

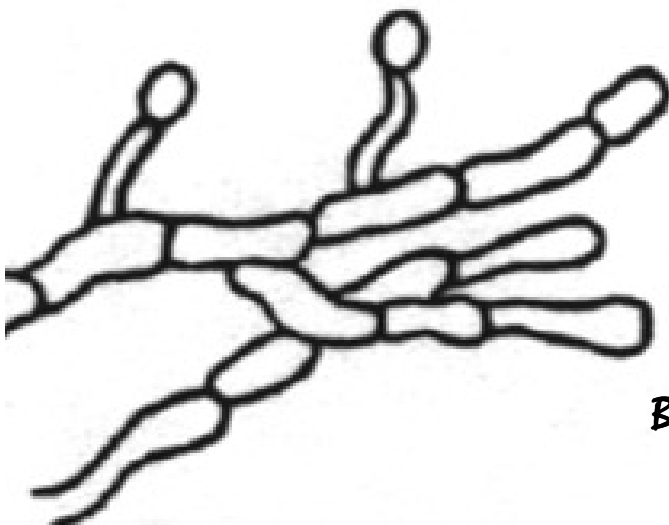
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE MEDICINA

*Participação do gene *Slc11a1* na infecção por
Paracoccidioides brasiliensis em linhagens de
camundongos selecionados segundo a alta ou baixa
reatividade inflamatória aguda*

Bruno Caetano Trindade

Dissertação de Mestrado



Botucatu

2007

Bruno Caetano Trindade

Participação do gene *Slc11a1* na infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* em linhagens de camundongos selecionados segundo a alta ou baixa reatividade inflamatória aguda

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Julio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Doenças Tropicais

Orientador: Prof. Dr. Silvio Luis de Oliveira

Botucatu

2007

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

Trindade, Bruno Caetano.

Participação do gene *Slc11a1* na infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*
em linhagens de camundongos selecionados segundo a alta ou baixa
reatividade inflamatória aguda / Bruno Caetano Trindade. – Botucatu: [s.n.],
2007.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Medicina de Botucatu, 2007.

Orientador: Silvio Luis de Oliveira

Assunto CAPES: 40101096

1. Paracoccidioidomicose - Aspectos genéticos 2. Paracoccidioides
brasiliensis
CDD 616.968

Palavras-chave: Camundongo; Inflamação aguda; Neutrófilo;
Paracoccidioides brasiliensis

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista e no Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

Dedico este trabalho à minha “Vó” Maria do Carmo (*in memoriam*). Através dela reconheço todo o empenho e amor da minha família em minha formação pessoal e profissional

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Silvio Luis de Oliveira, por aceitar este “desafio” e acreditar em meu potencial, permitindo meu crescimento científico sob sua orientação. Muito obrigado pelos ensinamentos, pela atenção com que me recebeu e principalmente pela amizade que construímos.

Aos Professores de imunologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do IB (Alexandrina Sartori, Angela Maria Victoriano de Campos Soares, Maria Terezinha Serrão Peraçoli, Maurício Sforcin e Ramon Kaneno), pelo exemplo, conhecimento transmitido, apoio e carinho. Sempre prestativos!

A Profa. Jussara Marcondes Machado por permitir meu ingresso no programa de PG em Doenças Tropicais.

Ao Prof. Marcelo De Franco pelo fornecimento dos animais e por “abrir minha cabeça”, permitindo enxergar melhor os resultados obtidos neste trabalho.

A Profa. Lucia Helena Faccioli pelas portas abertas de seu laboratório e material gentilmente cedido. Ótima pesquisadora e muito competente. Obrigado pelos ensinamentos passados e os que virão daqui para frente.

Ao Dr. Carlos Artério Sorgi pelo suporte técnico, sugestões e convívio agradável no laboratório e “bandejão”.

Aos secretários do Departamento de Micro-Imuno, Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem (Sônia Faraldo, Leonice Aparecida Garcia, Solange Sako Cagliari), pela atenção dispensada a mim e pelo carinho.

Ao Luis Severino dos Santos (Lula), sempre prestativo, com sorriso estampado e disponível a auxiliar nos cuidados com os animais mantidos no biotério do Departamento de Micro-Imuno.

Ao Luis Henrique Alquati, pelo auxílio técnico, por zelar pelos nossos laboratórios e pelo convívio.

A Juliana Semin Cavalheiro, quem me ensinou muitas técnicas utilizadas neste trabalho e agüentou minhas lamentações no período de adaptação em Botucatu. Obrigado por me auxiliar durante estes dois anos, pelas conversas e conselhos.

Ao meu “brother” Helanderson de Almeida Balderramas (Baldê), por me auxiliar sempre! Pelos momentos vividos com os animais, os experimentos e as baladas da “facul”. Meu amigo incondicional.

Aos meus amigos da imuno, meus sinceros agradecimentos pelo convívio agradabilíssimo, momentos de descontração e alegria. Mesmo não sabendo, participaram da minha formação através da convivência científica e pessoal, além da perseverança que demonstram. Muito obrigado pelas conversas sinceras e palavras de esperança.

Aos LIIPianos, que me auxiliaram neste período final do mestrado colaborando para o meu crescimento profissional. Aprendi e estou aprendendo muito com vocês.

A Judith Taborda Seullner, por me acolher como se fosse um filho, dando condições ideais para meus estudos em Botucatu mesmo não tendo laços sanguíneos.

A todos os meus amigos que venho colecionando desde a infância e perduram até hoje. Passando desde o futebol na rua, a faculdade em Araxá e a pós em Botucatu, até os dias atuais em Ribeirão. Sempre me jogaram para cima. São pessoas importantíssimas em minha vida a quem devo muito. Vocês contribuíram na minha formação e consequentemente na realização deste trabalho.

A CAPES pela bolsa concedida.

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

RESUMO

Camundongos selecionados para a máxima (AIRmax) ou mínima (AIRmin) reação inflamatória aguda apresentam desvio de frequência do gene *Slc11a1*. Este gene está envolvido no transporte de íons divalentes no compartimento endossomal/lisossomal de macrófagos e neutrófilos, interferindo na sua ativação e suscetibilidade a infecções. Neste estudo, nós investigamos a interação dos alelos *Slc11a1* R (*Slc11a1*rGly169) e S (expressão nula da proteína *Slc11a1*, *Slc11a1*sAsp169) com os *loci* de características quantitativas (QTL) moduladores da inflamação, durante a paracoccidiodomicose (PCM) em linhagens AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} and AIRmin^{SS} homozigotas para o gene *Slc11a1*, produzidas por acasalamentos assistidos por genotipagem. Nós verificamos que o alelo R em homozigose foi responsável por um maior influxo neutrofílico em camundongos com *background* AIRmax. Observamos ainda, que as linhagens AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} foram mais resistentes enquanto a linhagem AIRmin portadora do alelo R foi implicada em uma maior recuperação de UFC de *P. brasiliensis*. Desta forma, apesar de não observarmos diferença na recuperação de UFC entre as sublinhagens AIRmax, um aumento no influxo de neutrófilos para o pulmão dos animais AIRmax^{RR} pode ter compensado a influência do alelo *Slc11a1* R na multiplicação do fungo. Nós também mostramos que o número de UFC nos pulmões foi relacionado a síntese de IL-4 e IL-10 neste órgão, mas a produção de óxido nítrico foi semelhante em ambas as linhagens mostrando que este metabólito não foi o fator determinante de resistência/suscetibilidade nas linhagens analisadas. Quanto a análise de diferentes citocinas em sobrenadante de cultura de células do baço e no pulmão das linhagens utilizadas, mostramos que o gene modula a síntese de várias citocinas,

