorescência (IF) de 9.974 e, para LTB_4 observamos o RT de 7.052 e IF de 28.346.

A figura 2 mostra os resultados das análises feitas nas culturas de Pb18 tratados somente com RPMI, com AA 500 ou 1000 µM, nos períodos de 4 (A), 8 (B) e 12 (C) horas para a produção de PGE₂. Podemos observar que após o período de incubação de 4 horas foi possível detectar pico de produção para PGE₂ nas culturas tratadas somente com meio RPMI com RT de 13.126 e IF de 5.133 que corresponde à concentração de 257,3 ng/ml. O tratamento com AA 500 e 1000 µM, aumentou a produção de PGE₂, que apresentou RT de 13.185, IF de 12.262 e concentração de 614,6 ng/ml e, RT de 13.274, IF de 11.366 e concentração de 569,78 ng/ml respectivamente. Após o período de incubação por 8 horas foi observado aumento no pico de produção de PGE2 nas culturas tratadas somente com meio RPMI, RT: 13.600, IF 88.510 e concentração de 4.437 ng/ml, comparadas com as mesmas culturas após o período de 4 horas de incubação. No entanto, após o tratamento com AA 500 e 1000 µM foi detectada diminuição na produção deste eicosanoide para 123,8 ng/ml (RT: 13.896 e IF: 2.470) e para 250,45 ng/ml (RT: 13.393 e IF: 4.996). Após o período de 12 horas foi observado que as culturas tratadas somente com RPMI apresentaram diminuição da produção de PGE2 (1.374 ng/ml; RT: 13.422, IF: 27.410), em relação ao observado nas culturas de 4 e 8 horas de incubação. Após o tratamento com AA 500 foi observada uma produção de 615 ng/ml (RT: 13.422 e IF: 12.279) e com 1000 μ M, foi observada novamente diminuição nas concentrações de PGE₂ para 161 ng/ml (RT 13.452 e IF: 3.229).

A figura 3 mostra os resultados das análises feitas nas culturas de Pb265 tratados somente com RPMI, com AA 500 ou 1000 μ M, nos períodos de 4 (A), 8 (B) e 12 (C) horas para a produção de PGE₂. Da mesma forma que o observado para as culturas de Pb18, foi detectada produção de PGE₂ nas culturas tratadas somente com meio RPMI após 4 horas de incubação, com RT de 13.393, IF de 13.553 e concentração de 679,4 ng/ml. No entanto, ao contrário do observado para as culturas de Pb18, não foi detectado aumento na produção deste eicosanoide após o tratamento com AA 500 μ M que resultou na produção de 87,17 ng/ml (RT: 13.442 e IF: 13.553) ou com AA 1000 μ M (65,52 ng/ml, RT: 13.442 e IF: 1.307). Além disso, a produção de PGE₂ nestas culturas foi menor do que a observada nas culturas de Pb18.

Após 8 horas de incubação, as culturas tratadas somente com RPMI apresentaram menor produção de PGE₂ (304 ng/ml, RT 13.481 e IF 6.067) quando comparadas com as culturas de 4 horas e também com as culturas de Pb18. No entanto, ao contrário do que foi observado para as culturas de Pb18, a concentração de PGE₂ aumentou após o tratamento com AA 500 μ M (608,23 ng/ml, RT: 12.711 e IF: 12.133) ou com AA 1000 μ M (833 ng/ml, RT: 12.089 e IF: 16.617).

Após 12 horas de incubação, a concentração de PGE_2 nas culturas tratadas com RPMI foi de 345,19 ng/ml (RT: 11.556 e IF: 6.886), aumentou após o tratamento com AA 500 μ M para 441,7 ng/ml (RT: 11.022 e IF: 8.813) e diminuiu após o tratamento com AA 1000 μ M para 103,16 ng/ml (RT: 10.489 e IF: 2.058).

A produção de LTB₄ pela cepa Pb18 do *P. brasiliensis* pode ser observada na figura 4. Da mesma forma, as culturas foram tratadas somente com RPMI ou com AA 500 e 1000 μ M, nos períodos de 4 (A), 8 (B) e 12 (C). Foi possível observar um mesmo padrão de resposta, em relação ao obtido para as mesmas culturas quando avaliadas para a produção de PGE₂.

As culturas tratadas somente com RPMI por 4 horas apresentaram produção de 13,79 ng/ml (RT: 6.281 e IF: 0.782), que aumentou após o tratamento com AA 500 μ M (778,59 ng/ml, RT: 6.341 e IF: 44.140) e com AA 1000 μ M (540,25 ng/ml, RT: 6.370 e IF: 30.628). Após 8 horas de incubação, foi observado aumento na produção de LTB₄ nas culturas tratadas com RPMI, quando comparadas com as mesmas culturas após 4 horas de incubação, com concentração de 2.178 ng/ml, RT de 6.370 e IF de 123.531. No entanto, a concentração de

LTB₄ diminuiu após o tratamento com AA 500 μ M (194,29 ng/ml, RT: 6.370 e IF: 11.015) e com AA 1000 μ M (45,27 ng/ml, RT: 6.370 e IF: 2.567) quando comparadas com as concentrações obtidas nas culturas tratadas somente com RPMI.

Após 12 horas de incubação os valores de LTB_4 , foram menores nas culturas tratadas com RPMI (224,31 ng/ml, RT: 6.341 IF: 12.717), com AA 500 μ M (130,4 ng/ml, RT: 6.281 e IF: 7.398) e nas culturas tratadas com AA 1000 μ M (8,62 ng/ml, RT: 6.281 e IF: 0.489).

A figura 5 mostra as concentrações de LTB₄ obtidas a partir das análises feitas em culturas de Pb265 tratadas somente com RPMI, com AA 500 ou 1000 μ M, nos períodos de 4 (A), 8 (B) e 12 (C) horas. Da mesma forma que o observado para todas as culturas, foi observada produção de LTB₄ nas culturas tratadas somente com RPMI após 4 horas de incubação (146 ng/ml, RT: 6.311 e IF: 8.327), que diminuiu após o tratamento com AA 500 μ M (41,54 ng/ml, RT: 6.281 e IF: 2.355) bem como após o tratamento com AA 1000 μ M (12,6 ng/ml, RT: 6.281 e IF: 0.719).

Após 8 horas de incubação, da mesma forma que o observado nas culturas de Pb18, foi detectado um aumento na concentração de LTB_4 nas culturas tratadas somente com RPMI (266,70 ng/ml, RT: 6.281 e IF: 15.120) que diminuiu após o tratamento com AA 500 μ M (69,78 ng/ml, RT: 6.281 e IF: 3.956) e com AA 1000 μ M (32 ng/ml, RT: 6.281 e IF: 1.818).

Após 12 horas, os níveis de LTB₄ foram ainda menores: 9,01 ng/ml (RT: 6.281 e IF: 0.511) nas culturas tratadas somente com RPMI, 28,04 ng/ml (RT: 6.252 e IF: 1.590) nas culturas tratadas com AA 500 μ M e 9.38 ng/ml (RT: 6.281 e IF: 0.532) nas culturas tratadas com AA 1000 μ M.



Figura 1: Cromatogramas da análise por HPLC dos padrões comerciais para PGE_2 (A) na concentração de 500 ng/ml e para LTB_4 (B) na concentração de 500 ng/ml.





Figura 2: Cromatogramas da análise por HPLC da produção de PGE_2 nas amostras de sobrenadantes das culturas da cepa Pb18 incubadas somente com RPMI (controle) ou com AA 500 e 1000 μ M nos períodos de 4 (A), 8 (B) e 12 (C) horas de incubação.



Figura 3: Cromatogramas da análise por HPLC da produção de PGE_2 nas amostras de sobrenadantes das culturas da cepa Pb265 incubadas somente com RPMI (controle) ou com AA 500 e 1000 μ M nos períodos de 4 (A), 8 (B) e 12 (C) horas de incubação.



Figura 4: Cromatogramas da análise por HPLC da produção de LTB_4 nas amostras de sobrenadantes das culturas da cepa Pb18 incubadas somente com RPMI (controle) ou com AA 500 e 1000 μ M nos períodos de 4 (A), 8 (B) e 12 (C) horas de incubação.







Figura 5: Cromatogramas da análise por HPLC da produção de LTB_4 nas amostras de sobrenadantes das culturas da cepa Pb265 incubadas somente com RPMI (controle) ou com AA 500 e 1000 μ M nos períodos de 4 (A), 8 (B) e 12 (C) horas de incubação.

4.2.Confirmação da produção de PGE₂ e LTB₄ autênticos pelo *P. brasiliensis* pela técnica de LC/MS-MS

Após detectarmos que as cepas Pb18 e Pb265 do *P. brasiliensis* são capazes de produzir PGE₂ e LTB₄ nos diferentes períodos de incubação e com diferentes concentrações de AA, bem como obtermos o tempo de retenção específico para a PGE₂ e para o LTB₄ pela técnica de HPLC, realizamos ensaios com o objetivo de confirmar se esses eicosanóides produzidos são PGE₂ e LTB₄ autênticos, utilizando a técnica de Espectrometria de Massas (LC/MS-MS). Essa técnica é uma importante ferramenta para a análise de pequenas moléculas em diversas matrizes biológicas, e os benefícios deste acoplamento são decorrentes da combinação do alto poder de separação da cromatografia líquida com a seletividade e sensibilidade da espectrometria de massa, garantindo uma análise específica da estrutura molecular dos produtos avaliados.

Para a análise e confirmação da estrutura molecular de PGE_2 e LTB_4 produzidos nos sobrenadantes das culturas das cepas Pb18 e Pb265 do *P. brasiliensis*, as mesmas foram incubadas por 4 horas na presença ou não de AA 500 ou 1000 µM. A escolha deste período de incubação foi baseada nos resultados prévios obtidos pela técnica de HPLC.

O processo de avaliação da espectrometria de massas baseia-se na quebra (ionização) dos compostos nos carbonos com ligação mais fraca da molécula resultando em fragmentos únicos de massas conhecidas. Para a PGE₂, que tem massa de 351.132 daltons, a ionização ocorre de forma positiva, com massas 271.000, 315.100 e 333.100 daltons.

A figura 6 mostra o cromatograma representativo da produção de PGE₂ por LC/MS-MS. Foi observado que o padrão comercial de PGE₂ (fragmento de 271.000 daltons) apresenta pico com RT de 4,04 minutos (figura 6A). Nos sobrenadantes das culturas das cepas Pb18 e Pb265 incubadas somente com RPMI, não foi detectada a produção de PGE₂. Após a incubação com AA 500 ou 1000 μ M foi observado que as culturas da cepa Pb18 produzem PGE₂ autêntica, uma vez que a ionização desta molécula resulta em um fragmento com massa e com RT idênticos ao obtidos para o padrão comercial, com 271.000 daltons e RT: 4,11 AA de 500 μ M e 271.000 daltons e RT: 4,09 após a incubação com ou 1000 μ M (figura 6B). O mesmo foi observado para as culturas da cepa Pb265, com fragmentos de 271.00 daltons e RT de 4,09 após a incubação com AA 500 ou 1000 μ M. Para a confirmação da estrutura molecular da PGE_2 e do LTB_4 , bem como a obtenção das concentrações exatas de cada eicosanóide produzidos em nossas amostras, foi realizada adicionalmente a análise quantitativa dos mesmos nos sobrenadantes das culturas das cepas Pb18 e Pb265. Assim, a figura 7 mostra as concentrações de cada fragmento obtido após a ionização da molécula de PGE₂ produzidas nos sobrenadantes das culturas cepas Pb18 e Pb265 do *P. brasiliensis*, incubadas por 4 horas na presença ou não de AA 500 ou 1000 μ M, após a análise por LC/MS-MS. Observamos que não foi detectada produção de PGE₂ nas culturas tratadas somente com RPMI nas analises de nenhum dos 3 fragmentos das 2 cepas.

Para a cepa Pb18 foi detectada a produção de 160 ng/ml de PGE₂ após a incubação com AA 500 μ M e 434 ng/ml após a incubação com AA 1000 μ M, para o fragmento de 271.000 daltons (Figura 7A). Para o fragmento de 315.100 daltons (Figura 7B) as concentrações foram de 138 ng/ml e 216 ng/ml após a incubação com AA 500 e 1000 μ M, respectivamente; e para o fragmento de 333.100 daltons (Figura 7C) de 260 ng/ml e 361 ng/ml de PGE₂ após a incubação com AA 500 e 1000 μ M, respectivamente.

Nas culturas da cepa Pb265 foi observada a produção de 164 ng/ml de PGE₂ após a incubação com AA 500 μ M e 218 ng/ml após a incubação com AA 1000 μ M, para o fragmento de 271.000 daltons (Figura 7A), 170 ng/ml após a incubação com AA 500 μ M e 237 ng/ml após a incubação com AA 1000 μ M, para o fragmento de 315.100 daltons (Figura 7B). Para o fragmento de 333.100 (Figura 7C) as concentrações detectadas foram de 301 ng/ml e 393 ng/ml de PGE₂ após a incubação com AA 500 e 1000 μ M, respectivamente.

Na figura 8 está demonstrado o cromatograma representativo da produção de LTB₄ por LC/MS-MS. Esse eicosanoide apresenta massa de 335.026 daltons e ioniza-se de forma negativa, com massas 58.900, 195.100 e 317.200 daltons. Foi possível observar que o padrão comercial de LTB₄ (fragmento de 58.900 daltons) apresenta pico com RT de 6,47 minutos (figura 8A). Da mesma forma como observado par a produção de PGE₂, não foi detectada a produção de LTB₄ nas culturas incubadas somente com RPMI. A produção de LTB₄ autêntico pela cepa Pb18 foi observada após incubação com AA 500 ou 1000 μ M, já que a ionização desta molécula resultou em um fragmento com massa e com RT idênticos ao obtidos para o padrão comercial, com 58.900 daltons e RT: 6.43 (figura 8B). Para as culturas da cepa Pb265, foi detectado fragmento de 58.900 daltons com RT de 6,41 após a incubação com AA 500 μ M e com RT de 6,42 após a incubação com AA 1000 μ M.

A figura 9 mostra as concentrações de cada fragmento obtido após a ionização da molécula de LTB₄ produzidas nos sobrenadantes das culturas das cepas Pb18 e Pb265 do *P. brasiliensis*, incubadas por 4 horas na presença ou não de AA 500 ou 1000 μ M, após a análise por LC/MS-MS. Da mesma forma que o observado para a produção de PGE₂, após o tratamento somente com RPMI, não foi detectada a presença de nenhum dos 3 fragmentos de LTB₄ nas culturas das cepas Pb18 e Pb265. Para o fragmento de 58.900 daltons as concentrações foram de 14 ng/ml após incubação com AA 500 μ M e 19,7 ng/ml após a incubação com AA 1000 μ M, para a cepa Pb18, e 13,7 ng/ml após incubação com AA 500 μ M e 19,4 ng/ml após a incubação com AA 1000 μ M, para a cepa Pb265.

Para o fragmento de 195.100 daltons foi observada a produção de 9,26 ng/ml após incubação com AA 500 μ M e 10,1 ng/ml após a incubação com AA 1000 μ M para a cepa Pb18 e 14,4 ng/ml após incubação com AA 500 μ M e 13,2 ng/ml após a incubação com AA 1000 μ M para a cepa Pb265.

Não foi detectada a produção do fragmento de 317.200 daltons de LTB_4 , após a incubação de 4 horas com os diferentes tratamentos, nas culturas das cepas Pb18 e Pb265.





Figura 6: Cromatogramas da análise por LC/MS-MS da produção de PGE₂. Padrão comercial de PGE₂, fragmento de 271.000 daltons (A). Amostras dos sobrenadantes das culturas das cepas de Pb18 (B) e Pb265 (C) tratadas com AA 500 μ M ou 1000 μ M por 4 horas.

A AB Acodest MDS

Created with Analyst Reporter Printed: 25/01/2012;1:47:07 PM

Prostaolandina / 271 000

Results Summary

Sample Name	Calc. Conc. (ng/mL)	Analyte RT
18	N/A	3.90
18 com 0.5 AA	160.	4.05
18 com 1 AA	434	4.05
265	N/A	4.12
265 com 0 5 AA	164	4.02
265 com 1 AA	218.	4.02

B AB Appled MDS Madynoid

Prostaglandina / 315 100

Results Summary

Sample Name	Calc. Conc. (ng/mL)	Analyte RT
18	N/A	4.04
18 com 0.5 AA	138.	4.05
18 com 1 AA	216	4.04
265	N/A	4.14
265 com 0 5 AA	170.	4.16
265 com 1 AA	237.	4.16

Created with Analyst Reporter Printed: 25/01/2012;1:47:07 PM

CAB Solythern MDS Technologies

Greated with Analyst Reporter Printed: 26/01/2012 1 41 10 PM

Prostaglandina / 333.100

Results Summary		
Sample Name	Calc. Conc. (ng/mL)	Analyte RT
18	N/A	4.04
18 com 0.5 AA	260	4.18
18 com 1 AA	361	4.18
265	N/A	4.19
265 com 0.5 AA	301.	4.16
265 com 1 AA	393.	4.16

Figura 7: Concentrações dos diferentes fragmentos ionizados da molécula de PGE_2 produzidas nos sobrenadantes das culturas de Pb18 e Pb265, tratadas ou não com AA 500 ou 1000 μ M por 4 horas obtidas pela técnica de LC/MS-MS. Fragmento de 271.000 daltons (A). Fragmento de 315.100 daltons (B). Fragmento de 333.100 daltons (C).