porém esta modulação foi dependente do *background* genético do hospedeiro e do microambiente gerado em resposta à infecção. Em conjunto, estes resultados sugerem que a presença do alelo *Slc11a1* R e um menor influxo leucocitário polimorfonuclear para os pulmões, parecem ser fatores decisivos na determinação do perfil de suscetibilidade na infecção por *P. brasiliensis*.

Palavras chave: *Paracoccidioides brasiliensis*; inflamação aguda; neutrófilo; camundongo.

Abstract

Mice selected for the maximum (AIRmax) or minimum (AIRmin) acute inflammatory reaction show disequilibrium of the *Slc11a1* gene. This gene is involved in the transport of divalent ions at the endosomal/lysosomal compartment within macrophages and neutrophils, interfering in their activation and susceptibility to infections. In this study, we investigated the interaction of the *Slc11a1* *R* (Slc11a1rGly169) and *S* (null Slc11a1 protein expression, Slc11a1sAsp169) alleles with the Quantitative Trait Loci (QTL) modulated-inflammation during paracoccidioidomycosis in homozygous AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} and AIRmin^{SS} lines produced by genotype-assisted breedings. It could be verified that *R* allele in homozygosis is associated with a more intense neutrophil influx in AIRmax background. The AIRmax lines showed to be more resistant while AIRmin bearing allele *R* implicated in a higher recovered *P. brasiliensis* CFU. Although, the increase of neutrophil influx to the lungs in AIRmax^{RR} mice can be compensating the influence of *Slc11a1* *R* allele in *P. brasiliensis* multiplication. We have also observed that the number of CFU in lungs was not related to NO production but instead to modulation of IL-4 and IL-10 synthesis in the lungs. Moreover, we present the effect of *Slc11a1* modulating the release of different cytokines in both supernatant of spleen cells and lungs, but this effect was time-dependent and change in accordance of host genetic background and microenvironment produced by immune response during *P. brasiliensis* infection. In conclusion, these findings suggest that the lower PMN leukocyte infiltration to the lungs and *Slc11a1* *R* genotype seemed to be a decisive factor in determining the susceptibility profiles in *P. brasiliensis* infection.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*; acute inflammation; neutrophil; mice.

ABREVIATURAS

AIR: reação inflamatória aguda

AIRmax: linhagem de camundongos selecionados para a máxima resposta inflamatória aguda

AIRmin: linhagem de camundongos selecionados para a mínima resposta inflamatória aguda

Animal “knockout”: animal com disrupção em algum gene

ANOVA: análise de variância

Con A: concanavalina A

DL₅₀: inóculo do fungo letal para 50% dos animais

ELISA: “enzyme-linked immunosorbent assay” (ensaio imuno-enzimático)

EPM: erro padrão da média

i.t.: intratraqueal

IFN- α : interferon alfa

iNOS: óxido nítrico sintase induzível

Ig: imunoglobulina

IL: interleucina

MHC: complexo principal de histocompatibilidade

MIP: proteína inflamatória de macrófagos

NO: óxido nítrico

P.b.: *Paracoccidioides brasiliensis*

PCM: paracoccidioidomicose

PBS: solução salina em tampão fosfato

QTL: *loci* de caracteres quantitativos

RPMI-C: meio RPMI-completo

RPMI-I: meio RPMI-incompleto

***Slc11a1*:** membro 1 da família 11 dos carreadores solúveis

Th1, Th2: células T helper 1 e células T helper 2

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

UFC: unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4. RESULTADOS.....	35
4.1. Caracterização do recrutamento de leucócitos para a cavidade broncoalveolar.....	35
4.2. Efeito do gene <i>Slc11a1</i> na multiplicação de leveduras nos pulmões de animais infectados por <i>P. brasiliensis</i>	38
4.3. Concentração de óxido nítrico em sobrenadante dehomogeneizados de pulmões obtidos de animais.infectados por <i>P. brasiliensis</i>	40
4.4. Produção de citocinas em sobrenadante de homogeneizados de pulmões obtidos de animais infectados por <i>P. brasiliensis</i>	42
4.4.1. Produção de IL-1 e IL-6.....	42
4.4.2. Produção de IL-4 e IL-10.....	44
4.4.3. Produção de IL-12, IFN- γ e TNF- α	46
4.5. Produção de óxido nítrico por células totais de baço.....	48
4.6. Produção de citocinas por células totais de baço.....	50
4.6.1 Produção de IL-1.....	50
4.6.2 Produção de IL-4 e IL-10.....	52
4.6.3 Produção de IL-12, IFN- γ e TNF- α	54
5. DISCUSSÃO.....	57
6. CONCLUSÃO.....	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

1. INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose é uma doença crônica granulomatosa, causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, um microrganismo intracelular facultativo (Restrepo & Tobón, 2005). É a micose profunda mais comum no Brasil (Wanke & Londero, 1994) e ocorre de forma endêmica na maioria dos países da América Latina (Restrepo, 1985; Lacaz et al., 1991).

O *P. brasiliensis* é um fungo conhecido até o presente momento na sua forma assexuada, imperfeita. Este fungo apresenta característica dimórfica, e se desenvolve na forma de levedura em tecidos de hospedeiros ou quando cultivados a 37°C e sob forma miceliana no meio ambiente e em culturas mantidas a 25°C (San-Blas & San-Blas, 1994; Restrepo et al., 1985). Embora seu habitat natural ainda não tenha sido definido, acredita-se que o fungo viva saprofiticamente no solo (Restrepo, 1994). Em 1986 documentou-se pela primeira vez um reservatório animal deste fungo na natureza, ao isolar-se o *P. brasiliensis* a partir de órgãos de tatus (*Dasypus novemcinctus*) capturados nas matas do Pará, Brasil (Naiff et al., 1986). Esse achado foi confirmado na região endêmica de Botucatu, São Paulo, Brasil, após o isolamento de três amostras fúngicas a partir daquela mesma espécie de tatus (Bagagli et al., 1998).

Evidências epidemiológicas e experimentais sugerem que a infecção natural se inicia após inalação de conídios produzidos pela forma micelial do fungo (Restrepo & Tobón, 2005). No pulmão, os conídios fagocitados pelos macrófagos alveolares iniciam a transformação em células leveduriformes após 12-18h (McEwen et al., 1987). Desse modo, as lesões primárias ocorrem com maior frequência nos pulmões, dando origem a uma infecção subclínica que pode evoluir para cura ou tornar-se latente na presença de resposta imune eficiente ou, ainda, disseminar-se para outros órgãos, por via

hematogênica ou linfática causando uma doença grave (Carbonell et al., 1965; San-Blas et al., 1985).

O aparecimento dos sinais clínicos caracteriza o início da paracoccidioidomicose doença que pode originar-se de diferentes vias: pela evolução direta do foco primário sem latência, por reativação do foco quiescente após latência ou por reinfecção exógena após exposição ao fungo (Franco et al., 1987). O *P.brasiliensis* induz lesões granulomatosas crônicas que comprometem, especialmente os tecidos pulmonares, as mucosas e o sistema fagocítico mononuclear, podendo se disseminar para o fígado, baço, adrenais e outros órgãos (Franco et al., 1989). Esse envolvimento pulmonar é particularmente importante, devido à sua frequência e presença de fibrose residual causada pela doença (Mendes, 1994). As lesões da mucosa oral, retal, intestinal e as cutâneas podem ser consideradas secundárias à disseminação hematogênica ou linfática do agente a partir dos pulmões (Martinez, 1997).

Nos indivíduos que desenvolvem doença são observados quadros clínicos diversos, que são agrupados em dois padrões principais que definem as formas aguda, sub-aguda ou juvenil e a forma crônica ou adulta (Franco et al., 1987). A forma aguda apresenta história clínica de curta duração, em geral 1 a 2 meses e sinais clínicos compatíveis com o envolvimento do sistema fagocítico mononuclear (baço, fígado, linfonodo e medula óssea), caracterizado por hepato e/ou esplenomegalia (Mendes et al., 1989). Nos pacientes com a forma aguda, as lesões são pouco frequentes e o acometimento pulmonar é raro (Franco et al., 1989; Franco et al., 1993). A forma crônica da paracoccidioidomicose representa cerca de 90% dos casos e apresenta quadro clínico de duração prolongada, com frequência acima de seis meses e revela envolvimento pulmonar e mucoso na maioria dos casos (Mendes, 1994).

A idade, o sexo e a ocupação são fatores de risco para a paracoccidioidomicose. Na forma juvenil, a doença afeta ambos os sexos em igual proporção, indicando que o fungo infecta tanto homens como mulheres. Porém, a doença crônica do adulto é mais freqüente em indivíduos do sexo masculino entre 30 e 50 anos. Acredita-se que a maior resistência da mulher se deva à presença de estrógenos, que impede a transformação de micélio para levedura na ocasião da infecção primária (Restrepo et al., 1984; Londero et al. 1990). Como todo processo infeccioso, forma e gravidade variadas na paracoccidioidomicose dependem também de outros fatores ambientais e constitutivos do hospedeiro como, genótipo, estado nutricional, alcoolismo, tabagismo (Santos et al., 2003) e não apenas dos fatores intrínsecos ao patógeno, como sua virulência (Singer-Vermes et al., 1989).

Em relação à interação parasita-hospedeiro na paracoccidioidomicose, estudos clínicos e experimentais sugerem a ação conjunta entre mecanismos inespecíficos e específicos de defesa que atuam na resistência ao *P. brasiliensis* (Calich et al., 1994). No que se refere à resposta imune específica, apesar dos antígenos do fungo induzirem tanto à produção de anticorpos quanto à resposta imune mediada por células, os primeiros não parecem exercer papel protetor, pois justamente nas formas mais agudas e graves da doença observa-se uma exacerbação da resposta humoral (Mendes et al., 1989). Diante dos estudos realizados avaliando a resposta imune celular (Chequer-Bou-Habib et al., 1989) foi possível concluir que os pacientes com paracoccidioidomicose apresentam diferentes graus de comprometimento, variando desde total anergia até respostas aparentemente preservadas. O maior grau de anergia tem sido observado por ocasião do diagnóstico, sendo que várias das alterações tendem a se normalizar, de acordo com a resposta ao tratamento (Peraçoli, 1988). Geralmente, o

comprometimento da resposta imune celular é mais intenso nas formas agudas do que nas formas crônicas da doença (Mota et al., 1985).

Na paracoccidioidomicose, o desequilíbrio entre as células Th1 e Th2 desempenham papel decisivo na depressão da resposta imune celular, altos níveis de anticorpos e a gravidade da doença. Uma resposta protetora contra o *P. brasiliensis* depende de um padrão Th1, envolvendo como principais citocinas o IFN- γ , TNF- α e IL-12 (Calich et al., 1998; Arruda et al., 2002; Romano et al., 2002)

Macrófagos derivados de monócitos são células importantes na defesa do hospedeiro por atuarem na resistência contra fungos através da sua capacidade microbicida e síntese de citocinas como o TNF- α que tem um efeito benéfico na prevenção de infecções fúngicas (Tracey, 1994). Na infecção por *P. brasiliensis*, a resistência é sugerida estar associada à atividade de macrófagos e também de linfócitos T (Cano et al., 1995).

Diversos trabalhos têm demonstrado que o NO é a molécula responsável pelo efeito citotóxico exercido por macrófagos sobre o *P. brasiliensis* (Gonzalez et al., 2000), e que também pode estar envolvido na imunossupressão por inibir a linfoproliferação, produção de TNF- α e expressão de moléculas de MHC de classe II (Bocca et al., 1998; Bocca et al., 1999).

Fatores controlados geneticamente podem regular o curso e a progressão da infecção por *P. brasiliensis* (Calich et al. 1994). Assim, diferentes linhagens de camundongos isogênicos, infectados intraperitonealmente por células leveduriformes de *P. brasiliensis*, apresentam um padrão diferente de resistência e suscetibilidade à infecção. A linhagem A/Sn foi caracterizada como a mais resistente enquanto a

linhagem B10.A mostrou-se altamente suscetível à infecção por *P. brasiliensis* (Calich et al., 1985).

Células de linfonodos de camundongos resistentes (A/Sn) infectados intraperitonealmente com *P. brasiliensis* produziram precocemente níveis sustentáveis de IL-2 e IFN- γ ao passo que os camundongos suscetíveis (B10.A) produziram baixos níveis de IFN- γ concomitantemente com altos níveis de IL-5. A citocina IL-10 foi produzida em quantidades similares em ambas linhagens de camundongos (Kashino et al., 2000). Na infecção pulmonar, apesar da produção de IFN- γ tanto por camundongos A/Sn quanto por B10.A, altos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10 foram detectadas nos homogenatos de pulmões de animais suscetíveis. Além disso, a neutralização *in vivo* da IL-12 por anticorpos monoclonais não somente anulou a resistência dos animais A/Sn como também diminuiu a resistência relativa da linhagem suscetível B10.A (Cano et al., 1998).