Figura 8: Cromatogramas da análise por LC/MS-MS da produção de LTB₄. Padrão comercial de LTB₄, fragmento de 58.900 daltons (A). Amostras dos sobrenadantes das culturas das cepas de Pb18 (B) e Pb265 (C) tratadas com AA 500 μ M ou 1000 μ M por 4 horas.

A AB applied | MDS turbeling

Created with Analyst Reporter Printed 26/01/2012 1.41:10 PM

Leucotrieno / 58.900

Sample Name	Calc. Conc. (ng/mL)	Analyte RI
Pb 265	N/A	0.00
Pb 265/0.5	14.0	6.41
Pb 265/1.0	19.7	6.42
Pb 18	N/A	0.00
P5 (80.5	13.7	6.43
Pb 16/1.0	19.4	6.43

B AB Acoded MDS technique

Leucotrieno / 195.100

Results	s Sumi	mary
---------	--------	------

Sample Name	Calc. Conc. (ng/mL)	Analyte RT
Pb 265	N/A	6.53
Pb 265/0.5	9.26	6.52
Pb 265/1.0	10.1	6.53
Pb 18	N/A	6.29
Pb 18/0.5	14.4	6.54
Pb 18/1.0	13.2	6.55

Greated with Analyst Reporter Printed: 26/01/2012 1 41 10 PM C AB Appled MDS heather

Created with Analyst Reporter Printed 26/01/2012 1 41 10 PM

Leucotrieno / 317.200

Results	Summary
---------	---------

Sample Name	Calc. Conc. (ng/mL)	Analyte R1
Pb 265	0.00	6.54
Pb 265/0.5	0.00	6.54
Pb 265/1.0	0.00	6.54
Pb 18	0.00	6.34
Pb 18/0.5	0.00	6.55
Pb 18/1.0	0.00	6.56

Figura 9: Concentrações dos diferentes fragmentos ionizados da molécula de LTB₄ produzidas nos sobrenadantes das culturas de Pb18 e Pb265, tratadas ou não com AA 500 ou 1000 μ M por 4 horas obtidas pela técnica de LC/MS-MS. Fragmento de 58.900 daltons (A). Fragmento de 195.100 daltons (B). Fragmento de 317.200 daltons (C).

4.3. Análise qualitativa das diferentes classes de PGs e LTs pelo *P. brasiliensis* pela técnica de LC/MS-MS

Uma vez que detectamos produção de PGE₂ e LTB₄ autênticos nos sobrenadantes das culturas das cepas Pb18 e Pb265 do *P. brasiliensis*, avaliamos adicionalmente a capacidade de o fungo produzir outras classes de PGs e LTs, como PGD₂, PGF₂a, Tromboxanas (TBX), LTC₄, LTD₄, LTE₄ e 5-HETE.

Para esta análise, as culturas foram tratadas somente com AA 1000 μ M por 4 horas, já que nos resultados anteriores obtidos pela LC/MS-MS não foram observadas diferenças significativas na produção de PGE₂ e LTB₄ após o tratamento somente com RPMI ou com AA 500 μ M.

A figura 10 mostra a análise qualitativa da produção de PGF₂a. Esta molécula tem massa exata de 353.258 daltons e a ionização ocorre de forma positiva, gerando fragmentos de 193.300, 165.200 e 309.000 daltons. O pico analisado foi o de 193.300 daltons que apresenta RT de 4,79 minutos (figura 10 A). Os resultados da análise dos sobrenadantes das culturas de Pb18 e Pb265 foram mostrados nas figuras 10B e 10C respectivamente. Em ambas

as culturas foi detectado pico de produção de PGF_2a , fragmento de 193.300 daltons com RT de 4,74 para as culturas de Pb18 e RT de 4,88 para as culturas de Pb265.

A figura 11 mostra a análise qualitativa da produção de PGD₂. Esta molécula tem massa exata de 351.190 daltons e a ionização ocorre de forma positiva, gerando fragmentos de 271.300, 351.200 e 232.800 daltons. O pico analisado foi o de 271.300 daltons que apresenta RT de 4,78 minutos (figura 11 A). Os resultados da análise dos sobrenadantes das culturas de Pb18 e Pb265 são mostrados nas figuras 11B e 11C respectivamente. Em ambas as culturas foram detectados picos de produção de PGD₂, fragmento de 271.300 daltons com RT de 4,79 para as culturas de Pb18 e RT de 4,85 para as culturas de Pb265.

A análise qualitativa da produção de tromboxanas (TBX) está demonstrada na figura 12. Esta molécula tem massa exata de 368.997 daltons e a ionização ocorre se de forma positiva, gerando fragmentos de 169.000, 195.100 e 125.300 daltons. O pico analisado foi o de 169.000 daltons que apresenta RT de 4,67 minutos (figura 12 A). Os resultados da análise dos sobrenadantes das culturas de Pb18 são mostrados nas figuras 12B. Foi detectado pico de produção de TBX, fragmento de 169.000 daltons com RT de 4,67. Nas culturas da cepa Pb265 não foi detectado pico de produção para TBX (figura 12C).

A molécula de 5-HETE apresenta massa exata de 319.038 daltons e ioniza de forma negativa gerando os fragmentos de 114.700, 301.100 e 59.000. A figura 13A representa a análise do pico 319.038 daltons que apresenta RT de 6,97 minutos. Os resultados da análise dos sobrenadantes das culturas de Pb18 e Pb265 são mostrados nas figuras 13B e 13C respectivamente, e mostram a produção de 5-HETE através do pico representativo do fragmento de 319.038 daltons com RT de 6,91 para Pb18 e 6,97 para Pb265.

Na figura 14 é demonstrada a análise da produção de LTC₄. Esta molécula tem massa exata de 626.234 daltons e a ionização ocorre de forma negativa, gerando fragmentos de 189.500, 105.100 e 91.200 daltons. O pico analisado foi o de 189.500 daltons que apresenta RT de 6,048 minutos (figura 15A). Os resultados da análise dos sobrenadantes das culturas de Pb18 e Pb265 são mostrados nas figuras 14B e 14C respectivamente. Não foi observada a produção de LTC₄ nas culturas das duas cepas do *P. brasiliensis*.

O LTD₄ apresenta massa exata de 497.235 daltons e ioniza de forma negativa gerando os fragmentos de 198.300, 105.100 e 91.100. A figura 15A mostra a análise do pico 189.500 daltons que apresenta RT de 6,04 minutos. Da mesma forma como observado para o LTC₄, não foi detectada a produção de LTD₄ nos sobrenadantes das culturas de Pb18 (figura 15B) e Pb265 (figuras 15C).

A análise qualitativa da produção LTE_4 está demonstrada na figura 16. A massa exata deste eicosanoide é de 440.182 daltons e a ionização ocorre se de forma negativa, gerando fragmentos de 189.200, 105.100 e 91.100 daltons. O pico analisado foi o de 189.300 daltons que apresenta RT de 6,27 minutos (figura 16A). Os resultados da análise dos sobrenadantes das culturas de Pb18 e Pb265 são mostrados nas figuras 16B e 16C e não foi detectado pico de produção de LTE₄.





Figura 11: Cromatogramas da análise por LC/MS-MS da produção de PGD₂. Padrão comercial de PGD₂, fragmento de 217.300 daltons (pico azul) (A). Amostras dos sobrenadantes das culturas das cepas de Pb18 (B) e Pb265 (C) tratadas com 1000 μ M de AA por 4 horas.



Figura 12: Cromatogramas da análise por LC/MS-MS da produção de TBX. Padrão comercial de TBX, fragmento de 169.000 daltons (pico azul) (A). Amostras dos sobrenadantes das culturas das cepas de Pb18 (B) e Pb265 (C) tratadas com 1000 µM de AA por 4 horas.



Figura 13: Cromatogramas da análise por LC/MS-MS da produção de 5-HETE. Padrão comercial de 5-HETE, fragmento de 114.700 daltons (pico azul) (A). Amostras dos sobrenadantes das culturas das cepas de Pb18 (B) e Pb265 (C) tratadas com 1000 μ M de AA por 4 horas.



Figura 14: Cromatogramas da análise por LC/MS-MS da produção de LTC₄. Padrão comercial de LTC₄, fragmento de 189.500 daltons (pico azul) (A). Amostras dos sobrenadantes das culturas das cepas de Pb18 (B) e Pb265 (C) tratadas com 1000 μ M de AA por 4 horas.



Figura 15: Cromatogramas da análise por LC/MS-MS da produção de LTD_4 . Padrão comercial de LTD_4 , fragmento de 189.500 daltons (pico azul) (A). Amostras dos sobrenadantes das culturas das cepas de Pb18 (B) e Pb265 (C) tratadas com 1000 μ M de AA por 4 horas.



Figura 16: Cromatogramas da análise por LC/MS-MS da produção de LTE₄. Padrão comercial de LTE₄, fragmento de 189.300 daltons (pico azul) (A). Amostras dos sobrenadantes das culturas das cepas de Pb18 (B) e Pb265 (C) tratadas com 1000 μ M de AA por 4 horas.

4.4. Avaliação da expressão genes que codificam a enzima Linoleate Diol Sintase (LDS) pelo *P. brasiliensis*

Uma vez que os resultados descritos anteriormente mostram claramente a produção de PGE₂ e LTB₄ autênticos, bem como de PGD₂, PGF₂a, TBX e 5-HETE pelo P. brasiliensis, nosso objetivo seguinte foi avaliar a presença de genes que codificam a enzima responsável por esse processo. Para isso, inicialmente tivemos como referencia, estudos da literatura que demonstram a expressão de genes que codificam a enzima dioxigenase, que desempenha a função de converter ácidos graxos em PGs, por Gaeumannomyces gramini, um fungo descrito na literatura como ancestral para a expressão da enzima dioxigenase⁹⁹, Aspergillus nidulans e Aspergillus fumigatus (ppoA, ppoB e ppoC)^{228, 230-232}. As sequências apresentadas pelos autores foram: ppoA2f (5'-TTCCCTGAATTCGTTTAGGGTAGC-3') e ppoA2r (5'-GTTGAAAAGCTTGCAATGATCAACG-3') para 0 gene AfppoA; ppoB2f (5'-TACCCTGGAGCAATACCCACC-3') e ppoB2r (5' ACCGGCTACCCAGATCAAAGCA-

3') para o gene *AfppoB* e *ppoC2f* (5'-ATCCAAGCGCACGTTCGCCG-3') e *ppoC2r* (5'-TGAACTCCTTGCTGGCCTTTCC-3') para o gene *AfppoC*.

Estas sequências foram depositadas no banco de dados genômico *Broad Institute* e com o auxílio da ferramenta BLAST, foi pesquisada a presença de sequências gênicas homólogas no *P. brasiliensis*. Esta ferramenta compara sequências gênicas de DNA, RNA ou proteínas com rapidez e sem perder a sensibilidade. Os valores dados são baseados em interpretação estatística facilitando a escolha de identidades reais e não semelhanças que ocorram ao acaso. Foram encontradas as sequências genômica, codificadora e protéica para a enzima *Linolate Diol Sintase* (LDS) que apresenta o código de acesso no GenBank: EEH47374.1 (LOCUS: EEH47374 / 1066aa).

>Sequência genômica

Linolate Diol Sintase do Paracoccidioides brasiliensis

 ${\tt ATGCATCTCAAGAGTTTCGGTTCCAGCATTGTCTTATGCATTTATTGTTATCGCACCACAGCGCTAATATCTGACCCAGAGCGCGCTGTTCCAT}$ GTCATTGCCGTTGCGGAGTCGGCGTCGAGAATGAAAGGGTTTGATGGGAATCGTCCATCCGTGGAAAGGTGGGGAATAGTATTTCTCAGGTCA GCCAACTCATTCACTCTCACTGCGTCCGCTGCCCACCCGAACTGGCAACGGCAGTTATATCGATGACACCCCACCCGAACCCGGTTTAATAGC CGATTTAAAGAGCGTCGGCATTAAGGATATCGATACGCTGGTTGAAGTTGTTCGGAATGCTGCCACGGGAAAACCAGTCAATGACAAAGATTAT CTCAAGATCCCCCAATGCGGATAGATTAAACCATGCTCTTCTGTCTCTGCTCTGGAACGATCTCAAGCATCCGCCATTGTCGTAGGTATACCTT ${\tt CTGCATTTTACCACATTTTTACTGACGTTCTGATCCCAGATATCTTGGTGACCAATATGTGTATAGACAGGCAGATGGTTCGCATAATGTAAA$ AATGATATCAATTATTCCTGTCCTGTTGCTAAACAAGCTAATGTTGGGATAGAATGTCCTTTGGCCGCCAAATTGGTGCTGCGGGGCTCCTCATAT GCAAGGACTGTGCCACCGAAATCGATACAACCAACTGTACTTCCAGACCCGGGTACACTCTTCGATAGCCTCTTGGTTAGGAAAAGGTTTGAAC ${\tt CTCATCCTAATAGAATATCAAGCATGTTGTTCTACATGGCCACTGTCATTACCCATGGTAACCACCTACAGTCCTGTCCAGTAGCTTTTGCCGC$ GATTCTTACGTGTGAATAGACTTGTTTCGCACTGACCGTCAGGACAACACCCCGCTCCCTTACTTCCTCGTACCTTGATCTTTCCCCCTCTATACG GTAGTAATCAGGAAGAGCAGAATGCAGTCCGCACCTTCAAGGGCGGGAAGCTAAAGCCAGACTGCTTTTCGAACAAGGGAATTCTAGGATTCCC AAACCAGATGTGCTTAATGCTAAGGGTTACTCCAAATACGACAATGACCTTTTCCAAACCGGACGCCTTATCACATGTGGCCTATACATAAATC ${\tt TAATTTTAAAAGATTACGTGCGAACTATTCTCAACGTCAACAGGGCCAAAAGTGATTGGAGTCTTGATCCCCGTTTAGAATCTACAAAAGGTCT$ GTTTTGTACAGAGATTAACGAGGCAAGCGGCAACCAGGTATCTGCGGAATTTAACTTGATATATCGCTGGCATTCATGTATTTCAGAGCGCGAC GACAAATGGATCCAAGGTGTTTTAAAAGAGCTCTTTGGCGATAGTAAGGACCTGAGGAATATCACTTTTCTGAATACTTGCGGGTTCTTGAAA AATGGGAGGCAGGACTTTCTGAGGATCCTCCGAAGCGACCTTTCGCAAATCTGGAGCGTGAGCCCAATAGTTTGTTCAGCGATGACGACCTGGT TAATATTCTTGCGGAAAGCATCGAAGACTGTGCGGGTCGGTTTGGCGCTTCACAAATACCTCCCGTCCTCCGGGTTGCGGAAATCCTGGGTATC AAGCAAGCGCGATCATGGAGACTTTCGAGTCTCAATGAGTTTCGCAAATATTTCAATCTCAAGCCCCACGAAACTTTCGAAGACATCAACTCTG ACCCCTACATTGCTGATCAACTCAAGCATTTGTATGATCATCCCGACAACGTTGAACTCTATCCTGGTGTCATTGTCGAGGAGGCAAAGGCACC ${\tt CATGGTACCTGGCAGTGGCCTCTGTGCGAGTTTTACTATTTCTCGGGCAATTCTTTCCGATGCCGTTGCCTTGGTGCGCGGTGACCGCTTCTAT$ ACAGTGGATTATTGTCCAAAGAATCTAACAAACTGGGGGCTTTAGGGAAGCAAACTTCGACAACTCTGTTGACCAGGGTCATGTGTTTTATAAAC CTAAAAAACCAAAGGGATTTTAAAGTTACATGGGGTGAAGCCATCGAGTTTTTAATGCATAAAGGGGCCAAACCGTTTGGCAGAGACTTTATGC TGGCTGGAGATGATCCAGCCAACGTAGCTTCGAGGGAGATGATGAGAAAGGCGTTATATCAAAGAACATGGGAAGGGGAAGTGAAAAAGTTTTA TGAGCAGATATCCCTCAAACTTCTTCACCGCAAATCATACAAGATTGCCGGAGTCAGCCAGGTGGACATCGTGCGAGATGTTGCAAATCTTGCC TGGCTCTTGTTTTCACCTGCATATTTTTCGATGCAGATCCTGCAAAAAGCTTCCCGCTTCGTCAAGCGGCTCGGAAGTTAACTCAACAGCTTGG GGACATTGTCATGTTACACGTGCTATTGATCAGGCAAACTGGATTTCTTGCAAGCATGGCTGGACGGTTATATGGAAGTGATGTTGATGGAG TACGGGGTCCATATGATTCGCCGTTTACTGGCTACGGGATTGCTCCCGGAGGAAATTGTCTGGACACATATGCTCCCCACGGCAGGGGGAATGG TAGCAAACCAGGCACAGCTATTCTCGCAGTGTCTCGAGTACTATTTGTCAGAGGAAGGTTCTATCCATTGGCCTGAAATCCATCGGCTGTCGAA GTTAGATACCGCCGCAGGCTGATGCGCTCCTCTTGAAATAGTAGGTCTCTTTGTCATCAAATCGCCGTACAACGGCACATGTATATTATTATTGAC ${\tt CGAGTTTAATTTGGAGCCTGGAGACCGGGTCCTTTGTAACTTGGTAGGTCAAAATGAGACCAGAATGCTGCCAGAACGAAATGCTGATTCCACT$ ATTAGGTTCAGGCATCTATGGATCCCAAGAGGTTCCCTGAGCCCAGCAAGGTTGATTTGACGCGTGACATTAACTCATACGTCCACCTGGGACA GGGGCCCCCATAAATGCTTGGGTTTCGGGATCTGCAATGTAGCGCTGTCGACAATGTTGAAAACGGTGGGGAAACCTGGAAAACCTGCGCCGAGCA CGGGGCCCTCAAGGTGAATTAAGGAGGATTCCTGGACCTGGTGGCATCAGCAAATATTTAATGGCAGATTATACATCCTACTCCCCTTCCCAT CCACGATGAAGGTACAGTGGGGATGGGGAATTGCCGCTTCTTACGGAGTAA