Logo após a infecção por *P. brasiliensis*, possivelmente o fungo interage com macrófagos alveolares induzindo a liberação de quimiocinas, nas quais atraem neutrófilos, as primeiras células a chegarem no sítio inflamatório (Kerr et al., 1988). De fato, peptídios de baixo peso molecular do sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais incubados com *P. brasiliensis* vivos são hábeis em atrair neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos (Calich et al., 1985).

Os neutrófilos têm um papel fundamental no controle da multiplicação de bactérias patogênicas como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* (Conlan, 1977), fungos como *Candida albicans* (Fulurija et al., 1966) e o *P. brasiliensis* (González et al., 2003; Meloni-Bruneri et al., 1996). Na infecção por conídios de *P. brasiliensis*, estudos prévios revelaram uma regulação positiva da reação

inflamatória caracterizada por recrutamento abundante de polimorfonucleares (Restrepo et al., 1992; Cock et al., 2000) e aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-1 β e MIP-2.

Vários trabalhos mostram os neutrófilos como células efetoras na infecção por *P. brasiliensis*, por apresentarem atividade fungicida contra o fungo após ativação mediada por citocinas (Cano et al., 1995; Benard et al., 1997; Kurita et al., 2000; Costa et al., 2007). A capacidade de fagocitar e matar microrganismos ocorre pela geração de intermediários reativos do oxigênio e liberação de enzimas líticas armazenadas em seus grânulos (Cassatela, 1995;). McEwen et al. (1987) demonstraram que a morte de leveduras de *P. brasiliensis* por células polimorfonucleares obtidas de camundongos infectados foi correlacionada com a capacidade dessas células em produzir reativos intermediários do oxigênio.

Apesar destas células serem importantes na defesa contra o *P. brasiliensis*, Pina et al. (2006), mostraram que o padrão genético do hospedeiro exerce importante influência em funções imunoprotetoras e imunoreguladoras dos neutrófilos, os quais parecem ser essenciais em situações destituídas de imunidade mediada por célula (Pina et al., 2006).

Um modelo utilizado no estudo do impacto do controle genético da imunidade não específica, é o de camundongos heterogêneos, fenotipicamente selecionados para a máxima (AIR max) e mínima (AIR min) reação inflamatória aguda, que foram obtidos através do modelo de seleção genética bidirecional (Ibañez et al., 1992). O método quantitativo para medir a intensidade da reação inflamatória aguda (AIR) é baseado no modelo proposto por Robert Fauve et al. (1983), que utiliza como agente inflamatório, microesferas de poliacrilamida (Biogel P100), substância completamente insolúvel,

quimicamente inerte, não biodegradável e não antigênica. Os parâmetros de avaliação da AIR foram: o número de células infiltradas e a concentração protéica presentes no exsudato inflamatório local, colhido 48 horas após a injeção subcutânea do Biogel no dorso dos animais (Ibañez et al., 1992; Herodin et al., 1983). Os dois parâmetros são positivamente correlacionados e possuem uma distribuição normal de freqüências.

O processo seletivo teve início a partir de uma população fundadora geneticamente heterogênea (F0) produzida pelo intercruzamento balanceado de 8 linhagens isogênicas de camundongos, sendo elas: A/J, DBA/2J, P/J, SWR/J, SJL/J, CBA/J, BALB/cJ e C57BL/6J (Stiffel et al., 1990). Nos animais da população F0, a intensidade da resposta inflamatória aguda seguiu uma curva Normal de distribuição de freqüências. Os acasalamentos seletivos foram feitos pela escolha baseada no valor fenotípico individual para os dois parâmetros investigados, selecionando os animais situados nos extremos da curva. Para a produção da linhagem de alta reatividade inflamatória aguda (AIRmax), os casais nas gerações consecutivas, foram selecionados entre os camundongos que apresentaram os valores de proteína e celularidade mais altos, enquanto para a linhagem de baixa reatividade (AIRmin) foram selecionados, para acasalamento, os animais com valores mais baixos. Para minimizar a consangüinidade da colônia foram evitados os acasalamentos entre irmãos e primos. Após várias gerações de acasalamentos seletivos, as linhagens atingiram o máximo de separação fenotípica – limite de seleção – onde cada linhagem é considerada homozigota para os alelos relacionados à determinação dos fenótipos (Ribeiro, 1994).

Os resultados do processo seletivo demonstraram claramente a regulação poligênica da intensidade da resposta inflamatória aguda, controlada por

aproximadamente 12 *loci* gênicos independentes (Biozzi et al., 1998; Ibañez et al., 1992).

O fenótipo que sofreu grandes modificações nestas linhagens foi a habilidade em recrutar células polimorfonucleares para o foco inflamatório. Na população inicial estas células perfaziam 71% dos leucócitos infiltrados e após a divergência entre as linhagens, a população de polimorfonucleares no exsudato da linhagem AIRmax perfazia 95%, enquanto que nos AIRmin este percentual decresceu para 45% (Ribeiro, 1994).

A diferença fenotípica das linhagens AIR não se restringiu à resposta a partículas de poliacrilamida no tecido subcutâneo, mas foi um fenômeno geral que ocorre em todos tecidos vascularizados em resposta a vários agentes flogísticos como carragenina, zymozan, bactérias vivas ou inativas (Ibañez et al., 1992) e ao veneno de *Bothrops jararaca* (Carneiro et al., 2002).

Possíveis modificações na resposta imune específica foram investigadas e a análise da produção de diferentes isotipos de anticorpos frente a antígenos complexos revelou ser semelhante em ambas as linhagens, exceto pela maior produção nos animais AIRmax de IgE, cuja biossíntese entretanto, é influenciada por fatores inflamatórios. A resposta mediada por células foi também investigada pela avaliação da hipersensibilidade tardia a antígenos de *Salmonella typhimurium* e a eritrócitos heterólogos e também se mostrou bastante semelhante para as duas linhagens (Araujo et al., 1998).

A seleção genética para a resposta inflamatória aguda aparentemente não atingiu a reatividade imunológica específica destes animais, mostrando certa

independência na regulação genética dos compartimentos natural e específico da imunidade. Apesar disto, camundongos AIRmax mostraram-se altamente resistentes à infecção experimental por patógenos intracelulares como *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes*, suportando inóculos superiores a 2×10^7 e 2×10^{11} bactérias, respectivamente, enquanto que a DL50 para os animais AIRmin foi cerca de 1000 e 100 vezes menor para os dois patógenos (Araujo et al., 1998).

Na seleção de inflamação, foi encontrado um significativo desvio de frequência do alelo S do gene *Slc11a1*, de 25% na população inicial (F0) para 60% nos animais AIRmin e apenas em 9% nos AIRmax, sugerindo que este desvio tenha sido devido ao processo de seleção e que o gene *Slc11a1* ou algum outro muito próximo a ele, seria um dos *loci* de características quantitativas (QTL) envolvidos na regulação da intensidade da reação inflamatória aguda (Araújo et al., 1998).