>Sequência codificadora

Linolate Diol Sintase do Paracoccidioides brasiliensis

 ${\tt ATGCATCTCAAGAGTTTCGGTTCCAGCATTAGCGCGCTGTTCCATGTCATTGCCGTTGCGGAGTCGGCGTCGAGAATGAAAGGGTTTGATGGGA$ ATTCGTCCATCCGTGGAAAGGTGGGGAATAGTATTTCTCAGGTCAGCCAACTCATTCACTCTTCACTGCGTCCGCTGCCCACCCGAACTGGCAA CGGCAGTTATATCGATGACACCCCACCCCGAACCCGGTTTAATAGCCGATTTAAAGAGCGTCGGCATTAAGGATATCGATACGCTGGTTGAAGTT GTTCGGAATGCTGCCACGGGAAAACCAGTCAATGACAAAGATTATATCCTAGAAAGAGTGATACAGAATGTCCTTTGGCCGCAAATTGGTGCTG GAAAAGGTTTGAACCTCATCCTAATAGAATATCAAGCATGTTGTTCTACATGGCCACTGTCATTACCCATGACTTGTTTCGCACTGACCGTCAG GACAACACCCCGCTCCCTTACTTCCTCGTACCTTGATCTTTCCCCTCTATACGGTAGTAATCAGGAAGAGCAGAATGCAGTCCGCACCTTCAAGG gcgggaagctaaagccagactgcttttcgaacaagggaattctaggattccccccaggtgtcggcgtgcttcttataatgtttaaccggttcca TAACTATGTTGATGAAATCTCGCTGTGATCAACCAAGACGGTCGTTTCACCAAACCAGATGTGCTTAATGCTAAGGGTTACTCCAAATACGAC AATGACCTTTTCCAAACCGGACGCCTTATCACATGTGGCCTATACATAAATCTAATTTTAAAAGATTACGTGCGAACTATTCTCAACGTCAACA GGGCCAAAAGTGATTGGAGTCTTGATCCCCGTTTAGAATCTACAAAAGGTCTGTTTTGTACAGAGATTAACGAGGCAAGCGGCAACCAGGTATC TGCGGAATTTAACTTGATATATCGCTGGCATTCATGTATTTCAGAGCGCGACGACAAATGGATCCAAGGTGTTTTAAAAGAGCTCTTTGGCGAT AGTAAGGACCTGAGGAATATCACTTTTTCTGAATACTTGCGGGTTCTTGAAAAATGGGAGGCAGGACTTTCTGAGGATCCTCCGAAGCGACCTT ${\tt TCGCAAATCTGGAGCGTGAGCCCAATAGTTTGTTCAGCGATGACGACCTGGTTAATATTCTTGCGGAAAGCATCGAAGACTGTGCGGGTCGGTT$ CGCAAATATTTCAATCTCAAGCCCCACGAAAACTTTCGAAGACATCAACTCTGACCCCTACATTGCTGATCAACTCAAGCATTTGTATGATCATC CCGACAACGTTGAACTCTATCCTGGTGTCATTGTCGAGGAGGCAAAGGCACCCATGGTACCTGGCAGTGGCCTCTGTGCGAGTTTTACTATTTCTCGGGCAATTCTTTCCGATGCCGTTGCCTTGGTGCGCGGTGACCGCTTCTATACAGTGGATTATTGTCCAAAGAATCTAACAAACTGGGGCTTT AGGGAAGCAAACTTCGACAACTCTGTTGACCAGGGTCATGTGTTTTATAAACTATTCCTTAGGGCTTTTCCAAATCACTTCAAATCGAATTCAG TTTATGCACACTTCCCGGCTAGTGATCCCCGGGTGAAAACAAAGAAGTCCTTACGAAATTGGATCTTGTAGGGAATTATTCATGGGATAGGCCAGC CAGAATTCAACATCCAATTATGATCGAGTCGTACGCTGCATGCGATGCCAATCCTAAAAAACCCAAAGGGATTTTAAAGTTACATGGGGTGAAGCC TGAGAAAGGCGTTATATCAAAGAACATGGGAAGGGGAAGTGAAAAAGTTTTATGAGCAGATATCCCTCAAACTTCTTCACCGCAAATCATACAA GATTGCCGGAGTCAGCCAGGTGGACATCGTGCGAGATGTTGCAAATCTTGCCCATGTCCATTTTGCAGCCGCTGTCTTTTCGCTTCCGCTCAAG ${\tt A} {\tt C} {\tt A} {\tt C} {\tt A} {\tt C} {\tt A} {\tt C} {\tt C$ ${\tt CAAAAAGCTTCCCGCTTCGTCAAGCGGCTCGGAAGTTAACTCAACAGCTTGGGGACATTGTCATGTTACACGTGCTATTGATCAGGCAAACTGG$ ${\tt ATTTCTTGCAAGCATGGCTGGACGGTTATATGGAAGTGATGTGTTGATGGAGTACGGGGTCCATATGATTCGCCGTTTACTGGCTACGGGATTG$ CTCCCCGGAGGAAATTGTCTGGACACATATGCTCCCCCACGGCAGGGGGAATGGTAGCAAACCAGGCACAGCTATTCTCGCAGTGTCTCGAGTACT ATTTGTCAGAGGAAGGTTCTATCCATTGGCCTGAAATCCATCGGCTGTCGAAGTTAGATACCGCGGAGGCTGATGCGCTCCTCTTGAAATATGC GAGCCTGGAGACCGGGTCCTTTGTAACTTGGTTCAGGCATCTATGGATCCCAAGAGGTTCCCTGAGCCCAGCAAGGTTGATTTGACGCGTGACA TTAACTCATACGTCCACCTGGGACAGGGGCCCCATAAATGCTTGGGTTTCGGGATCTGCAATGTAGCGCTGTCGACAATGTTGAAAACGGTGGG GAAACTGGAAAACCTGCGCCGAGCACGGGGCCCTCAAGGTGAATTAAGGAGGATTCCTGGACCTGGTGGCATCAGCAAATATTTAATGGCAGAT TATACATCCTACTCTCCCTTCCCATCCACGATGAAGGTACAGTGGGGATGGGGAATTGCCGCTTCTTACGGAGTAA

>Sequência proteica

Linolate Diol Sintase do Paracoccidioides brasiliensis

MHLKSFGSSISALFHVIAVAESASRMKGFDGNSSIRGKVGNSISQVSQLIHSSLRPLPTRTGNGSYIDDTPPEPGLIADLKSVGIKDIDTLVEV VRNAATGKPVNDKDYILERVIQNVLWPQIGAAGSSYARTVPPKSIQPTVLPDPGTLFDSLLVRKRFEPHPNRISSMLFYMATVITHDLFRTDRQ DNTRSLTSSYLDLSPLYGSNQEEQNAVRTFKGGKLKPDCFSNKGILGFPPGVGVLLIMFNRFHNYVVENLAVINQDGRFTKPDVLNAKGYSKYD NDLFQTGRLITCGLYINLILKDYVRTILNVNRAKSDWSLDPRLESTKGLFCTEINEASGNQVSAEFNLIYRWHSCISERDDKWIQGVLKELFGD SKDLRNITFSEVLRVLEKWEAGLSEDPFKRPFANLEREPNSLFSDDDLVNILAESIEDCAGRFGASQIPPVLRVAEILGIKQARSWRLSSLNEF RKYFNLKPHETFEDINSDPYIADQLKHLYDHPDNVELYPGVIVEAKAPMVPGSGLCASFTISRAILSDAVALVRGDRFYTVDYCPKNLTNWGF REANFDNSVDQGHVFYKLFLRAFPNHFKSNSVYAHFPLVIPGENKEVLTKLDLVGNYSWDRPARIQHPIMIESYAACDAILKNQRDFKVTWGEA IEFLMHKGAKPFGRDFMLAGDDPANVASREMMRKALYQRTWEGEVKKFYEQISLKLLHRKSYKIAGVSQVDIVRDVANLAHVHFAAAVFSLPLK TEENPRGIYTETEMYGIMALVFTCIFFDADPAKSFPLRQAARKLTQQLGDIVMLHVLLIRQTGFLASMAGRLYGSDVLMEYGVMIRRLLATGL LPEEIVWTHMLPTAGGMVANQAQLFSQCLEYYLSEEGSIHWPEIHRLSKLDTAEADALLLKYALEGARLRGTVALYRDVVTKTSINDGENEFNL YTSYSPFPSTMKVQWDGELPLLTE

http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/Blast.html?sp =Sblastn

Em seguida, foi realizado o alinhamento da sequência proteica da enzima LDS do *P*. *brasiliensis* com as sequências das enzimas dioxigenase já descritas para *Gaeumannomyces* gramini, Asperguillus fumigatus e com as sequências das prostaglandina H_2 sintase 1 e 2 (COX-1 e COX-2) humanas, utilizando o programa MEGA 5.04 para alinhamento de sequências múltiplas. O programa calcula os melhores pareamentos para cada sequência e mostra alinhamentos de tal forma que as identidades e diferenças fiquem claras. Assim, a Figura 17 mostra o alinhamento parcial das cinco sequências proteicas e, os asteriscos representam os nucleotídeos idênticos ao longo das mesmas.

Além disso, o programa MEGA 5.04 mostra os relacionamentos evolucionários entre as sequências alinhadas, possibilitando a análise filogenética das mesmas. Desta forma, foi possível propor uma árvore de gene baseada nas informações obtidas após o alinhamento das sequências gênicas. A figura 18 mostra que a sequência proteica da enzima LDS é filogenéticamente mais próxima das sequências encontradas em *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus fumigatus*, e filogenéticamente mais distante das sequências da prostaglandina H₂ sintase 1 e 2 humanas. Para a proposta da arvore de gene, as sequências são analisadas por diferentes possibilidades de alinhamento e os resultados são expressos em % das probabilidades testadas. Assim, após as diferentes análises os resultados mostram que o alinhamento das sequências do *P. brasiliensis* com as do *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus nidulans* apresentaram homologia estrutural em 21% dos alinhamentos analisados. Por outro lado, o alinhamento das sequências do *P. brasiliensis* com as sequências das prostaglandina H₂ sintase 1 e 2 humanas apresentaram diferenças estruturais em 100% das dos alinhamentos analisados.

Paracocidioides brasiliensis (Pb18) (linoleate dol synthase) Gaeumannomyces graminis - (linoleate dol synthase) Aspergillus furnigatus - (linoleate dol synthase) Homo sapiens (prostaglandin-endoperoxide synthase 1) Homo sapiens (prostaglandin-endoperoxide synthase 2)	CGTTTCATTGCTAATGCTTGCTCTTCCGGGTTCT-TTTTGGCAGTGCGGTGGTCGCAAACTCCCGTTTTCATTTTTGGCATCAGAACGAGCGCCGCTATTTGG
Paracoccidioides brasiliensis (Pb18) (linoleate diol synthase) Gaeumannomyces graminis - (linoleate diol synthase) Aspergillus Linigatus - (linoleate diol synthase) Homo sapiens (prostaglandin-endoperoxide synthase 1) Homo sapiens (prostaglandin-endoperoxide synthase 2)	CGTCTGATACCCTGAAAAGAATATTTCGAGCGCTGTTCCATGTCATTGCCGTTGCGAAGTCGGCGTCGAGAATGACAGGGTTTGATCATGTCCGGGGAATGACAGGGTTTGATCATGTTCCGGAATTGCGGCGTCGACAGGAATGACAGGGCTTGATCATGTTCCGGAATTGGCGGCGTGA CAAACABGCGATGGACCTTTGTCCAGGCAGCAAGTGAGACAGGGAGGAGGAGGGGCTTGCCAGGGACTTGGCGGCGTTGATGAGGGGGGTTGGAGGTGGAGGTGGAGGGGGGGG
Paracoccidioides brasiliensis (Pb18) (linoleate diol synthase) Gaeumannomyces graminis - (linoleate diol synthase) Aspergillus Limigatus - (linoleate diol synthase) Homo sapiens (prostaglandin-endoperoxide synthase 1) Homo sapiens (prostaglandin-endoperoxide synthase 2)	TGGAAAGGTCGGAAATAGTATTTTTCTCAAATCAGCCAACTCATTCACTCTTCACTGCGTCCGCTGCCCACCCCGAACTGGCAACGGCAGTTATATCGATGACACCCCCACCCGAA AGGCGTCAACGACGACCAGCAGTTTTTCTCCGAAAAATGATCCAGCTCCTCGCGAAGCTGCCGCCCGC
Paracoccidioides brasiliensis (Pb18) (linoleate diol synthase) Gaeumannomyces graminis - (linoleate diol synthase) Aspergillus Limigatus - (linoleate diol synthase) Homo sapiens (prostaglandin-endoperoxide synthase 1) Homo sapiens (prostaglandin-endoperoxide synthase 2)	CCCGGTTTANTAGCCGATTTAAAGAGCGTCGGCATTAAGGATATTGATACGCTGGTTGAAGTTGTT-CGGAATGCTGCAACGGGAAAACCAGTCAATGACAAAGATTATATCCTAGAAAG TCTTGACCACCCCCCGTGTGGCCTCGCTGGGCAAAGGGTTCAGCTTCCGAAGAGCGGATGGAT
Paracoccidioides brasiliensis (Pb18) (linoleate diol synthase) Gaeumannomyces graminis - (linoleate diol synthase) Aspergillus tumigatus - (linoleate diol synthase) Homo sapiens (prostaglandin-endoperoxide synthase 1) Homo sapiens (prostaglandin-endoperoxide synthase 2)	АВ ТВАТАСАЯСТСКИТ ТТАСССТССАВАТСССССААТВСКОВАТАВАТТАААССАТКСТТСТЯТСТТТКСТСТКБААСВАТСТСААGCATCCGCCATTGTCATTGTAT-CTTK АВССВСТССЯТИТСАВААССССААСССТСССВАЕСССВССАССАТСТТСКАСАСВСТВАТВСВСКОВАТССВССААЛСТТСАВСССТАТССВААСААААТTTCCASCATGCT АВСССААЛАСТВТВСАВТСТССВААСССТСССВАЕСССВССАССАТСТТСКАСАСВСТВАТВСВСКОВАТССВССААЛСТТСАВСССТААТССВААСААААТTTCCASCATG ССАТВСВААЛССААЛВСВАТСССААЛСССТАССВАТСССБАЛОТТСТТСКАСАСВСТТСТВСКОВАВСАВСТИСАЛСССААТАСССААТАТТСТАТСТВАТТТСТ ССАТВСВАЛССААЛВССВАТСССААЛВСССТАССТВАТСССВАТССТВСТТСТВАВСВСАВСТИСАЛСССААТВАССТВАСССААССТСССТВСТСТАЛВТТСАТСССААЛВСТВАСССААСТТСТВССТВСТТАСТВСТСТАВСАВСАВСТИСАЛСССААЛССТВАСССААССТВСТСТВСТВСТТТТТ ССТТВСВСТВСААЛВСВАТААЛВСАВТСССААЛВСССВАТССТВСТВСАВСАВСАВСТИСАЛССВАТССВАССВАССССАТССТВСТТСТАТВСТВССААЛВСТВАСТВССТВАСТВАСТВАСТВАСТВАСТВАСТВАСССААЛВСТВАСТВАСТВСССААСТВАТСТВССТВСТВСАВСААСАТТВССТВСТВСАВСАВС
Paracoccidioides brasiliensis (Pb18) (linoleate diol synthase) Gaeumannomyces graminis - (linoleate diol synthase) Aspergillus Limigatus - (linoleate diol synthase) Homo sapiens (prostaglandin-endoperoxide synthase 1) Homo sapiens (prostaglandin-endoperoxide synthase 2)	GTGACCAGTAT-GTTTATAGACAGGCAGATGGTTGGCATAATGACAACACCCGCTCCCTTACTTCCTCGTACCTTGATCTTTCCCCTCTATAGGTAGTAATCAGGAAGAGCAGAATGG GGTGCCATCATCATCCCACGACACTTTTCAAAGGTGAGCATGACGGATCCAGCATCAACTCAAC
Paracoccidioides brasiliensis (Pb18) (linoleate diol synthase) Geeumannomyces graminis - (linoleate diol synthase) Aspergillus dimgatus - (linoleate diol synthase) Homo sapiens (prostaglandin-endoperoxide synthase 1) Homo sapiens (prostaglandin-endoperoxide synthase 2)	АБТССБСАССТТСААББЕСБББААБСТАААБССАБАСТБСТТТТСБААСААБGEAATTCTABGATTCCCTCCAGEGTSTCEGECGTGCTCCTTAT-AATGTTTAACCGGTTCCATA АБТСАББАССББСААББАСББСХБСТССАБССАБАСТБСТТТТСБАСССБАБGEABTTATAGGCTTCCGCCTGGCGTTGCGGTGCTTCTБАТ-TATGTTCAACCGCTTCCACA САТСАББАСТТСААББАСБТААБСТСААБССАБАСТБТТТСТААСААААCGABTTATAGGCTTCCTCCGGGCGTTGGGGGGTTTCTБАТ-TATGTTCAACCG АСТБСБЭСТТТТСААББААЭТТСААБТССАБАТСТБАТББААЗАЛБТАТСССТССССАБТБАААБАТССТТСССБССТБЭСGTTGGCGTAGT TTAT-CATGTTCAATCG АСТБСБЭСТТТТСААББААЭТСТААБТССАБАТССБАБТБААТБААТБАССССТСЭСТБАБААБТААТССТССССССАББАСТАБТССАТСССССАВАБССАБА АСТБСБЭСТТТТСААББААЭАТТАБАААТАТСАБАТБААТБААТБАССАБАТБАТССТССССАББТСАААБАТАСТТСАБССАБАСССССССС
Paracoccidioides brasiliensis (Pb18) (linoleate diol synthase) Gaeumannomyces graminis (linoleate diol synthase) Aspergillus Linigatus - (linoleate diol synthase) Homo sapiens (prostaglandin-endoperoxide synthase 1) Homo sapiens (prostaglandin-endoperoxide synthase 2)	ACTATGTEGTTGAGAATCTEGETGGTEGAT-CAACEAAGAEGGTEGTTTCACEAAATEAGATGAGTTTAATGETAAGGGTTACTECAAATAE-GAEAATGAECTTTTCCAAAECGGGEGGETTA AETATGTGGTGAEGGAGCTEGEAAAGAT-CAAEGAAGGTGGEGGTTTTTAAAGEGGECAAETAEGGECAGAEATGEGGAEGAEGGEGGGGGGETGA AETAEGTGTGAAAGGTTTGEAATGAT-CAAEGAAGGAGGEGGGTTTTAAAAGEGGECAAEATGEGCAAEATGEGAAEATGEGGAEGTAE-GAEAAEAGECTTCTTCCAAAE TGEGTGTGGGECAGGAGGTTTTTGEATETTTGEGTETTTCCTAGECAGGATGAECGAECTAEGTGAGAATAT-GAEAAEAGETAECTACTTTTCCAAAECGGECGGETTG TGEGTGTGGGGCAGGAGGTETTTGGGTETTTTCCTGGETTTTCCAAGEGGECAGETTGGGAAEACTAECGGAEGAECGTAGGGAAETGEGCAAEAGAEGTAECGAECTAG TGEGTGTGGGGCAGGAGGTETTTGGGTETTTTCCTGGGTETGGTGATGATGTATGCGAECTAEGTGAAEAGAGTATGCGAAGAGTTGCTTTAAAEAGGAGCGGETGATGAG
Paracoccidioides brasiliensis (Pb18) (linoleate diol synthase) Gaeumannomyces graminis - (linoleate diol synthase) Aspergillus Linoigatus - (linoleate diol synthase) Homo sapiens (prostaglandin-endoperoxide synthase 1) Homo sapiens (prostaglandin-endoperoxide synthase 2)	ТСАСА ТБСББССТ - АТАСАТАААНТ ТААЛАНТ ТТААЛААСТИСБТБСБААСТАТТС ТСААСАТСААСАБСАССААЛАБТВАТТББАБТС ТТБАТССССБТТТАБААТСТАСАААТБӨТСТБ ТТТ ТБСБББСТ - СТАГАТСААСАТТБ ТТТТБББСБАСТАТТЕТ ТБАСА - ТБСББССТ - СТАСБТСААСАТСАТТС ТБААББАТТАТТТСССАСС САЯСТТТГССАЯЛСААССАБССТТААТСТСТАТАББББАВАССАТСАТАТААТТБ ТСАТСБАЯБАЯТАСБТБСАБСАБСТБАЯТББСТАТТТССТБСАВСТБАААТТТБАСССАЯЛБСТБСТБТТСББ САЯСТТГССАЯЛСААССАБССТААТССТТААББСАЯЛСАТСАТАТААТТАБТБ САЯСТТГССАЯЛСААССАБССТААТССТБАББСАЯЛСАТТААТБАТТБ ТБ
Paracoccidoides brasiliensis (Pb18) (linoleate diol synthase) Gaeumannomyces graminis - (linoleate diol synthase) Aspergillus fumigatus - (linoleate diol synthase) Homo sapiens (prostaglandin-endoperoxide synthase 1) Homo sapiens (prostaglandin-endoperoxide synthase 2)	GGTACAGAGASTTAACGAGGCAAGCGGCAACCAGGTATCTGCGGAATTTAACTTGATATATCGCTGGCATTCATGTATTTCAGAGCGCGACGACAAATGGATCCAAGGTGTTTTAAAAGAGCTATT TGTCCAGTTCCAATACCGCAACCGCATTGCCATGGAGTTCAACCATCTCTACCACTGGCACCCCCTCATGCCTGACTCCTTCAAGGTGGGCTCCCAGGAGTACAGCTACGAGCAGTTCTTGTTCA
Paracoccidioides brasiliensis (Pb18) (linoleate diol synthase) Gaeumannomyces graminis - (linoleate diol synthase) Aspergillus fumigatus - (linoleate diol synthase) Homo sapiers (prostaglandin-endoperoxide synthase 1) Homo sapiers (prostaglandin-endoperoxide synthase 2)	TGGCGATAGTAAGGACCTGAGGAATATCGCTTGGTCTGAATACTTGCGGATTCTTGAAAAATGGGAGGCGGGACTTTCTGAGGATCCTCCGAAGCGACCTTTCGCAAAGTTGGAACGTGAGCCCA ACACCTCCATGTTGGTGGACTATGGGGTTGAGGCCCTGGTGGATGCCTTCTCTCGCCAGATTGCTGGCCGGATCGGTGGGGGCAGGAACATGGACCACCACATCCTGCATGTGGCTGTGGATGTC

Figura 17: Alinhamento parcial das sequências proteicas para LDS do *Paracoccidioides brasiliensis*, com as sequências dos fungos *Gaeumannomyces graminis* e *Asperguillus fumigatus* e com as sequências das prostaglandina H₂ sintase 1 e 2 (COX-1 e COX-2) humanas. Os aminoácidos idênticos estão marcados com asterisco. A análise parcial e múltipla do alinhamento foi realizada utilizando o programa *ClustaW*, *Mega 5.04*.



Figura 18: Análise filogenética das sequências protéicas para LDS do *Paracoccidioides brasiliensis*, com as sequências dos fungos *Gaeumannomyces graminis* e *Asperguillus fumigatus* e com as sequências das prostaglandina H_2 sintase 1 e 2 (COX-1 e COX-2) humanas. A árvore de gene foi construída utilizando o método Maximun Likelihood, com o programa MEGA 5.04.

Para confirmar a identidade proteica da enzima LDS do *P. brasiliensis* com a ciclooxigenase humana, foi realizada análise adicional a partir do alinhamento das sequências múltiplas utilizando o programa Pfam. As informações contidas na figura 19 mostram que ambas as enzimas pertencem à família das peroxidases que são um grupo de enzimas oxirredutases responsável por oxidar substratos orgânicos, se alinham a partir do nucleotídeo 117 até o 508 e apresentam sítios ativos idênticos localizados nos domínios 352 e 180 e o E-value de 1.5e-88 que representa a confiabilidade da homologia funcional e estrutural com a prostaglandina H₂ sintase. O valor E-value corresponde à probabilidade de se obter, com outra sequência aleatória de mesmo tamanho e composição de letras, outro alinhamento com *score* igual ou superior. Desta forma, quanto mais próximo de zero for o E-value, mais confiável será o resultado.



Figura 19: Análise da identidade funcional das sequências proteicas da enzima LDS *Paracoccidioides brasiliensis*, com as prostaglandina H_2 sintase 1 e 2 (COX-1 e COX-2) humanas, utilizando o programa Pfam.

Com relação à pesquisa por genes que codificam a enzima LO ou enzima funcionalmente homóloga no genoma do *P. brasiliensis*, da mesma forma que realizado para a enzima COX, foram depositadas as informações no banco de dados genômico *Broad Institute* e com o auxílio da ferramenta BLAST, no entanto não foram encontradas sequencias semelhantes à LO no genoma do fungo.

Além disso, a análise de alinhamento das sequências da LDS no genoma do *P*. *brasiliensis* com a LO de mamíferos não revelou nenhuma semelhança estrutural entre as sequências de aminoácidos.

4.5. Expressão de mRNA para a enzima LDS

Uma vez que detectamos a presença de genes para a enzima LDS no *P. brasiliensis*, tivemos interesse em avaliar se ocorre a expressão de mRNA para esta enzima, em nossas

condições experimentais. Para isso, as culturas de células leveduriformes das cepas Pb18 e Pb265 do fungo foram tratadas ou não com AA 1000 µM por 0, 4, 8 e 12 horas de incubação e avaliadas quando a expressão da enzima LDS, utilizando dois primers distintos, que foram desenhados utilizando o software IDTSciTools (<u>http://www.idtdna.com</u>) com informações de duas regiões distintas da sequência proteica da enzima.

Inicialmente avaliamos se as cepas Pb18 e Pb265 são capazes de expressar mRNA para a região LDS-1 ou LDS-2 após incubação somente com RPMI, nos diferentes períodos.

Observamos que a cepa Pb18 expressa substanciais concentrações de mRNA para a região LDS-1 da enzima já no período de 0 hora, que aumentam de forma significativa após 4, 8 e 12 horas de incubação. O mesmo perfil de resposta foi detectado para a Pb265, na qual também observamos expressão da enzima já no período de 0 hora. No entanto, um aumento significativo dessa expressão foi detectado somente após os períodos de 8 e 12 horas de incubação (figura 20A). Observamos ainda, que a Pb265 expressa concentrações significativamente menores de mRNA para a região LDS-1, quando comparadas com a cepa Pb18, em todos os períodos de incubação.

Na figura 20B são mostrados os resultados da expressão de mRNA da região LDS-2 da enzima pelas cepas Pb18 e Pb265. Apesar de as concentrações serem menores, do que as expressas pela LDS1 detectamos um perfil de resposta semelhante, isto é, já no período de 0 hora, foi possível observar a expressão de mRNA para a enzima, pelas duas cepas. Essa expressão aumentou significativamente nos períodos de 4,8 e 12 horas para a PB18 e nos de 8 e 12 para a Pb265. Novamente, a cepa Pb265 expressou menores concentrações de mRNA para LDS-2 quando comparada à Pb18 em todos os períodos de incubação.

Após a confirmação da expressão das regiões LDS-1 e LDS-2 da enzima nas culturas de *P. brasiliensis* incubadas somente com RPMI, avaliamos se a incubação com AA 1000 μ M seria capaz de alterar as concentrações de mRNA para esta enzima. A figura 21A mostra que a incubação com AA aumentou significativamente a expressão de mRNA da LDS-1 pela Pb18 em todos os períodos de incubação. Nas culturas da cepa Pb265, o tratamento com AA aumentou significativamente a esta região, somente após 4 horas de incubação. Após 8 e 12 horas a expressão se manteve nas mesmas concentrações antes e após o tratamento com AA (figura 21B).

Para a região LDS-2 da enzima o tratamento com AA aumentou significativamente a concentração de mRNA em todos os períodos de incubação nas culturas da cepa Pb18 (figura 22A), bem como da cepa Pb265 (figura 22B).







Figura 21: Concentração relativa de mRNA para LDS-1 expressa por células leveduriformes das cepas Pb18 (A) e Pb265 (B) incubadas somente com RPMI ou com AA 1000 μ M por 4, 8 e 12 horas. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão obtidos a partir de 3 experimentos distintos. Análise estatística: Teste de Tukey. *p<0.05 x Sem AA.



Figura 22: Concentração relativa de mRNA para LDS-2 expressa por células leveduriformes das cepas Pb18 (A) e Pb265 (B) do *P. brasiliensis* incubadas somente com RPMI ou com AA 1000 μ M por 4, 8 e 12 horas. Os resultados são expressos em média ± erro padrão obtidos a partir de 3 experimentos distintos. Análise estatística: Teste de Tukey. * p<0.05 x Sem AA.

Discussão

5. Discussão

O presente projeto foi desenvolvido com o objetivo de confirmar a produção e principalmente caracterizar molecularmente os diferentes eicosanóides resultantes do metabolismo do AA, ou de outros ácidos graxos, pelo P. brasiliensis, bem como as vias enzimáticas utilizadas para esta produção. Essa proposta se fez necessária, uma vez que estudos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório^{22, 23, 28}, demonstraram que o P. brasiliensis é capaz de produzir PGs e LTs utilizando fontes endógenas ou exógenas de AA e que essa produção está diretamente relacionada com a sobrevivência do fungo. No entanto, nesses trabalhos, para a detecção da produção destes eicosanóides nos sobrenadantes das culturas de células leveduriformes do P. brasiliensis, foram utilizados kits de ELISA, que podem apresentar reações cruzadas com outros metabólitos. Por exemplo, os kits comerciais para PGE₂ podem apresentar reatividade entre PGs da classe E, as quais incluem PGE₁, PGE₂ e PGE₃. Porém, esse kit não reconhece outros prostanóides como PGA, PGB, PGD, PGF ou TBXs. Os kits comerciais para LTB₄ podem apresentar reações cruzadas para 5-HETE, LTC₄, LTD₄ e LTE₄. Assim, a abordagem experimental utilizada nos trabalhos anteriores, não nos permitiu afirmar se o fungo é capaz de produzir PGE₂ e LTB₄ autênticos, com estrutura molecular idêntica aos produzidos pelas células de mamíferos. Desta forma, para a realização do presente estudo utilizamos técnicas experimentais mais confiáveis de detecção rápida e sensível como a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e principalmente a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS-MS).

Nossos resultados utilizando a técnica de HPLC mostraram que as cepas Pb18 e Pb265 do fungo produzem PGE₂ e que essa produção aumenta após a incubação com AA (após 4 horas para a cepa Pb18 e 8 horas para a cepa Pb265). A Pb18 também produz LTB₄ cujas concentrações, de forma semelhante ao observado para a PGE₂, aumentam após a incubação com AA 4 horas. A cepa Pb265 produz LTB₄ cujas concentrações, no entanto não aumentaram de forma significativa após a incubação com AA nos períodos 4, 8 e 12 horas.

Os resultados apresentados confirmaram os nossos achados anteriores, mostrando que o *P. brasiliensis* produz PGE₂ e LTB₄, e estão de acordo com os dados da literatura para outros fungos como *Aspegilus fumigattus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans, Fusarium dimerum* e *Penicilium notarium* que produzem PGE₂ e LTB₄ bem como outras classes de PGs e LTs^{162, 164, 165, 232}. A produção de diferentes metabólitos do AA tem sido ainda detectada para diversas leveduras da família *Lipomycetaceae* (*Dipodascopsis*, *Lipomyces*, *Myxozyma*, **e** *Zygozyma*)^{98, 118, 219} bem como em Saccharomyces cerevisiae¹¹⁸.

Outra confirmação refere-se ao aumento da produção desses eicosanóides em presença de AA exógeno, como ocorre também com outros fungos¹⁶⁵. Este processo torna-se extremamente importante no sentido de que o fungo, durante uma infecção "*in vivo*", além de seu próprio ácido araquidônico pode usar fontes do hospedeiro, aumentando sobremaneira a sua capacidade de produção. Outro aspecto que merece ser discutido é se o substrato endógeno utilizado pelo fungo para a produção de PGs e LTs é realmente o AA. Apesar da detecção de AA em algumas leveduras¹⁷⁵, considera-se de uma forma geral que ela é esporádica. Por exemplo, esse ácido não foi detectado em *Cryptococcus neoformans* e *Cândida albicans*, os principais fungos estudados em relação à produção de eicosanóides^{84, 142}. É possível, no entanto, que as condições de crescimento e ou metodológicas para extração e identificação desses ácidos não tenham sido adequadas para a detecção de ácidos graxos de cadeia longa como é o caso do AA. Nesse sentido, os estudos devem ser aprofundados para a identificação dos reais substratos usados por esses fungos, incluindo o *P. brasiliensis*, para a síntese de eicosanóides.