Investigando a suscetibilidade de algumas linhagens de camundongos isogênicos à parasitas intracelulares, foi observada uma semelhança de sensibilidade em estudos de infecção por *Leishmania donovani* (Bradley et al., 1974) e por *Salmonella* entérica sorotipo *Typhimurium* (Plant & Glynn et al., 1974), que culminaram na descrição dos *loci* *Lsh* (Bradley et al., 1979) e *Ity* (Plant & Glynn et al., 1976), localizados em uma região muito próxima no cromossomo 1. O mesmo fenômeno foi observado na infecção por *Mycobacterium bovis*, para o qual foi descrito o *locus Bcg* (Skamene e col., 1982; Skamene et al., 1984). Finalmente em 1993, utilizando clonagem posicional, foi demonstrado que o *locus Bcg/Lsh/Ity* representava um único gene, denominado *Natural resistance-associated macrophage protein-1* (*Nramp1*) (Vidal et al., 1993) recentemente denominado *Solute carrier family 11 member a 1* (*Slc11a1*).

Existe uma conservada sintonia entre o gene *Slc11a1* murino, localizado no cromossomo 1, e o gene *Slc11a1* humano, localizado no cromossomo 2. Ambos codificam para uma proteína altamente hidrofóbica de aproximadamente 60 Kda, com característica de uma proteína integral de membrana, que possui 12 domínios transmembrânicos, uma alça citoplasmática glicosilada, com vários sítios de fosforilação (Blackwell et al., 1995; Cellier et al., 1995; Barton et al., 1995; Vidal et al., 1993), além de uma sequência de transporte (*Consensus Transport Motif* – CTM) estruturalmente homóloga às proteínas de transporte de membrana encontradas em bactérias e eucariotos, sugerindo o envolvimento desta proteína no transporte de íons (Cellier et al., 1995).

A proteína codificada pelo gene *Slc11a1* localiza-se nos compartimentos endossomal/lisossomal de células fagocíticas, como macrófagos, monócitos e leucócitos polimorfonucleares, sendo que durante a fagocitose a proteína *Slc11a1* é rapidamente recrutada para a membrana do fagolisossomo (Cellier et al., 1997; Vidal et al., 1993). Os leucócitos polimorfonucleares representam o maior sítio de expressão de RNAm do gene *Slc11a1*, seguido em menor grau pelos monócitos (Cellier et al., 1997; Cellier et al., 1994).

A expressão do gene *Slc11a1* em macrófagos afeta a capacidade do hospedeiro em controlar a replicação intracelular de patógenos presente nos fagolisossomos. Em camundongos, a suscetibilidade é associada a uma substituição não conservativa na posição 169 do aminoácido glicina por ácido aspártico, causada por uma mutação pontual na região codificadora do quarto domínio transmembrânico (Vidal et al., 1995; Malo & Skamene, 1994). A mutação confere uma alteração na estrutura ou estabilidade

deste domínio (Xue et al. 2006), que acarreta na perda da função da proteína *Slc11a1* (Blackwell et al. 2004).

Em humanos, das variantes identificadas no gene *Slc11a1*, três polimorfismos foram localizados em seqüências potencialmente regulatórias, como a promotora do gene, regiões 3' não traduzíveis (UTRs) e em uma substituição não conservativa de aminoácidos D543N da porção citoplasmática carboxi-terminal da proteína (Blackwell et al., 1995; Liu et al., 1995; Buu et al., 1995; White et al., 1994). O polimorfismo encontrado na região promotora do gene *Slc11a1* codifica para quatro alelos, permitindo a genotipagem dos indivíduos em homozigotos e heterozigotos para os diferentes alelos deste gene (Blackwell et al., 1995). Estudos propõem que a alta expressão do alelo 3 estaria associado ao desenvolvimento de doenças autoimunes, enquanto a baixa expressão do alelo 2 estaria associado na suscetibilidade à infecções (Searle & Blackwell, 1999).

Os dados de literatura para a direção do transporte e o substrato transportado pela proteína *Slc11a1* são controversos (Lam-Yuk-Tseung & Gros, 2003). Existem duas teorias, a primeira sugere que o *Slc11a1* retira os cátions de Fe^{+2} das hemácias senescentes fagocitadas, do fagolisossomo para o citoplasma do macrófago (Atkinson & Barton, 1998; Fleming et al., 1998). Um efeito direto deste transporte na resistência à infecção, é de que o macrófago que possui o alelo normal do gene *Slc11a1* (*Slc11a1* R), realizaria o transporte eficiente de íons para fora do fagolisossomo. Desta forma, indisponibilizando cátions essenciais para o crescimento bacteriano (como Fe^{+2}) e para a bactéria desempenhar a sua atividade catalítica dentro do fagossoma (como Zn^{+2} e Mn^{+2}) (Atkinson & Barton, 1999; Atkinson & Barton, 1998; Gomes & Appelberg, 1998). A segunda teoria propõe que a proteína normal do gene *Slc11a1* transportaria o ferro

para dentro do fagossomo, favorecendo a reação de Fenton/Harber-Weiss, que gera radicais hidroxila altamente tóxicos para a bactéria (Goswami et al., 2001; Khun et al., 2001; Khun et al., 1999; Zwilling et al., 1999).

Estudos funcionais utilizando linhagens de camundongos isogênicos e linhagens de macrófagos *Slc11a1* transfectados mostram que o gene *Slc11a1* tem um importante papel na fase inicial da atividade microbicida de macrófagos tendo muitos efeitos pleiotrópicos incluindo regulação da IL-1, iNOS, MHC de classe II, TNF- α , liberação de NO, no *burst* oxidativo e atividade tumoricida bem como na antimicrobiana (Blackwell et al., 2000). Além disso, interage na produção de IFN- γ (Kita et al., 1992; Ramarathinan et al., 1993).

Diferenças na suscetibilidade a microrganismos observadas em modelos de camundongos *inbred*, tem sido inicialmente atribuída a presença do alelo de resistência (R) ou de susceptibilidade (S) do *locus Slc11a1* (Lissner et al., 1985). Estes estudos foram confirmados por experimentos com camundongos knockout para o gene *Slc11a1* originados de camundongos resistentes, os quais perderam a capacidade em controlar a infecção, tornando-se suscetíveis (Vidal et al., 1995).

Interessantemente, a distribuição do padrão de resistência/suscetibilidade (R/S) à paracoccidiodomicose entre linhagens de camundongos isogênicos (Calich et al., 1987) assemelha-se ao padrão observado com o gene *Slc11a1* (Wyllie et al., 2002) após infecção com microrganismos intracelulares como *Salmonella typhimurium*, *Mycobacterium bovis* e *Leishmania donovani* (O'Brien et al., 1980; Skamene et al., 1982). Fenotipicamente, macrófagos de camundongos resistentes a paracoccidiodomicose A/Sn apresentaram maior atividade microbicida que macrófagos

de camundongos suscetíveis B10.A que não expressam a proteína *Slc11a1* (Vidal et al., 1996a, b) , dando suporte a hipótese que o gene *Slc11a1* pode ser um dos genes envolvidos na resistência/suscetibilidade à infecção por *P.brasiliensis*.