Uma vez que detectamos a produção de prostaglandinas e leucotrienos, indicados como sendo PGE₂ e LTB₄ pela técnica de HPLC, buscamos realizar ensaios que pudessem definitivamente caracterizar os mesmos como PGE₂ e LTB₄ autênticos. Para isso, utilizamos a técnica de LC/MS-MS, que permite a análise específica da estrutura molecular dos produtos avaliados. Nossos resultados mostraram que a PGE₂ e os LTB₄ produzidos nos sobrenadantes das culturas de células leveduriformes de P. brasiliensis apresentam massa e tempo de retenção idênticos aos apresentados pelos padrões comerciais específicos para PGE₂ e LTB₄. Além disso, através da análise quantitativa destes resultados foi possível avaliar as concentrações exatas destes compostos produzidos em nossas culturas, que foram somente detectados, após a incubação com AA, tanto nas culturas da cepa Pb18 como da cepa Pb265. Nossos resultados mostram ainda que a produção de PGE₂ e LTB₄ não foi significativamente diferente entre as duas cepas analisadas, confirmando nossos resultados e mostrando que as diferençãs de virulência entre as cepas de P. brasiliensis não estão relacionadas com a produção de diferentes concentrações de PGE_2 e $LTB_4^{22, 23, 28}$. São raros os estudos que mostram a caracterização molecular de eicosanóides produzidos por fungos. Erb-Downward & Noverr⁷² demonstraram por LC/MS-MS que Candida albicans produz PGE₂ autêntica, somente em culturas incubadas com AA. Segundo os autores a PGE₂ produzida nestas culturas não é um produto da auto-oxidação do AA, 8-isso-PGE₂, uma vez que este produto apresenta tempo de retenção diferente da PGE₂. No presente estudo, também podemos afirmar que a PGE₂ produzida não é resultante da auto-oxidação do AA, já que além de utilizarmos um padrão específico para PGE₂ para identificar a massa e o tempo de retenção exatos, tivemos o cuidado de avaliar uma amostra contendo somente AA, que não resultou em pico de produção aparente (dados não mostrados). Erb-Downward & Huffnagle⁷¹, observaram que *Cryptococcus neoformans* produzem PGE₂ com massa, características cromatográficas e padrão de fragmentação idênticos à PGE₂ de mamíferos, através da técnica de LC/MS-MS. Essa identificação somente foi possível após o tratamento das culturas com AA. Em relação à identificação de LTB₄ por fungos, não foram encontrados relatos na literatura que mostrem a caracterização do mesmo, como autêntico. Assim, os nossos resultados demonstraram de forma inédita, a autenticidade do LTB₄ produzido em cultura de células fúngicas.

Além de demonstrar a produção de PGE₂ e LTB₄ autênticos pelo P. brasiliensis, a LC/MS-MS nos permitiu a avaliar a produção de outras classes de PGs e LTs por este fungo. A análise qualitativa permitiu detectar a produção de PGF_{2a}, PGD₂, TBX e 5-HETE autênticos nos sobrenadantes das culturas de células leveduriformes, uma vez que os compostos produzidos apresentaram massa e tempo de retenção idênticos aos respectivos padrões comerciais analisados. Noverr et al¹⁶⁴ demonstraram a produção de PGD₂, PGF_{2a}, PGE₂, TBX e 5-HETE nos sobrenadantes de culturas de Cryptococcus neoformans suplementadas com AA, utilizando a técnica de HPLC. Em outro estudo, Noverr et al¹⁶⁵, demonstraram por ELISA que os fungos Aspergillus fumigatus, Blastomyces dermatitidis, Fusarium dimerum, Histoplasma capsulatum, Penicillium notatum, entre outros, produzem diferentes classes de PGs (PGE₂, PGD₂, PGF_{2a}) e LTs (LTB₄ e Cis-LTs). Kupfahl et al¹²¹, identificaram a produção de PGE₂, 6-keto-PGF_{1α} (produto estável da prostaciclina PGI₂), $PGF_{2\alpha}$, os isoprostanos 15(S)-8-iso- $PGF_{2\alpha}$ and 15(S)-8-iso- PGE_2 , e tromboxana B_2 na culturas de Aspergillus fumigatus tratadas com AA (10µM) através da técnica de cromatografia gasosa de massas (GC/MS-MS). Segundos os autores, esses eicosanóides produzidos nas culturas de Aspergillus fumigatus são idênticos àqueles produzidos por mamíferos.

A produção pelo *P. brasiliensis* de outras classes de eicosanóides merece atenção, uma vez que estes podem apresentar efeitos diversos e muitas vezes contrastes, sobre a biologia do fungo. Além disso, podem modulara resposta imune do hospedeiro de modo diferente da PGE₂ e do LTB₄. Assim, devemos considerar que "in vivo" o resultado final pode ser uma somatória dos efeitos de todos esses eicosanóides produzidos pelo fungo, em combinação com aqueles produzidos pelo próprio hospedeiro.

Outra questão importante que tentamos responder é se a via enzimática para a produção destes eicosanóides também envolve a COX e 5-LO como ocorre nos mamíferos ou se há a participação de enzimas funcionalmente homólogas. Nos estudos anteriormente desenvolvidos em nosso laboratório, que mostraram a produção de prostaglandinas e leucotrienos pelo P. brasiliensis através da técnica de ELISA^{22, 23, 28}, investigamos a participação das vias enzimáticas de COX e/ou 5-LO utilizando inibidores que atuam nestas diferentes vias. Para a inibição da COX, as culturas foram incubadas com indometacina (INDO), um antiinflamatório não esteróide, potente inibidor não seletivo da COX, isto é, atua tanto na via da COX-1 como da COX-2. Para a inibição da 5-LO usamos o MK886, um inibidor da proteína ativadora da 5-lipoxigenase (FLAP), e o NDGA um inibidor não seletivo de 5-LO, que pode atuar tanto na inibição da produção de LTs como na inibição de Cisteinil-LTs. No entanto, esta abordagem experimental não nos garantiu de forma definitiva se o fungo utiliza estas vias para a produção de PGs e LTs, uma vez que se discute que a diminuição na produção desses eicosanóides, na presença desses inibidores, poderia ocorrer devido a um efeito tóxico direto dos mesmos e não em função de suas ações inibitórias específicas sobre as vias enzimáticas de produção desses mediadores. Vários outros estudos têm investigado de forma insistente a presença da COX, ou enzima funcionalmente homóloga em diferentes fungos. Noverr et al¹⁶⁵, demonstraram a presença da enzima COX para a produção de PGE₂ pelos fungos Candida albicans e Cryptococcus neoformans, identificada em ensaios utilizando Western-blotting. No entanto, em estudo posterior Erb-Downward & Noverr⁷², observaram que a produção de PGE₂ por *Candida albicans* não foi inibida por inibidores específicos da COX-2 e que o genoma da Candida albicans não possui enzima homóloga à da COX, indicando a não participação dessa via na produção de PGE₂ detectada. Os autores discutem que a detecção de enzimas envolvidas na síntese da PG por fungos é um processo bastante difícil, mas que enzimas estruturalmente distintas às dos mamíferos, mas contendo algumas características funcionais da COX e também da 5-LO são expressas pela Candida albicans e provavelmente por outros fungos. Assim, identificaram que uma enzima homóloga a enzima " $\triangle 9$ fatty acid stearyl-coenzyme A desaturase", codificada pelo gene denominado Ole2 assim como uma enzima homóloga da enzima codificada pelo gene Fet3 participam da síntese de PGs pela Candida albicans, uma vez que amostras mutantes desses genes liberam concentrações reduzidas do mediador. Os genes Ole1 e Ole2 já haviam sido identificados na Candida albicans por Krishnamurthy et al¹²⁰, como sendo genes homólogos do gene denominado Ole1, identificado em Saccharomyces cerevisiae e que codifica uma enzima com atividade de desaturase de ácido graxo, a "△9 fatty acid stearyl-coenzyme A

desaturase", importante para a síntese de ácido oléico e envolvida no crescimento e morfogênese da *Candida albicans*. Em relação ao *Cryptococcus neoformans*, Erb-Downward & Huffnagle⁷¹ demonstraram que a incubação das culturas com aspirina ou INDO não inibiu a produção de PGE₂, mostrando que de forma semelhante à *Candida albicans*, esse fungo produz eicosanóides autênticos, mas independentes da enzima COX.

Estudo na literatura mostrou que a enzima Linoleate diol sintase, uma hemeproteína férrica, que catalisa a dioxigenação de ácido linoleico, foi primeiramente demonstrada no fungo Gaeumannomyces graminis e apresenta similaridades catalíticas e estruturais com as enzimas prostaglandina H_2 sintase 1 e 2 (COX-1 e COX-2)⁹⁹. Os estudos desenvolvidos para Aspegilus nidulans mostram que os genes ppoA, ppoB e ppoC codificam a enzima 7,8 linoleato diol sintase, e que esta enzima apresenta 40% de aminoácidos semelhantes às enzimas da família da mieloperoxidase²³². Segundo estes autores, os genes ppo descritos apresentam importância biológica no processo de esporulação deste fungo. Foi descrito ainda, pelo mesmo grupo de autores, que a deleção destes genes afetou a proporção de esporos assexuados (conídios) para os esporos sexuais (ascoporos), a biossíntese dis ácidos graxos polinsaturados e a produção de micotoxinas em Aspergillus nidulans^{229, 231, 233}. Além do impacto sobre os processos de esporulação, a deleção desses genes também provocou alterações da virulência deste fungo²³⁰. A supressão de genes ppoB aumentou a formação de conídios, enquanto a deleção de ppoC diminui a formação de conídios^{230, 233}. A baixa expressão dos genes ppo através da tecnologia de RNA de interferência (iRNA) resultou em cepas hipervirulentas, e a supressão de genes ppoC resultou na hiperprodução de conídios e aumento da virulência em modelo experimental para aspergilose em ratos²³². Adicionalmente, esses genes apresentam sequências conservadas que são homólogas às encontradas no gene da COX de mamíferos. A enzima codificada por esses genes é utilizada pelo Aspergillus nidulans e Aspergillus fumigatus para a realização do metabolismo dos ácidos oléico e linoléico que resulta na produção de eicosanóides, principalmente PGs²³².

Diante do exposto, no presente estudo buscamos por sequências homólogas às apresentadas por *Aspegilus fumigatus* e *Aspegilus nidulans* no genoma do *P. brasiliensis* no banco de dados *Broad Institute* (http://www.broadinstitute.org) com o auxílio da ferramenta BLAST. Detectamos a presença da sequência gênica para a enzima *Linoleate diol sintase* (LDS), e confirmamos que esta sequência apresenta homologia estrutural e funcional com a COX-1 e COX-2 de mamíferos que foram identificadas com o auxílio da análise de alinhamento de sequências pelos programas MEGA 5.04 e Pfam. No entanto, embora a enzima LDS encontrada em nossos resultados apresente homologia estrutural e funcional com

a COX de mamíferos, estudos mais aprofundados sobre a função desta enzima neste fungo, devem ser conduzidos.

Com relação à presença de genes para a enzima 5-LO ou enzima funcionalmente homóloga, efetuamos análises exaustivas no banco de dados *Broad Institute*, bem como em outros bancos de dados e não fomos capazes de identificar qualquer sequência que apresente homologia com a 5-LO de mamíferos.

Alguns autores descreveram que os fungos *Aspergillus terreus* e *Lasiodiplodia theobromae* não apresentam genes para a enzima 5-LO em seus genomas, mas apresentam a enzima 9R-dioxigenase (9R-DOX) que apresenta atividade de dioxigenase em *Aspergillus* e de lipoxigenase no *Lasiodiplodia theobromae*¹⁰⁶ sugerindo que a mesma enzima pode ter homologia funcional com a COX e a 5-LO. Outros dados reforçam a ideia.

Como citado acima, a produção de micotoxinas e a esporulação em *Aspegilus nidulans* são regulados pela produção de oxilipinas endógenas. Essas oxilipinas são sintetizadas pela ação da enzima dioxigenase codificada pelos genes ppoA, ppoB e ppoC. Oxilipinas estruturalmente semelhantes foram encontradas em sementes de plantas, e são produzidas pela ação da enzima lipoxigenase. O tratamento das culturas de *Aspegilus nidulans* com as oxilipinas derivadas destas sementes resultou na alteração da esporulação e produção de micotoxinas. Além disso, foram introduzidos genes que codificam a enzima 5-LO nestas sementes (ZmLOX3) em *Aspegilus nidulans* resultando no aumento da produção de conídios³².

A oxidação do ácido linoléico por *Aspegilus terreus* foi estudada através da análise por LC/MS-MS. Foi identificado o ácido 9(R)-hidroperoxi-12(Z)-octadecadienóico (9R-HPODE). No entanto, no genoma de *Aspegilus terreus* não foram encontrados genes para a enzima 5-LO, mas sim para 5,8-Linoleate Diol Sintase que apresenta função homóloga à 5-LO¹⁰⁸.

Estudos mostram que o ácido jasmônico (AJ), uma molécula sinalizadora importante para o desenvolvimento de plantas é formado a partir de fontes de ácidos graxos polinsaturados como o ácido linoléico, pela ação de enzima 13(S)-lipoxigenase^{86, 196, 239, 240}. O AJ apresenta atividades biológicas importantes em plantas como defesa e adaptação ao estresse, além de inibir a produção de aflatoxinas, a germinação em fungos⁹⁰. A produção deste ácido foi essencialmente descrita em plantas, no entanto, alguns fungos também podem produzir AJ com idêntica estrutura molecular ao produzido por plantas. O patógeno de plantas *Lasiodiplodia theobromae* secreta o próprio ácido jasmônico e também utiliza fontes exógenas. No entanto, a via enzimática para a produção de AJ em fungos é desconhecida¹⁰⁷.
Estes dados encontrados na literatura mostram que assim como o *P. brasiliensis*, outros fungos não apresentam genes para a enzima 5-LO em seu genoma. Nestes fungos fica claro que a dioxigenase LDS pode exercer o papel da enzima 5-LO de mamíferos. Assim, no presente estudo, embora não tenhamos encontrado semelhanças entre a enzima 5-LO de mamíferos com a LDS do *P. brasiliensis*, após a análise de alinhamento de sequências, podemos considerar inicialmente que a enzima LDS encontrada no genoma do fungo pode exercer a função de oxidação de ácidos graxos polinsaturados para a produção tanto de PGs como de LTs. No entanto, estudos mais aprofundados avaliando a importância da expressão desta enzima para a produção de diferentes eicosanóides e para o desenvolvimento do *P. brasiliensis* devem ser conduzidos.

Conclusão

6- Conclusão

Nossos resultados mostram o *P. brasiliensis* produz PGs e LTs idênticos aos sintetizados por mamíferos, através da ação da dioxigenase linoleato diol sintase, um via de síntese diferente da utilizada por células de mamíferos.

Referências Bibliográficas

7- Referências Bibliográficas

- Acorci MJ, Dias-Melicio LA, Golim MA, Bordon-Graciani AP, Peraçoli MT, Soares AM. Inhibition of human neutrophil apoptosis by *Paracoccidioides brasiliensis*: role of interleukin-8. Scand J Immunol. 2009; 69: 73-9.
- Acorci-Valério MJ, Bordon-Graciani AP, Dias-Melicio LA, de Assis Golim M, Nakaira-Takahagi E, de Campos Soares AM. Role of TLR2 and TLR4 in human neutrophil functions against *Paracoccidioides brasiliensis*. Scand J Immunol. 2010; 71: 99-108.
- Adams LB, Gillis 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: 1152-7.
- Aiello, RJ, Bourassa PA, Lindsey S, Weng W, Freeman A, Showell HJ. Leukotriene B4 receptor antagonism reduces monocytic foam cells in mice. Arteriosclerosis, Trombosis, and vascular Biology. 2002; 22: 443-449.
- Akarasereenont P, Bakhle YS, Thiemermann C, Vane JR. Cytokine-mediated induction of cyclo-oxygenase-2 by activation of tyrosine kinase in bovine endothelial cells stimulated by bacterial lipopolysaccharide. Br J Pharmacol. 1995a; 115: 401-8.
- Akarasereenont P, Hide E, Ney P, Thiemermann C, Vane JR. The induction of cyclooxygenase-2 elicited by endotoxin in endothelial cells and macrophages is inhibited by prostaglandin E1 and 13,14-dihydro prostaglandin E1. Agents Actions Suppl. 1995b; 45: 59-64.
- Almeida, S R, Lopes, J D. The low efficiency of dendritic cells and macrophages from mice susceptible to *Paracoccidioides brasiliensis* in inducing a Th1 response. Braz J Med Biol Res. 2001; 34: 529-37.
- Aronoff DM, Bergin IL, Lewis C, Goel D, O'Brien E, Peters-Golden M, Mancuso P. Eprostanoid 2 receptor signaling suppresses lung innate immunity against *Streptococcus pneumoniae*. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2012; 98: 23-30.

- Aronoff DM, Canetti C, Peters-Golden M. Prostaglandin E₂ inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. J Immunol. 2004; 173: 559-65.
- Baida H, Biselli, P J, Juvenale M, Del Negro G M, Mendes-Gianinni M J, Duarte A J, Benard G. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. Microbes Infect. 1999; 4: 273-8.
- Bailie MB, Standiford TJ, Laichalk LL, Coffey MJ, Strieter R, Peters-Golden M. Leukotriene-deficient mice manifest enhanced lethality from *Klebsiella pneumonie* in association with decreased alveolar macrophage phagocytic and bactericidal activities. J Immunol. 1996; 157: 5221-4.
- Ballinger MN, Aronoff DM, McMillan TR, Cooke KR, Olkiewicz K, Toews GB, Peters-Golden M, Moore BB. Critical role of prostaglandin E₂ overproduction in impaired pulmonary host response following bone marrow transplantation. J Immunol. 2006; 177: 5499-508.
- Banerjee, DK, Dhodapkar MV, Matayeva E, Steinman RM, Dhodapkar KM. Expansion of FOXP3 high regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients. Blood. 2006; 108: 2655–2661.
- Bankhurst AD. The modulation of human natural killer cell activity by prostaglandins. J Clin Lab Immunol. 1982; 7: 85-91.
- Baratelli F, Lin Y, Zhu L, Yang SC, Heuzé-Vourc'h N, Zeng G, Reckamp K, Dohadwala M, Sharma S, Dubinett S M. Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells. J Immunol. 2005; 175: 1483–1490.
- 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.

- Benard G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. Mycopathologia. 2008; 165(4-5): 209-21. Review.
- Benard G, Romano C, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannin MJS, Duarte AJS. Imbalance of IL-2, IFN-gama and IL-10 secretion in the Immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. Cytokine. 2001; 13: 248-252.
- 19. Bergmann C, Strauss L, Zeidler R, Lang S, Whiteside TL. Expansion of human T regulatory type 1 cells in the microenvironment of cyclooxygenase 2 overexpressing head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Res. 2007; 67: 8865–8873.
- Betz M, Fox BS. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. J Immunol. 1991; 146: 108–113.
- Bhattacharjee S, Bhattacharjee A, Majumder S, Majumdar SB, Majumdar S. Glycyrrhizic acid suppresses Cox-2-mediated anti-inflammatory responses during *Leishmania donovani* infection. J Antimicrob Chemother. 2012; 67(8): 1905-14.
- Biondo GA, Dias-Melicio LA, Bordon-Graciani AP, Acorci-Valério MJ, Soares AMVC. *Paracocccidioides brasiliensis* uses endogenous and exogenous arachidonic acid for PGEx Production. Mycopathologia. 2010; 179: 123-30.
- Biondo GA, Dias-Melicio LA, Bordon-Graciani AP, Kurokawa CS, de Campos Soares AM. Production of leukotriene B4 by *Paracoccidioides brasiliensis*. Yeast. 2012; 29(6): 201-8.
- Bocca AL, Hayashi EE, Pinheiro AG, Furlanetto AB, Campanelli AP, Cunha FQ, Figueiredo F. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. J Immunol 1998; 161(6): 3056-63.

- Bomalaski JS, Dundee D, Brophy L, Clark MA. Leukotriene B4 modulates phospholipid methylation and chemotaxis in human polymorphonuclear leukocytes. J Leukoc Biol. 1990; 47(1): 1-12.
- Bonfim CV, Mamoni RL, Blotta MH. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. Med Mycol. 2009; 47: 722-33.
- 27. Boniface K, Bak-Jensen KS, Li Y, Blumenschein W, McGeachy MJ, McClanahan TK, McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ, de Waal Malefyt R. Prostaglandin E₂ regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. J Exp Med. 2009; 206: 535-548.
- Bordon AP, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Biondo GA, Fecchio D, Peraçoli MT, Soares AMVC. Prostaglandin E(2) production byhigh and low virulent strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. Mycopathologia. 2007b; 163(3): 129-35.
- Bordon AP, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Calvi SA, Peraçoli MTS, Soares AMVC. Prostaglandin E₂ inhibits *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human monocytes. Microbes Infect. 2007a; 9(6): 744-7.
- Bordon-Graciani AP, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Araújo Jr JP, Soares AMVC. Inhibitory effect of PGE₂ on the killing of *Paracoccidioides brasiliensis* by human monocytes can be reversed by cellular activation with cytokines. Med Mycol. 2012; 50:726-34.
- Borges CL, Cecchini R, Tatakihara VL, Malvezi AD, Yamada-Ogatta SF, Rizzo LV, Pinge-Filho P. 5-Lipoxygenase plays a role in the control of parasite burden and contributes to oxidative damage of erythrocytes in murine Chagas' disease. Immunol Lett. 2009; 123(1): 38-45.
- Brodhagen M, Tsitsigiannis DI, Hornung E, Goebel C, Feussner I, Keller NP. Reciprocal oxylipin-mediated cross-talk in the Aspergillus-seed pathosystem. Mol Microbiol. 2008; 67(2): 378-91.

- Bronte V, Apolloni E, Cabrelle A, et al. Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. Blood. 2000; 96: 3838–46.
- Brown GD. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. Annu Rev Immunol. 2011; 29:1-21.
- 35. 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(8): 2289-94.
- Brummer E, Hanson LH, Stevens DA. Gamma-interferon activation of macrophages for killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and evidence for nonoxidative mechanisms. Int J Immunopharmacol. 1988; 10(8): 945-52.
- 37. Brummer E, Hanson LH, Restrepo A, Stevens DA. In vivo and in vitro activation of pulmonary macrophages by IFN-gamma for enhanced killing *of Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. J Immunol. 1988; 140(8): 2786-9.
- Burlandy-Soares LC, Mamoni RL, Lyra L, Schreiber AZ, Blotta MH. Expression of activation and cytotoxic molecules by peripheral blood lymphocytes of patients with paracoccidioidomycosis. Med Mycol. 2010; 48(6): 843-52.
- 39. Cacere CR, Mendes-Giannin MJS, Do Valle AC, Duarte AJS, Benard G. Altered *ex vivo* expression of caspase 8, caspase 9, and Bcl-2 is associated with T-cell hyporeactivity in patients with paracoccidioidomycosis. Clin Vaccine Immunol. 2009; 16(6): 953-5.
- Calich VL, Coppi Vaz CA, Burger E. PMN chemotactic factor produced by glass-adherent cells in the acute inflammation caused by *Paracoccidioides brasiliensis*. Br J Exp Pathol. 1985a; 66(1): 57-65.
- Calich VL, da Costa TA, Felonato M, Arruda C, Bernardino S, Loures FV, Ribeiro LR, de Cássia Valente-Ferreira R, Pina A. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Mycopathologia. 2008a; 165(4-5): 223-36. Review.

- 42. Calich VL, Kipnis TL, Mariano M, Neto CF, Dias da Silva WD. The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro: its opsonic effect and possible significance for an in vivo model of infection. Clin Immunol Immunopathol. 1979; 12(1): 21-30.
- Calich VL, Pina A, Felonato M, Bernardino S, Costa TA, Loures FV. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008b; 53: 1-7.
- 44. Calich VLG, Kashino SS. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Braz J Med Biol Res. 1998; 31: 615-23.
- 45. Calich VLG, Singer-Vermes LM, Siqueira AM, Burger E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. Br J Exp Pathol. 1985b; 66: 585.
- 46. Calvi SA, Peraçoli MTS, Mendes RP, Marcondes-Machado J, Fecchio D, Marques SA, et al. Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. Microbes Infect. 2003a; 5: 107-13.
- 47. Calvi SA, Soares AM, Peraçoli MT, Franco M, Ruiz RL Jr, Marcondes-Machado J, Fecchio D, Mattos MC, Mendes RP. Study of bronchoalveolar lavage fluid in paracoccidioidomycosis: cytopathology and alveolar macrophage function in response to gamma interferon; comparison with blood monocytes. Microbes Infect. 2003b; 5(15): 1373-9.
- Campanelli AP, Martins GA, Souto JT, Pereira MS, Livonesi MC, Martinez R, Silva JS. Fas-Fas ligand (CD95-CD95L) and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 engagement mediate T cell unresponsiveness in patients with paracoccidioidomycosis. J Infect Dis. 2003; 187(9): 1496-505.
- Canetti C, Serezani CH, Atrasz RG, White ES, Aronoff DM, Peters-Golden M. Activation of phosphatase and tensin homolog on chromosome 10 mediates the inhibition of Fc gamma R phagocytosis by prostaglandin E₂ in alveolar macrophages. J Immunol. 2007; 179(12): 8350-6.

- Cano LE, Arango R, Salazar ME, Brummer E, Stevens DA, Restrepo A. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. J Med Vet Mycol. 1992a; 30(2): 161-8.
- 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. 1992b; 60(5): 2096-100.
- Cano LE, Kashino SS, Arruda C, André D, Xidieh CF, Singer-Vermes LM, Vaz CA, Burger E, Calich VL. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. Infect Immun. 1998; 66(2): 800-6.
- 53. Cano LE, Singer-Vermes LM, Vaz CA, Russo M, Calich VL. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. Infect Immun. 1995; 63(5): 1777-83.
- 54. Carlos D, Machado ER, De Paula L, Sá-Nunes A, Sorgi CA, Jamur MC, Oliver C, Lima WT, Faccioli LH. Evidence for eosinophil recruitment, leukotriene B4 production and mast cell hyperplasia following *Toxocara canis* infection in rats. Braz J Med Biol Res. 2011; 44(4): 319-26.
- 55. Carmo JP, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peraçoli MTS, Soares AMVC. TNF-α activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H₂O₂-dependent mechanism. Med Mycol. 2006; 44: 363-8.
- 56. Castro M, Ralston NV, Morgenthaler TI, Rohrbach MS, Limper AH. *Candida albicans* stimulates arachidonic acid liberation from alveolar macrophages through alpha-mannan and beta-glucan cell wall components. Infect Immun. 1994; 62(8): 31.
- Cavassini KA, Campanelli AP, Moreira AP, Vancim JO, Vitali LH, Mamede RC, Martinez R, Silva JS. Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. J Immunol. 2006; 177(9): 5811-8.

- Chen N, Restivo A, Reiss CS. Leukotrienes play protective roles early during experimental VSV encephalitis. J Neuroimmunol. 2001; 120(1-2): 94-102.
- 59. Chou RC, Kim ND, Sadik CD, Seung E, Lan Y, Byrne MH, Haribabu B, Iwakura Y, Luster AD. Lipid-cytokine-chemokine cascade drives neutrophil recruitment in a murine model of inflammatory arthritis. Immunity. 2010; 33(2): 266-78.
- Coffey MJ, Phare SM, Kazanjian PH, Peters-Golden M. 5-Lipoxygenase metabolism in alveolar macrophages from subjects infected with the human immunodeficiency virus. J Immunol. 1996; 157(1): 393-9.
- 61. Coffey MJ, Phare SM, Peters-Golden M. Role of leukotrienes in killing of *Mycobacterium bovis* by neutrophils. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2004; v.71, p.185-90.
- 62. Costa DL, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Bordon AP, Tavian EG, Peraçoli MT, Soares AM. Effect of interleukin-10 on the *Paracoccidioides brasiliensis* killing by gamma-interferon activated human neutrophils. Microbiol Immunol. 2007; 51(1): 73-80.
- 63. De Freitas LA, Mbow LM, Estay M, Bleyenberg JA, Titus RG. Indomethacin treatment slows disease progression and enhances a Th1 response in susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania major*. Parasite Immunol. 1999; 21(5): 273-7.
- 64. Del Prete A, Shao WH, Mitola S, Santoro G, Sozzani S, Haribabu B. Regulation of dendritic cell migration and adaptive immune response by leukotriene B4 receptors: a role for LTB4 in up-regulation of CCR7 expression and function. Blood. 2007; 109(2): 626-31.
- 65. Demitsu T, Katayama H, Saito-Taki T, Yaoita H, Nakano M. Phagocytosis and bactericidal action of mouse peritoneal macrophages treated with leukotriene B4. Int J Immunopharmacol. 1989; 11: 801.
- 66. Dewald B, Baggiolini M. Activation of NADPH oxidase in human neutrophils: synergism between fMLP and the neutrophil products PAF and LTB4. Biochem Biophys Res Commun. 1985; 128: 297.

- 67. Di Gennaro A, Haeggström JZ. The leukotrienes: immune-modulating lipid mediators of disease. Adv Immunol. 2012; 116: 51-92.
- 68. Dias-Melicio LA, Fernandes RK, Golim MA, Rodrigues DN, Soares AMVC. Interleukin 18 promotes growth of *Paracoccidioides brasiliensis* within human monocytes via mannose receptor modulation. Inflammation Research. Official Journal of The International Association of Inflammation Societies. 2011; 60: S167.
- 69. Dos Santos DF, Bitencourt CS, Gelfuso GM, Pereira PA, de Souza PR, Sorgi CA, Nicolete R, Faccioli LH. Biodegradable microspheres containing leukotriene B(4) and cell-free antigens from *Histoplasma capsulatum* activate murine bone marrow-derived macrophages. Eur J Pharm Sci. 2011; 44(5): 580-8.
- 70. Edwards CK, Hedegaard HB, Zlotnik A, Gangadharam PR, Johnston RB Jr, 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-gamma. J Immunol. 1986; 136(5): 1820-7.
- 71. Erb-Downward JR, Huffnagle GB. *Cryptococcus neoformans* produces authentic prostaglandin E₂ without a cyclooxygenase. Eukaryot Cell. 2007; 6(2): 346-50.
- 72. Erb-Downward JR, Noverr MC. Characterization of prostaglandin E₂ production by Candida albicans. Infect Immun. 2007; 75(7): 3498-505.
- 73. Esaki Y, Li Y, Sakata D, Yao C, Segi-Nishida E, Matsuoka T, Fukuda K, Narumiya S. Dual roles of PGE2-EP4 signaling in mouse experimental autoimmune encephalomyelitis. Proc Natl Acad Sci. 2010; 107: 12233–12238.
- Farrell JP, Kirkpatrick CE. Experimental cutaneous leishmaniasis. II. A possible role for prostaglandins in exacerbation of disease in *Leishmania major*-infected BALB/c mice. J Immunol. 1987; 138(3): 902-7.

- 75. Ferrari C, Bordon-Graciani AP, Acorci-Valério MJ, Dias-Melicio LA, Soares AMVC. Role of leukotrienes on the human monocyte in fungicidal activity against *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Anais XXXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia, 2009, Salvador, Bahia.
- 76. Ferreira MC, de Oliveira RT, da Silva RM, Blotta MH, Mamoni RL. Involvement of regulatory T cells in the immunosuppression characteristic of patients with paracoccidioidomycosis. Infect Immun. 2010; 78(10): 4392-401.
- 77. Flamand L, Borgeat P, Lalonde R, Gosselin J. Release of anti-HIV mediators after administration of leukotriene B4 to humans. J Infect Dis. 2004; 189(11): 2001-9.
- 78. Flamand L, Tremblay MJ, Borgeat P. Leukotriene B4 triggers the in vitro and in vivo release of potent antimicrobial agents. J Immunol. 2007; 178(12): 8036-45.
- 79. Flynn JT, Hoff H. Lipopolysaccharide induces time-dependent increases in prostaglandin H synthase-2 and cytosolic phospholipase A2 mRNA in cultured human microsevesselderived endothelial cells. Shock 1995; 4(6): 433-440.
- Ford-Hutchinson A, Bray M, Doig M. Leukotriene B4, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. Nature. 1980; 286: 264.
- Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NG. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. Rev Soc Bras Med Trop. 1987; 20(2): 129-32.
- 82. Freire-de-Lima CG, Nascimento DO, Soares MB, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, de Mello FG, Dos Reis GA, Lopes MF. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. Nature. 2000; 403: 199–203.
- 83. 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.

- Gangopadhyay PK, Thadepalli H, Roy I, Ansari A. Identification of species of *Candida*, *Cryptococcus*, and *Torulopsis* by gas-liquid chromatography. J Infect Dis. 1979; 140(6): 952-8.
- 85. Gaudreault E, Gosselin J. Leukotriene B4 induces release of antimicrobial peptides in lungs of virally infected mice. J Immunol. 2008; 180(9): 6211-21.
- 86. Gfeller A, Dubugnon L, Liechti R, Farmer EE. Jasmonate biochemical pathway. Sci Signal. 2010; 3: 1-6.
- Goldman G, Welbourn R, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Lavage with leukotriene B4 induces lung generation of tumor necrosis factor-alpha that in turn mediates neutrophil diapedesis. Surgery. 1993; 113(3): 297-303.
- Gonzáles 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; 68(5): 2546-52.
- Goodarzi K, Goodarzi M, Tager AM, Luster AD, von Andrian UH. Leukotriene B4 and BLT1 control cytotoxic effector T cell recruitment to inflamed tissues. Nat Immunol. 2003; 4(10): 965-73.
- Goodrich-Tanrikulu M, Mahoney NE, Rodriguez SB. The plant growth regulator methyl jasmonate inhibits aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. Microbiol 1995; 141: 2831-2837.
- Gosselin J, Borgeat P, Flamand L. Leukotriene B4 protects latently infected mice against murine cytomegalovirus reactivation following allogeneic transplantation. J Immunol. 2005; 174(3): 1587-93.
- Gosselin J, Savard M, Tardif M, Flamand L, Borgeat P. *Epstein-Barr* virus primes human polymorphonuclear leucocytes for the biosynthesis of leukotriene B4. Clin Exp Immunol. 2001; 126: 494-502.