Para avaliar o efeito dos QTL fixados no processo seletivo dos animais AIRmax e AIRmin na suscetibilidade a doenças autoimunes, infecciosas e neoplasias dependente do gene *Slc11a1*, foram produzidas no Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan sublinhagens onde os alelos R e S do gene *Slc11a1* foram fixados em homozigose no background genético AIRmax e AIRmin. Estas novas linhagens foram nomeadas AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}. Desta forma, as observações descritas anteriormente nos incitaram a investigar se estas sublinhagens exibem diferentes padrões de respostas após infecção por *P.brasiliensis*.

2. OBJETIVOS

Verificar a interação do gene *Slc11a1* com os *loci* reguladores da reatividade inflamatória aguda no curso da paracoccidiodomicose experimental, investigando a participação deste gene na modulação dos mecanismos envolvidos na resistência/suscetibilidade ao *Paracoccidioides brasiliensis*.

Para tanto, desenvolvemos a seguinte programação:

1. Avaliação da resistência à infecção experimental por *P. brasiliensis* das sublinhagens de camundongos AIRmax e AIRmin homozigotas para os alelos R e S do gene *Slc11a1*, ou seja: AIRmax *Slc11a1*^{RR}; AIRmax *Slc11a1*^{SS}; AIRmin *Slc11a1*^{RR}; AIRmin *Slc11a1*^{SS}, através da avaliação das unidades formadoras de colônia (UFC);
2. Avaliação da cinética do recrutamento celular para os pulmões de animais infectados por *P. brasiliensis*;
3. Análise da produção de NO pelas células do baço e nos pulmões desses animais;
4. Avaliação de citocinas como IL-1, IL-6, IL-4, IL-10, IL-12, INF- γ e TNF- α de células do baço e em pulmões de animais infectados com *P. brasiliensis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos com 10 semanas de idade das sublinhagens homozigotas para os alelos R e S do gene *Slc11a1*: AIRmax^{RR}; AIRmax^{SS}; AIRmin^{RR} e AIRmim^{SS}. Estes animais foram produzidos no biotério do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan através de cruzamentos assistidos por genotipagem, à partir de camundongos selecionados para a máxima (AIRmax) e mínima (AIRmin) reação inflamatória aguda ao Biogel e mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia - IB - UNESP/Botucatu. Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Faculdade de Medicina de Botucatu (protocolo n. 483/2005)

3.2. Cultivo do *P. brasiliensis*

Foi utilizada a forma leveduriforme da cepa 18 do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb 18) mantida nos laboratórios do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu. A cultura desta cepa é mantida com subcultivos semanais a 37° C no meio de cultura ágar glicose-peptona-extrato de levedura (GPY) contendo: 1,5% de glicose; 1% de peptona e 0,5% de extrato de levedura. As culturas foram utilizadas com 6 dias de cultivo.

3.3. Preparação do inóculo e determinação da viabilidade de *P. brasiliensis*

As células leveduriformes foram transferidas da superfície de meio de cultura com auxílio de alça plástica para tubos estéreis contendo pérolas de vidro de 4 mm de diâmetro e solução salina tamponada estéril, pH 7,2 (PBS), e homogeneizadas em agitador de tubos tipo Vortex, por 3 ciclos de 10 segundos cada. A seguir, a suspensão de leveduras foi mantida a 37°C durante 5 minutos, para sedimentar grumos não desfeitos durante a agitação. O sobrenadante, contendo células isoladas ou com poucos brotamentos foi colhido e alíquotas desta amostra foram submetidas ao teste de viabilidade com diacetato de fluoresceína e brometo de etídio (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) (Calich et al., 1979). As amostras foram utilizadas somente quando a viabilidade do fungo foi superior a 80%. Após a contagem em câmara hemocitométrica, tipo Neubauer, a concentração de células fúngicas foi padronizada para 1×10^7 leveduras viáveis/mL.

3.4. Infecção pulmonar com *P. brasiliensis* através da inoculação intratraqueal, por procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (i.p.) com 2,2,2-Tribromoetanol 99% (ACROS, New Jersey, USA), na concentração de 2,5% em PBS, na dose de 250 mg/kg de animal. Para a inoculação das leveduras de *P. brasiliensis*, os animais anestesiados tiveram suas traquéias expostas sendo inoculados i.t. com 100 µl de uma suspensão de 1×10^7 leveduras/ml de *P. brasiliensis* (1×10^6 leveduras/animal). Animais controle foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico e receberam 100 µl PBS estéril.

3.5. Obtenção, contagem total e diferencial das células do lavado broncoalveolar (LBA)

As células do LBA foram obtidas através da inserção na traquéia de um catéter acoplado a uma seringa contendo 1 ml de solução de PBS estéril. Esse procedimento foi repetido 3 vezes com o mesmo volume para obtenção da suspensão celular. O exsudado foi coletado individualmente de cada animal e adicionado separadamente em tubos plásticos. A contagem do número total de células presentes nos lavados foi feita empregando solução de Turk e câmara de Neubauer. As contagens diferenciais das células foram feitas em esfregaços preparados em citocentrífuga (Cytospin 3, Shandon Souther Products Ltd., Cheshire, UK) e submetidas à coloração por Panótico (Laborclin LTDA, Pinhais Paraná, Brasil).

3.6. Determinação de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) nos pulmões de animais infectados com *P. brasiliensis*

Animais infectados com *P. brasiliensis*, foram sacrificados após 2, 7 e 14 dias de infecção e tiveram o pulmão esquerdo retirado e submetido a pesagem em placas de Petri (Falcon, B-D, Franklin Lakes, N.J.) contendo 3 ml de RPMI-I Sigma (GIBCO BRL, Grand Island, NY, U.S.A).

Após a pesagem, o pulmão esquerdo dos animais foi cortado em pequenos fragmentos que foram colocados em tubo cônico de 50 mL contendo meio RPMI-I acrescido de liberase (0,5 µg/mL) (Sigma St. Louis, MO) e incubados a 37°C, durante 30 minutos, sob agitação (agitador orbital a 150 rpm, Incubator shaker series 25, New Brunswick, Edison, New Jersey, USA). Decorrido o tempo de incubação, a dispersão das células pulmonares foi realizada com o auxílio de uma seringa de 10 mL. Alíquotas

de 100 μ L dessa suspensão foram semeadas, em duplicata para cada pulmão, com auxílio de bastões de vidro em L, em placas de Petri 20 x 100mm, contendo Brain Heart Infusion Agar, suplementado com 5% de fator de crescimento (Singer-Vermes et al., 1992). Após 15 dias de cultivo a 35°C, o número de UFC foi contado e o valor corrigido por grama de tecido (log 10).

3.7. Cultura de células totais de baço

Baços de animais controles e infectados com *P. brasiliensis* foram coletados após 2, 7 e 14 dias de infecção e processados em 3 mL de RPMI-C em peneiras de nylon. Após a lise das hemácias, as células foram lavadas 3 vezes em RPMI-I e ressuspensas em 1 mL de RPMI-C. A suspensão celular foi ajustada para 2×10^6 células/mL e cultivada em placas de 48 poços, em volume de 500 μ L/poço, em triplicata. As células foram estimuladas, *in vitro*, com 10 μ L/poço de Con A (Sigma St. Louis, MO, Tipo III) (2 mg/mL) em RPMI-C ou incubadas somente com RPMI-C como controle. Após 48 horas em estufa umidificada, com 5% de CO₂ a 37°C, os sobrenadantes de cultura foram coletados e estocados a -70°C para posterior dosagem de citocinas e NO.

3.8. Preparação dos homogeneizados de pulmão para dosagem de citocinas e NO

Para a dosagem de citocinas e NO *ex vivo* foi realizado o seguinte procedimento: após a infecção i.t. dos camundongos com *P. brasiliensis*, os mesmos foram sacrificados nos períodos de 2, 7 e 14 dias após a infecção. Após a coleta do exsudato do LBA, os pulmões foram retirados e armazenados a -70 °C, até o momento da dosagem. Após o descongelamento dos pulmões, foram adicionados 2 ml de RPMI-I e

realizada sua homogeneização utilizando o homogeneizador de tecido (Ultraturax T 50 IKA – Labortechnik, Germany). Após a homogeneização, o lisado celular total obtido foi centrifugado a 4°C por 15 minutos, a 10.000 *g* (centrífuga Avanti 30, Beckman). A seguir, o sobrenadante foi coletado, e submetido à dosagem de citocinas, e NO.

3.9. Detecção de citocinas por Ensaio Imuno-Enzimático (ELISA)

Empregando o método de ELISA, foi feita a quantificação das citocinas IL-1- α , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α (BD, Pharmingen, San Diego, CA) empregando anticorpos específicos (purificados e biotinilados) e citocinas-padrão, de acordo com instruções do fabricante. Os anticorpos de captura foram diluídos em tampão carbonato 0,1 M, pH 5,0 (100 μ L/poço), na concentração de 2 a 4 μ g/mL, e após incubação das placas por 18 horas a 4°C, as mesmas foram lavadas 3 vezes com 300 μ L de solução salina em tampão fosfato (PBS) com 0,05% de Tween (Sigma, St. Louis, MO) (tampão de lavagem). Após as sucessivas lavagens e secagem da placa, foram adicionadas 200 μ L/poço de PBS contendo 1% de BSA (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) (tampão de bloqueio) seguido de incubação à temperatura ambiente no mínimo por 2 horas. Após o bloqueio, os poços foram novamente lavados 3 vezes com o tampão de lavagem, e então adicionados 100 μ L das amostras para a quantificação das citocinas. A curva-padrão com citocinas (IL-1- α , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α) recombinantes variou de 9,6 a 2.500 pg/mL. Após incubação por 18 horas a 4°C, foi repetido o procedimento de lavagem da placa, e adicionados 100 μ L/poço dos anticorpos de detecção biotinilados diluídos em tampão de bloqueio na concentração de 2 a 4 μ g/mL. Percorrido 2 horas de incubação à temperatura ambiente, foi repetido novo

ciclo de lavagem, e em seguida feita a amplificação da reação pela adição de 100 μL /poço de estreptoavidina/biotina/peroxidase (Dako, Carpinteria, CA, USA), diluído em tampão de bloqueio com 0,05% de Tween, na concentração de 1,25 mg/mL com incubação por mais 1 hora. Após novo ciclo de lavagem, foram adicionados 100 μL /poço da solução de substrato, contendo H_2O_2 e tetrametilbenzidina (TMB) (BD, Pharmingen, San Diego, CA), e as placas foram incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente. A reação foi bloqueada adicionando 50 μL /poço de ácido sulfúrico (H_2SO_4 1M). A densidade ótica (D.O.) foi avaliada em leitor de microplacas em 450 nm (μQuant , Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) e a concentração de citocinas calculada a partir da curva padrão.

3.10. Detecção de Nitrito (NO_2^-) em sobrenadante de cultura de células do baço e homogeneizados de pulmões

A detecção da produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada através da dosagem de nitrito (NO_2^-) pelo método de Greiss. Para a dosagem de nitrito, 100 μL de sobrenadante de cultura de células do baço ou dos homogeneizados dos pulmões foram adicionados a 100 μL do reagente de Greiss contendo uma parte da solução estoque de NEED a 0,1% (Sigma, St. Louis, MO) e uma parte da solução estoque de sulfanilamida (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a 1% em ácido fosfórico (H_3PO_4) 5%. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, a D.O. foi obtida em leitor de microplacas em filtro de 540 nm (Metertech Inc., modelo 960) contra um branco constituído por reagente de Griess. Para análise quantitativa das amostras foi preparada na mesma placa a curva padrão contendo nitrito de sódio em concentrações

variando entre 200 a 3 μM . A quantidade de nitrito das amostras pode ser correlacionada aos valores de absorbância obtidos na curva padrão.

3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM e os mesmos foram analisados utilizando ANOVA seguido de teste Tukey. Para análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism 4 (Califórnia, U.S.A.). As estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4 – RESULTADOS

4.1. Caracterização do recrutamento de leucócitos para a cavidade broncoalveolar

Com o objetivo de verificar se o fenótipo selecionado originalmente para o recrutamento de polimorfonucleares no 2º dia após estímulo, também ocorre durante a infecção por *P.b.* e no pulmão, um sítio inflamatório diferente do utilizado na seleção deste fenótipo, animais das sublinhagens AIR homozigotos para os alelos R e S do gene *Slc11a1* foram submetidos à infecção intratraqueal por 1×10^6 leveduras de *P.b.* e o número absoluto de neutrófilos determinado como descrito em materiais e métodos. Avaliamos também o recrutamento de células mononucleares no 2º e 7º dia de infecção e o de neutrófilos no 7º dia. Desta forma, avaliamos a cinética de migração celular nestes períodos para o espaço bronco-alveolar dos animais inoculados *i.t.* com *P. brasiliensis* (Figura 1).

A Figura 1 A mostra o influxo de neutrófilos para o espaço broncoalveolar no 2º e 7º dia de infecção pelo fungo. No 2º dia, a infecção induziu maior migração de neutrófilos nas sublinhagens AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} quando comparadas com as sublinhagens AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} respectivamente, evidenciando a diferença no fenótipo de recrutamento celular interlinhagens selecionado originalmente no tecido subcutâneo. No fenótipo da AIRmax, pudemos observar o alelo R exercendo um significativo aumento no parâmetro de infiltrado neutrofílico no 2º dia. Com 7 dias de infecção, a diferença interlinhagens diminuiu e houve diferença estatisticamente significativa entre a sublinhagem AIRmax^{RR} e AIRmin^{RR}.