- 93. Goto T, Herberman RB, Maluish A, Strong DM. Cyclic AMP as a mediator of prostaglandin E-induced suppression of human natural killer cell activity. J Immunol. 1983; 130(3): 1350-5.
- 94. Grespan R, Fukada SY, Lemos HP, Vieira SM, Napimoga MH, Teixeira MM, Fraser AR, Liew FY, McInnes IB, Cunha FQ. CXCR2-specific chemokines mediate leukotriene B4dependent recruitment of neutrophils to inflamed joints in mice with antigen-induced arthritis. Arthritis Rheum. 2008; 58(7): 2030-40.
- 95. Gustafsson K, Ingelsten M, Bergqvist L, Nyström J, Andersson B, Karlsson-Parra A. Recruitment and activation of natural killer cells in vitro by a human dendritic cell vaccine. Cancer Res. 2008; 68: 5965–5971.
- 96. Hale AH, Evans DL, Daniel LW. Effect of prostaglandins on elicitation of anti-viralcytolytic activity. Immunol Lett. 1982; 4: 171-174.
- 97. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. Trends Immunol. 2002; 23(3):144-50.
- Herman RP. Oxylipin production and action in fungi and related organisms. In Rowley AF, Kuhn H, Schewe T. Eicosanoids and related compounds in plants and animals. Princenton Univertity Press Princenton, NJ. 1998; p115-130.
- Hörnsten L, Su C, Osbourn AE, Garosi P, Hellman U, Wernstedt C, Oliw EH. Cloning of linoleate diol synthase reveals homology with prostaglandin H synthases. J Biol Chem. 1999; 274(40): 28219-24.
- 100.Huang L, Zhao A, Wong F, Ayala JM, Struthers M, Ujjainwalla F, Wright SD, Springer MS, Evans J, Cui J. Leukotriene B4 strongly increases monocyte chemoattractant protein-1 in human monocytes. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004; 24: 1783.

- 101. Huang M, Stolina M, Sharma S, Mao JT, Zhu L, Miller PW, Wollman J, Herschman H, Dubinett SM. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. Cancer Res. 1998; 58: 1208-1216.
- 102. Hubbard LL, Ballinger MN, Thomas PE, Wilke CA, Standiford TJ, Kobayashi KS, Flavell RA, Moore BB. A role for IL-1 receptor-associated kinase-M in prostaglandin E2-induced immunosuppression post-bone marrow transplantation. J Immunol. 2010; 184(11): 6299-308.
- 103. Hubbard N & Erickson K. Role of 5-lipoxygenase metabolites in the activation of peritoneal macrophages for tumoricidal function. Mol Immunol. 1995; 160:115.
- 104. Ichiyama T, Hasegawa M, Ueno Y, Makata H, Matsubara T, Furukawa S. Cysteinyl leukotrienes induce monocyte chemoattractant protein 1 in human monocytes / macrophages. Clin Exp Allergy. 2005; 35(9): 1214-9.
- 105. Ichiyama T, Kajimoto M, Hasegawa M, Hashimoto K, Matsubara T, Furukawa S. Cysteinyl leukotrienes enhance tumour necrosis factor-alpha-induced matrix metalloproteinase-9 in human monocytes/macrophages. Clin Exp Allergy. 2007; 37(4): 608-14.
- 106. Ito N, Yokomizo T, Sasaki T, Kurosu H, Penninger J, Kanaho Y, Katada T, Hanaoka K, Shimizu T. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase activation and calcium influx for leukotriene B4-induced enzyme release. J Biol Chem. 2002; 277(47): 44898-904.
- 107. Jernerén F, Eng F, Hamberg M, Oliw EH Linolenate 9R-dioxygenase and allene oxide synthase activities of *Lasiodiplodiatheobromae*. Lipids. 2012; 47(1): 65-73.
- 108. Jernerén F, Hoffmann I, Oliw EH. Linoleate 9R-dioxygenase and allene oxide synthase activities of *Aspergillus terreus*. Arch Biochem Biophys. 2010; 495(1): 67-73.

- 109. Jimenez BE, Murphy JW. In vitro effects of natural killer cells against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase. Infect Immun. 1984; 46(2): 552-8.
- 110. Jonuleit H, Kühn U, Müller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk AH. Proinflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. Eur J Immunol. 1997; 27(12): 3135-42.
- 111. Joshi PC, Zhou X, Cuchens M, Jones Q. Prostaglandin E2 suppressed IL-15-mediated human NK cell function through down-regulation of common gamma-chain. J Immunol. 2001; 166(2): 885-91.
- Kaliński P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. Immunol Today. 1999; 20: 561–567.
- 113. Kaliński P, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Kapsenberg ML. Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+ CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. J Immunol. 1998; 161: 2804–2809.
- 114. Kanaoka Y, Boyce JA. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses. J Immunol. 2004; 173: 1503.
- 115. Kashino SS, Fazioli RA, Cafalli-Favati C, Meloni-Bruneri LH, Vaz CA, Burger E, Singer LM, Calich VL. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. J Interferon Cytokine Res. 2000; 20(1): 89-97.
- 116. Khayrullina T, Yen JH, Jing H, Ganea D. In vitro differentiation of dendritic cells in the presence of prostaglandin E2 alters the IL-12/IL-23 balance and promotes differentiation of Th17 cells. J Immunol. 2008; 181: 721–735.

- 117. Kim ND, Chou RC, Seung E, Tager AM, Luster AD. A unique requirement for the leukotriene B4 receptor BLT1 for neutrophil recruitment in inflammatory arthritis. J Exp Med. 2006; 203(4): 829-35.
- Kock J, Strauss CJ, Pohl CH, Nigam S. The distribution of 3-hydroxy oxylipins in fungi. Prostaglandins Other Lipid Mediat 2003; 71: 85-96.
- 119. Kolenko V, Rayman P, Roy B, Cathcart MK, O'Shea J, Tubbs R, Rybicki L, Bukowski R, Finke J. Downregulation of JAK3 protein levels in T lymphocytes by prostaglandin E2 and other cyclic adenosine monophosphate-elevating agents: impact on interleukin-2 receptor signaling pathway. Blood. 1999; 93: 2308–2318.
- 120. Krishnamurthy S, Plaine A, Albert J, Prasad T, Prasad R, Ernst JF. Dosage-dependent functions of fatty acid desaturase Ole1p in growth and morphogenesis of *Candida albicans*. Microbiology. 2004; 150(Pt 6): 1991-2003.
- 121. Kupfahl C, Tsikas D, Niemann J, Geginat G, Hof H. Production of prostaglandins, isoprostanes and thromboxane by Aspergillus fumigatus: identification by gas chromatography-tandem mass spectrometry and quantification by enzyme immunoassay. Mol Immunol. 2012; 49(4): 621-7.
- 122. Kurita N, Biswas SK, Oarada M, Sano A, Nishimura K, Miyaji M. Fungistatic and fungicidal activities of murine polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. Med Mycol. 1999; 37(1): 19-24.
- 123. Kurita N, Oarada M, Brummer E. Fungicidal activity of human peripheral blood leukocytes against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. Med Mycol. 2005; 43(5): 417-22.
- 124. Kurita N, Oarada M, Miyaji M, Ito E. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. Med Mycol. 2000; 38(2): 177-82.

- 125. Lärfars G, Lantoine F, Devynck MA, Palmblad J, Gyllenhammar H. Activation of nitric oxide release and oxidative metabolism by leukotrienes B4, C4, and D4 in human polymorphonuclear leukocytes. Blood. 1999; 93(4): 1399-405.
- 126. Lewis RA, Austen KF, Soberman RJ. Leukotrienes and other products of the 5lipoxygenase pathway: biochemistry and relation to pathobiology in human disease. N Engl J Med. 1990; 323: 645.
- 127. Liu Y, Van Ginderachter JA, Brys L, et al. Nitric oxide-independent CTL suppression during tumor progression: association with arginase-producing (M2) myeloid cells. J Immunol. 2003; 170: 5064-74.
- 128. Livonesi MC, Souto JT, Campanelli AP, Maffei CM, Martinez R, Rossi MA, Da Silva JS. Deficiency of IL-12p40 subunit determines severe paracoccidioidomycosis in mice. Med Mycol. 2008; 46(7): 637-46.
- Locksley RM, Fankhauser J, Henderson WR. Alteration of leukotriene release by macrophages ingesting *Toxoplasma gondii*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985; 82(20): 6922-6.
- 130. Longhi LN, da Silva RM, Fornazim MC, Spago MC, de Oliveira RT, Nowill AE, Blotta MH, Mamoni RL. Phenotypic and functional characterization of NK cells in human immune response against the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. J Immunol. 2012; 189(2): 935-45.
- 131. Machado ER, Ueta MT, Lourenço EV, Anibal FF, Sorgi CA, Soares EG, Roque-Barreira MC, Medeiros AI, Faccioli LH. Leukotrienes play a role in the control of parasite burden in murine strongyloidiasis J Immunol. 2005; 175(6): 3892-9.
- 132. Maekawa A, Austen KF, Kanaoka Y. Targeted gene disruption reveals the role of cysteinyl leukotriene 1 receptor in the enhanced vascular permeability of mice undergoing acute inflammatory responses. J Biol Chem. 2002; 277(23): 20820-4.

- 133. Mahic M, Yaqub S, Johansson CC, Taskén K, Aandahl EM. FOXP3+CD4+CD25+ adaptive regulatory T cells express cyclooxygenase-2 and suppress effector T cells by a prostaglandin E2-dependent mechanism. J Immunol. 2006; 177: 246–254.
- Mailliard R B, Alber SM, Shen H, Watkins SC, Kirkwood JM, Herberman RB, Kalinski P.
 IL-18-nduced CD83+CCR7+ NK helper cells. J Exp. Med. 2005; 202: 941-953.
- 135. Mamoni RL, Blotta MH. Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. Cytokine. 2006; 35(3-4): 207-16.
- 136. Mamoni RL, Blotta MH. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. Cytokine. 2005; 32: 20-9.
- 137. Mamoni RL, Nouér SA, Oliveira SJ, Musatti CC, Rossi CL, Camargo ZP, Blotta MH. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. Med Mycol. 2002; 40(2): 153-9.
- 138. Mancuso P, Nana-Sinkam P, Peters-Golden M. Leukotriene B4 augments neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumonia*. Infect Immun. 2001; 69(4): 2011-6.
- Mancuso P, Standiford DTJ, Marshall T, Peters-Golden M. 5-Lipoxygenase reaction products modulate alveolar macrophage phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun. 1998; 66: 5140-6.
- 140. Marks F, Fürstenberger G, Müller-Decker K. Metabolic targets of cancer chemoprevention: interruption of tumor development by inhibitors of arachidonic acid metabolism. Recent Results Cancer Res. 1999; 151: 45-67. Review.
- 141. Marques Mello L, Silva-Vergara ML, Rodrigues V Jr. Patients with active infection with *Paracoccidioides brasiliensis* present a Th2 immune response characterized by high Interleukin-4 and Interleukin-5 production. Hum Immunol. 2002; 63(2): 149-54.

- 142. Marumo K, Aoki Y. Discriminant analysis of cellular fatty acids of Candida species, Torulopsis glabrata, and *Cryptococcus neoformans* determined by gas-liquid chromatography. J Clin Microbiol. 1990; 28(7): 1509-13.
- 143. Mazzoni A, Bronte V, Visintin A, Spitzer JH, Apolloni E, Serafini P, Zanovello P, Segal DM. Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. J Immunol. 2002; 168: 689-95.
- 144. McEwen JG, Bedoya V, Patiño MM, Salazar ME, Restrepo A. Experimental murine paracoccidiodomycosis induced by the inhalation of conidia. J Med Vet Mycol. 1987; 25(3): 165-75.
- 145. Medeiros AI, Sá-Nunes A, Soares EG, Peres CM, Silva CL, Faccioli LH. Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. Infect Immun. 2004; 72: 1637-44.
- 146. Medeiros AI, Sá-Nunes A, Turato WM, Secatto A, Frantz FG, Sorgi CA, Serezani CH, Deepe GS Jr, Faccioli LH. Leukotrienes are potent adjuvant during fungal infection: effects on memory T cells. J Immunol. 2008; 181(12): 8544-51.
- 147. Medeiros AI, Silva CL, Malheiro A, Maffei CM, Faccioli LH. Leukotrienes are involved in leukocyte recruitment induced by live *Histoplasma capsulatum* or by the beta-glucan present in their cell wall. Br J Pharmacol. 1999; 128(7): 1529-37.
- 148. 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; 233-58.
- 149. 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.

- 150. Moqbel R, Sass-Kuhn SP, Goetzl EJ, Kay AB. Enhancement of neutrophil- and eosinophilmediated complement-dependent killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* in vitro by leukotriene B4. Clin Exp Immunol. 1983 Jun; 52(3): 519-27.
- 151. Moqbel R, Wakelin D, MacDonald AJ, King SJ, Grencis RK, Kay AB. Release of leukotrienes during rapid expulsion of *Trichinella spiralis* from immune rats Immunology. 1987; 60(3): 425-30.
- 152. Morato-Marques M, Campos MR, Kane S, Rangel AP, Lewis C, Ballinger MN, Kim SH, Peters-Golden M, Jancar S, Serezani CH. Leukotrienes target F-actin/cofilin-1 to enhance alveolar macrophage anti-fungal activity. J Biol Chem. 2011; 286(33):28902-13.
- 153. Moreira AP, Cavassani KA, Massafera Tristão FS, Campanelli AP, Martinez R, Rossi MA, Silva JS. CCR5-dependent regulatory T cell migration mediates fungal survival and severe immunosuppression. J Immunol. 2008b; 180(5): 3049-56.
- 154. Moreira AP, Dias-Melicio LA, Peraçoli MT, Calvi SA, Victoriano de Campos Soares AM. Killing of Paracoccidioides brasiliensis yeast cells by IFN-gamma and TNF-alpha activated murine peritoneal macrophages: evidence of H₂O₂ and NO effector mechanisms. Mycopathologia. 2008a; 166(1): 17-23.
- 155. Moreira AP, Dias-Melicio LA, Soares AM. Interleukin-10 but not Transforming Growth Factor beta inhibits murine activated macrophages *Paracoccidioides brasiliensis* killing: effect on H₂O₂ and NO production. Cell Immunol. 2010; 263(2): 196-203.
- 156. 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.
- 157. Munk ME, Da Silva WD. Activation of human complement system *Paracoccidioides brasiliensis* and its deposition on the yeast form cell surface. J Med Vet Mycol. 1992; 30(6): 481-4.

- 158. Muthuswamy R, Urban J, Lee JJ, Reinhart TA, Bartlett D, Kalinski P. Ability of mature dendritic cells to interact with regulatory T cells is imprinted during maturation. Cancer Res. 2008; 68: 5972-5978.
- 159. Nakaira-Takahagi E, Golim MA, Bannwart CF, Puccia R, Peraçoli MT. Interactions between TLR2, TLR4, and mannose receptors with gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* induce cytokine production by human monocytes. Med Mycol. 2011; 49(7): 694-703.
- 160. Nascimento FR, Calich VL, Rodríguez D, Russo M. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. J Immunol. 2002; 168(9): 4593-600.
- 161. Nicolete R, Secatto A, Pereira PA, Soares EG, Faccioli LH. Leukotriene B4-loaded microspheres as a new approach to enhance antimicrobial responses in *Histoplasma capsulatum*-infected mice. Int J Antimicrob Agents. 2009; 34(4): 365-9.
- 162. Noverr MC, Erb-Downward JR, Huffnagle GB. Production of eicosanoids and other oxylipins by pathogenic eukaryotic microbes. Clin Microbiol Rev. 2003; 16(3): 517-33.
- Noverr MC, Huffnagle GB. Regulation of Candida albicans morphogenesis by fatty acid metabolites. Infect Immun. 2004; 72(11): 6206-10.
- 164. Noverr MC, Phare SM, Toews GB, Coffey MJ, Huffnagle GB. Pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* produce immunomodulatory prostaglandins. Infect Immun. 2001; 69(5): 2957-63.
- 165. Noverr MC, Toews GB, Huffnagle GB. Production of prostaglandins and leukotrienes by pathogenic fungi. Infect Immun. 2002; 70(1): 400-2.
- 166. Oliveira LG, Kuehn CC, Santos CD, Toldo MP, do Prado JC Jr. Enhanced protection by melatonin and meloxicam combination in experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. Parasite Immunol. 2010; 32(4): 245-51.

- 167. Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaiordanou PM, Blotta MH. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. Microbes Infect. 2002; 4(2): 139-44.
- 168. Panis C, Mazzuco TL, Costa CZ, Victorino VJ, Tatakihara VL, Yamauchi LM, Yamada-Ogatta SF, Cecchini R, Rizzo LV, Pinge-Filho P. *Trypanosoma cruzi*: effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. Exp Parasitol. 2011; 127(1): 58-65.
- 169. Parameswaran K, Liang H, Fanat A, Watson R, Snider DP, O'Byrne PM. Role for cysteinyl leukotrienes in allergen-induced change in circulating dendritic cell number in asthma. J Allergy Clin Immunol. 2004; 114: 73.
- 170. Pathak SK, Basu S, Basu KK, Banerjee A, Pathak S, Bhattacharyya A, et al. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. Nat Immunol. 2007; 8: 610-8.
- 171. Peraçoli MT, Fortes MR, Da Silva MF, Montenegro MR. Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1995; 37(2): 129-36.
- 172. Peraçoli MT, Kurokawa CS, Calvi SA, Mendes RP, Pereira PC, Marques SA, Soares AM. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. Microbes Infect. 2003; 5(5): 413-8.
- 173. Peraçoli MT, Soares AM, Mendes RP, Marques SA, Pereira PC, Rezkallah-Iwasso MT. Studies of natural killer cells in patients with paracoccidioidomycosis. J Med Vet Mycol. 1991; 29(6): 373-80.
- 174. Peres CM, de Paula L, Medeiros AI, Sorgi CA, Soares EG, Carlos D, Peters-Golden M, Silva CL, Faccioli LH. Inhibition of leukotriene biosynthesis abrogates the host control of *Mycobacterium tuberculosis*. Microbes Infect. 2007; 9(4): 483-9.

- 175. Perrier V, Dubreucq E, Galzy P. Fatty acid and carotenoid composition of Rhodotorula strains. Arch Microbiol. 1995; 164(3): 173-9.
- Peters-Golden M, Coffey M. Role of leukotrienes in antimicrobial defense of the lung. J Lab Clin Med. 1998; 132(4): 251-7.
- 177. Peters-Golden M. Molecular mechanisms of leukotriene synthesis: the changing paradigm. Clin Exp Allergy. 1998; 28(9): 1059-65. Review.
- 178. Peters-Golden M, Canetti C, Mancuso P, and Coffey MJ. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. J Immunol. 2005; 174, 589-594.
- 179. 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.
- 180. Plaut M, Marone G, Gillespie E. The role of cyclic AMP in modulating cytotoxic T lymphocytes, II: Sequential changes during culture in responsiveness of cytotoxic lymphocytes to cyclic AMP-active agents. J Immunol. 1983; 131: 2945-2952.
- 181. Popi AF, Lopes JD, Mariano M. Gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibitsmacrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. Cell Immunol. 2002; 218: 87-94.
- 182. Rangel Moreno J, Estrada Garcia I, Garcia Hernadez ML, Aguilar Leon D, Marquez R, Hernandez Pando R. The role of prostaglandin E2 in the imunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. Immunology. 2002; 106: 257-66.
- 183. Reiner NE, Malemud CJ. Arachidonic acid metabolism by murine peritoneal macrophages infected with *Leishmania donovani*: in vitro evidence for parasite-induced alterations in cyclooxygenase and lipoxygenase pathways. J Immunol. 1985; 134(1): 556-63.

- 184. Reiner NE, Malemud CJ. Arachidonic acid metabolism in murine leishmaniasis (*Donovani*): ex-vivo evidence for increased cyclooxygenase and 5-lipoxygenase activity in spleen cells. Cell Immunol. 1984; 88(2): 501-10.
- Restrepo A, Tobón AM. Paracoccidioides brasiliensis. In Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier. 2005; 3062-8.
- 186. Ribeiro LRR, Calich VLG. The role of leukotrienes in pulmonary paracoccidioidomycosis (PCM) and in the fungicidal and secretory ability of peritoneal macrophages infected by *Paracoccidioides brasiliensis*. In: IX International Meeting on Paracoccidioidomycosis. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2005; 47: 27.
- 187. Rieser C, Bock G, Klocker H, Bartsch G, Thurnher M. Prostaglandin E₂ and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells. Synergistic activation of interleukin 12 production. J Exp Med. 1997; 186: 1603-8.
- 188. Rincón M, Tugores A, López-Rivas A, Silva A, Alonso M, De Landázuri MO, López-Botet M. Prostaglandin E2 and the increase of intracellular cAMP inhibit the expression of interleukin 2 receptors in human T cells. Eur J Immunol. 1988; 18: 1791-1796.
- 189. Robbiani D, Finch R, Jager D, Muller W, Sartorelli A, Randolph G. The leukotriene C4 transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3β, ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes. Cell. 2000; 103:757.
- 190. Rodrigues DR, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peraçoli MT, Soares AM. Paracoccidioides brasiliensis killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. Med Mycol. 2007; 45(1): 27-33.
- Rogerio AP, Anibal FF. Role of leukotrienes on protozoan and helminth infections. Mediators Inflamm. 2012; 2012: 595694. Review.
- 192. Romano CC, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ, Bernard G. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. Cytokine. 2002; 18, 149-57.

- 193. Romano CC, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ, Benard G. The role of interleukin-10 in the differential expression of interleukin-12p70 and its beta2 receptor on patients with active or treated paracoccidioidomycosis and healthy infected subjects. Clin Immunol. 2005; 114(1): 86-94.
- 194. Runarsson G, Liu A, Mahshid Y, Feltenmark S, Pettersson A, Klein E, Björkholm M, Claesson HE. Leukotriene B4 plays a pivotal role in CD40-dependent activation of chronic B lymphocytic leukemia cells. Blood. 2005; 105(3): 1274-9.
- 195. Sadikot RT, Zeng H, Azim AC, Joo M, Dey SK, Breyer RM, Peebles RS, Blackwell TS, Christman JW. Bacterial clearance of *Pseudomonas aeruginosa* is enhanced by the inhibition of COX-2. Eur J Immunol. 2007; 37(4): 1001-9.
- Schaller A, Stintzi A. Enzymes in jasmonate biosynthesis structure, function, regulation. Phytochem. 2009; 70: 1532–1538.
- Schleifer KW, Mansfield MJ. Supressor macrophages in African trypanosomiasis inhibit T cell proliferative responses by nitric oxide and prostaglandins. J Immunol. 1993; 151: 5492-5503.
- 198. Schmidt HH, Seifert R, Bohme E. Formation and release of nitric oxide from human neutrophils and HL-60 cells induced by a chemotactic peptide, platelet activating factor and leukotriene B4. FEBS Lett. 1989; 244: 357.
- 199. Secatto A, Rodrigues LC, Serezani CH, Ramos SG, Dias-Baruffi M, Faccioli LH, Medeiros AI. 5-Lipoxygenase deficiency impairs innate and adaptive immune responses during fungal infection. PLoS One. 2012; 7(3): e31701.
- 200. Serezani CH, Aronoff DM, Jancar S, Mancuso P, Peters-Golden M. Leukotrienes enhance the bactericidal activity of alveolar macrophages against *Klebsiella pneumoniae* through the activation of NADPH oxidase. Blood. 2005; 106(3): 1067-75.

- 201. Serezani CH, Chung J, Ballinger MN, Moore BB, Aronoff DM, Peters-Golden M. Prostaglandin E2 suppresses bacterial killing in alveolar macrophages by inhibiting NADPH oxidase. Am J Respir Cell Mol Biol. 2007; 37(5): 562-70.
- 202. Serezani CH, Perrela JH, Russo M, Peters-Golden M, Jancar S. Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. J Immunol 2006; 177(5): 3201-8.
- 203. Serhan CN, Haeggström JZ, Leslie CC. Lipid mediator networks in cell signaling: update and impact of cytokines. FASEB J. 1996; 10(10): 1147-58.
- 204. Sharma S, Yang SC, Zhu L, Reckamp K, Gardner B, Baratelli F, Huang M, Batra RK, Dubinett SM. Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin E2-dependent promotion of FOXP3 expression and CD4+CD25+ T regulatory cell activities in lung cancer. Cancer Res. 2005; 65: 5211-5220.
- 205. Sheibanie AF, Yen JH, Khayrullina T, Emig F, Zhang M, Tuma R, Ganea D. The proinflammatory effect of prostaglandin E2 in experimental inflammatory bowel disease is mediated through the IL-23→IL-17 axis. J Immunol. 2007; 178: 8138-8147.
- 206. Shi ZZ, Han B, Habib GM, Matzuk MM, Lieberman MW. Disruption of γ-glutamyl leukotrienase results in disruption of leukotriene D4 synthesis in vivo and attenuation of the acute inflammatory response. Mol Cell Biol. 2001; 21: 5389.
- 207. Sinha P, Clements VK, Fulton AM, Ostrand-Rosenberg S. Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. Cancer Res. 2007; 67(9): 4507-13.
- 208. Sinha P, Clements VK, Ostrand-Rosenberg S. Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease. J Immunol. 2005; 174: 636-45.

- 209. Smith RJ. Modulation of phagocytosis by and lysosomal enzyme secretion from guinea-pig neutrophils: effect of nonsteroid anti-inflammatory agents and prostaglindins. J Pharmacol Exp Ther. 1977; 200(3): 647-57.
- Smith WL & Dewitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. Adv Immunol. 1996; 62: 167-215.
- 211. Snijdewint FG, Kaliński P, Wierenga EA, Bos JD, Kapsenberg ML. Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. J Immunol. 1993; 150: 5321-5329.
- 212. 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.
- 213. Soontrapa K, Honda T, Sakata D, Yao C, Hirata T, Hori S, Matsuoka T, Kita Y, Shimizu T, Kabashima K, Narumiya S. Prostaglandin E2-prostaglandin E receptor subtype 4 (EP4) signaling mediates UV irradiation-induced systemic immunosuppression. Proc Natl Acad Sci USA. 2011; 108: 6668-6673.
- 214. Souto JT, Aliberti JC, Campanelli AP, Livonesi MC, Maffei CM, Ferreira BR, Travassos LR, Martinez R, Rossi MA, Silva JS. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon-gamma. Am J Pathol. 2003; 163(2): 583-90.
- 215. Souto JT, Figueiredo F, Furlanetto A, Pfeffer K, Rossi MA, Silva JS. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. Am J Pathol. 2000; 156(5): 1811-20.
- 216. Spanbroek R, Hildner M, Steinhilber D, Fusenig N, Yoneda K, Rådmark O, Samuelsson B, Habenicht AJ. 5-lipoxygenase expression in dendritic cells generated from CD34(+) hematopoietic progenitors and in lymphoid organs. Blood. 2000; 96(12): 3857-65.

- 217. Specht C, Bexten S, Kölsch E, Pauels HG. Prostaglandins, but not tumor-derived IL-10, shut down concomitant tumor-specific CTL responses during murine plasmacytoma progression. Int J Cancer. 2001; 91: 705-712.
- 218. Stables MJ, Newson J, Ayoub SS, Brown J, Hyams CJ, Gilroy DW. Priming innate immune responses to infection by cyclooxygenase inhibition kills antibiotic-susceptible and resistant bacteria. Blood. 2010; 116(16): 2950-9.
- 219. Stolina M, Sharma S, Lin Y, Dohadwala M, Gardner B, Luo J, Zhu L, Kronenberg M, Miller PW, Portanova J, et al. Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. J Immunol. 2000; 164: 361-370.
- 220. Strauss T, Botha A, Kock JL, Paul I, Smith DP, Linke D, Schewe T, Nigam S. Mapping the distribution of 3-hydroxylipins in the Mucorales using immunofluorescence microscopy. Antonie Leeuwenhoek. 2000; 78: 39-42.
- 221. Suzuki E, Kapoor V, Jassar AS, Kaiser LR, Albelda SM. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. Clin Cancer Res. 2005; 11: 6713-21.
- 222. Tager AM, Bromley SK, Medoff BD, Islam SA, Bercury SD, Friedrich EB, Carafone AD, Gerszten RE, Luster AD. Leukotriene B4 receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment. Nat Immunol. 2003a; 4(10): 982-90.
- 223. Tager AM, Luster AD. BLT1 and BLT2: the leukotriene B4 receptors. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2003b; 69: 123.
- 224. Talvani A, Machado FS, Santana GC, Klein A, Barcelos L, Silva JS, Teixeira MM. Leukotriene B (4) induces nitric oxide synthesis in infected murine macrophages and mediates resistance to infection. Infect Immun. 2002; 70(8): 4247-53.

- 225. Tavian EG, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Graciani AP, Peraçoli MT, Soares AM. Interleukin-15 increases *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human neutrophils. Cytokine. 2008; 41(1): 48-53.
- 226. Thardin JF, M' Rini C, Beraud M, Vandaele J, Frisach MF, Bessieres MH, Seguela JP, Pipy B. Eicosanoid production by mouse peritoneal macrophages during Toxoplasma gondii penetration: role of parasite and host cell phospholipases. Infect Immun. 1993; 61(4): 1432-41.
- 227. Toda A, Terawaki K, Yamazaki S, Saeki K, Shimizu T, Yokomizo T. Attenuated Th1 induction by dendritic cells from mice deficient in the leukotriene B4 receptor 1. Biochimie. 2010; 92(6): 682-91.
- 228. Toledo RG, Da Silva WD, Calich VL, Kipnis TL. Mannose-binding lectin complement pathway plays a key role in complement activation by *Paracoccidioides brasiliensis*. Mol Immunol. 2010; 48(1-3): 26-36.
- 229. Tsitsigiannis DI, Bok JW, Andes D, Nielsen KF, Frisvad JC, Keller NP. *Aspergillus* cyclooxygenase-like enzymes are associated with prostaglandin production and virulence. Infect Immun. 2005a; 73(8): 4548-59.
- 230. Tsitsigiannis DI, Keller NP. Oxylipins act as determinants of natural product biosynthesis and seed colonization in Aspergillus nidulans. Mol Microbiol. 2006; 59(3): 882-92.
- 231. Tsitsigiannis DI, Kowieski TM, Zarnowski R, Keller NP. Endogenous lipogenic regulators of spore balance in *Aspergillus nidulans*. Eukaryot Cell. 2004b; 3(6): 1398-411.
- 232. Tsitsigiannis DI, Kowieski TM, Zarnowski R, Keller NP. Three putative oxylipin biosynthetic genes integrate sexual and asexualdevelopment in *Aspergillus nidulans*. Microbiology. 2005b; 151(Pt 6): 1809-21.
- Tsitsigiannis DI, Zarnowski R, Keller NP. The lipid body protein, PpoA, coordinates sexual and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. J Biol Chem. 2004a; 279(12): 11344-53.

- 234. Valitutti S, Dessing M, Lanzavecchia A. Role of cAMP in regulating cytotoxic T lymphocyte adhesion and motility. Eur J Immunol. 1993; 23: 790-795.
- Vane JR, Botting RM. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. Inflamm Res. 1998; 47 Suppl 2:S78-87. Review.
- 236. Walker W, Rotondo D. Prostaglandin E2 is a potent regulator of interleukin-12 and interleukin-18 induced natural killer cell interferon-γ synthesis. Immunology. 2004; 111: 298-305.
- 237. Walker C, Kristensen F, Bettens F, de Weck AL. Lymphokine regulation of activated (G1) lymphocytes, I: Prostaglandin E2-induced inhibition of interleukin 2 production. J Immunol. 1983; 130: 1770-1773.
- 238. Wan M, Sabirsh A, Wetterholm A, Agerberth B, Haeggström JZ. Leukotriene B4 triggers release of the cathelicidin LL-37 from human neutrophils: novel lipid-peptide interactions in innate immune responses. FASEB J. 2007; 21(11): 2897-905.
- 239. Wasternack C, Kombrink E. Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. ACS Chem Biol. 2010; 5: 63-77.
- 240. Wasternack C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. Ann Bot. 2007; 100: 681-697.
- 241. Watchmaker PB, Berk E, Muthuswamy R, Mailliard RB, Urban JA, Kirkwood JM, Kalinski P. Independent regulation of chemokine responsiveness and cytolytic function versus CD8+ T cell expansion by dendritic cells. J Immunol. 2010; 184: 591-597.
- 242. Wirth JJ, Kierszenbaum F. Effects of leukotriene C4 on macrophage association with and intracellular fate of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 1985a; 15(1): 1-10.

- 243. Wirth JJ, Kierszenbaum F. Stimulatory effects of leukotriene B4 on macrophage association with and intracellular destruction of *Trypanosoma cruzi*. J Immunol. 1985b; 134(3): 1989-93.
- 244. Woolard MD, Hensley LL, Kawula TH, Frelinger JA. Respiratory Francisella tularensis live vaccine strain infection induces Th17 cells and prostaglandin E_2 , which inhibits generation of γ interferon-positive T cells. Infect Immun. 2008; 76: 2651-2659.
- 245. Wu CY, Wang K, McDyer JF, Seder RA. Prostaglandin E2 and dexamethasone inhibit IL-12 receptor expression and IL-12 responsiveness. J Immunol. 1998; 161: 2723-2730.
- 246. Yong EC, Chi EY, Henderson WR Jr. *Toxoplasma gondii* alters eicosanoid release by human mononuclear phagocytes: role of leukotrienes in interferon gamma-induced antitoxoplasma activity. J Exp Med. 1994; 180(5): 1637-48.
- 247. Zeidler R, Csanady M, Gires O, Lang S, Schmitt B, Wollenberg B. Tumor cell-derived prostaglandin E2 inhibits monocyte function by interfering with CCR5 and Mac-1. FASEB J. 2000; 14: 661-668.