O influxo de células mononucleares (Figura 1 B) em resposta a leveduras de *P. brasiliensis* nas diferentes sublinhagens manteve-se nos patamares do grupo controle

no 2º dia após infecção. No 7º dia, o recrutamento de células mononucleares para o espaço bronco-alveolar foi significativo nas sublinhagens AIRmax^{RR} e AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} infectadas quando comparado com o grupo controle. Não pudemos verificar assim, um aumento de células mononucleares nos animais AIRmax^{SS} no 7º dia. Desta forma, o alelo R determinou um aumento e o alelo S uma diminuição no influxo de mononucleares nos AIRmax (estatisticamente significante), conferindo um maior influxo dessas células na sublinhagem AIRmax^{RR} quando comparadas a sublinhagem AIRmin^{RR}, e um menor influxo nos AIRmax^{SS} quando comparadas a sublinhagem AIRmin^{SS}.

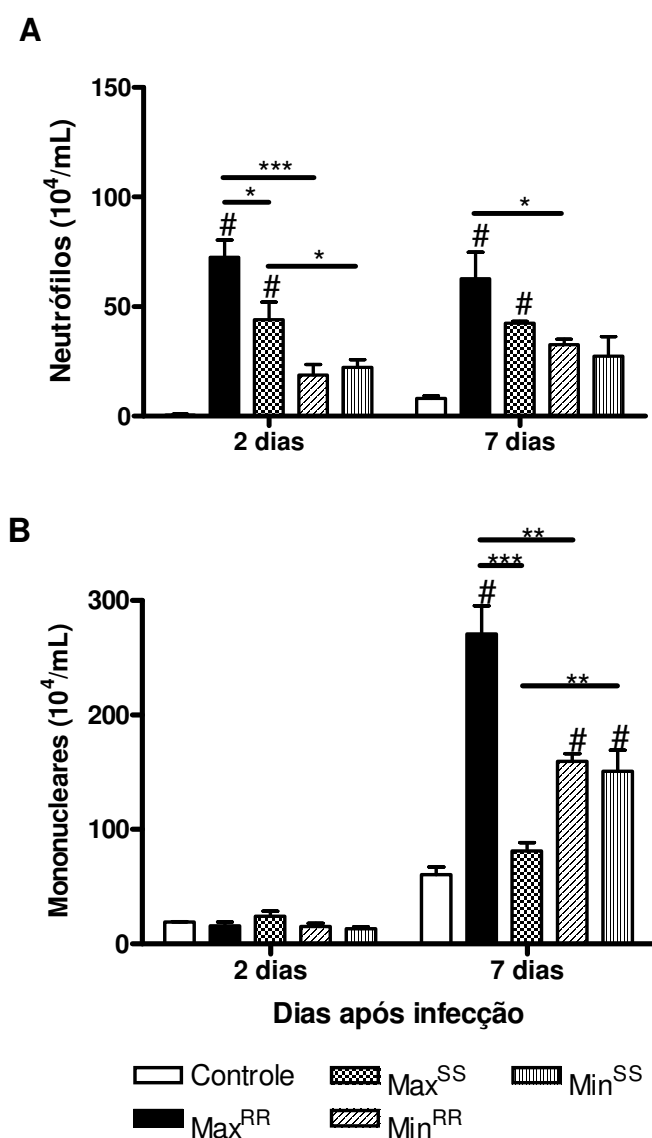


Figura 1. Número absoluto de neutrófilos (A) e células mononucleares (B) no BAL de camundongos inoculados *i.t.* com 10^6 células leveduriformes de *P. brasiliensis*, ou injetados com PBS (grupo controle). Os pulmões dos camundongos foram lavados com PBS 2 e 7 dias após infecção, e as suspensões de células foram preparadas em citocentrífuga e submetidas à coloração por panótico. O número absoluto de células foi calculado como descrito em materiais e métodos. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; #Diferença estatística *versus* respectivo Controle. (n = 9)

4.2. Efeito do gene *Slc11a1* na multiplicação de leveduras nos pulmões de animais infectados por *P. brasiliensis*

Nossos resultados demonstraram através da contagem do número de UFC, que o número de leveduras nos pulmões dos animais AIRmin^{RR} foi maior nos dois períodos analisados quando comparado as outras sublinhagens. No sétimo dia de infecção, também houve uma maior recuperação de leveduras dos pulmões de animais AIRmin^{SS} em relação aos AIRmax^{SS}.

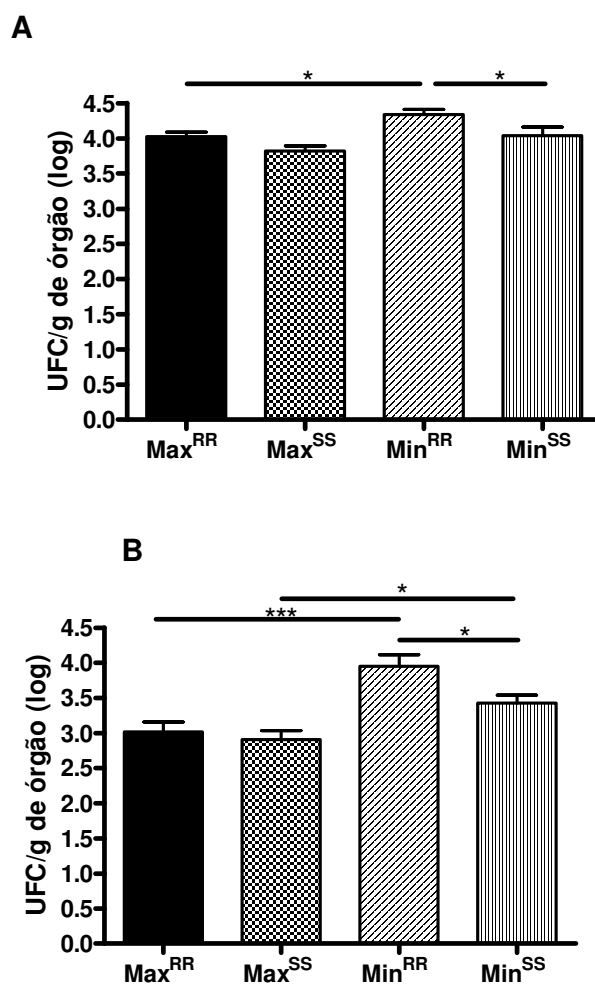


Figura 2. Número de leveduras viáveis (UFC) recuperadas a partir de tecido pulmonar 2 (A) e 7 (B) dias após infecção com 10^6 células leveduriformes. Dados são expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. (n = 9)

4.3. Concentração de óxido nítrico em sobrenadante de homogenatos de pulmões obtidos de animais infectados por *P. brasiliensis*

Investigamos também alguns parâmetros imunológicos como a produção de óxido nítrico, procurando assim, relacionar a multiplicação do fungo no pulmão com a produção deste metabólito. A produção de NO_2^- foi avaliada após 2, 7 e 14 dias de infecção. Detectamos um aumento no nível deste metabólito nos animais AIRmax^{SS} no segundo dia de infecção quando comparado ao respectivo grupo controle. Entre as sublinhagens infectadas com o fungo não houve diferença estatística.

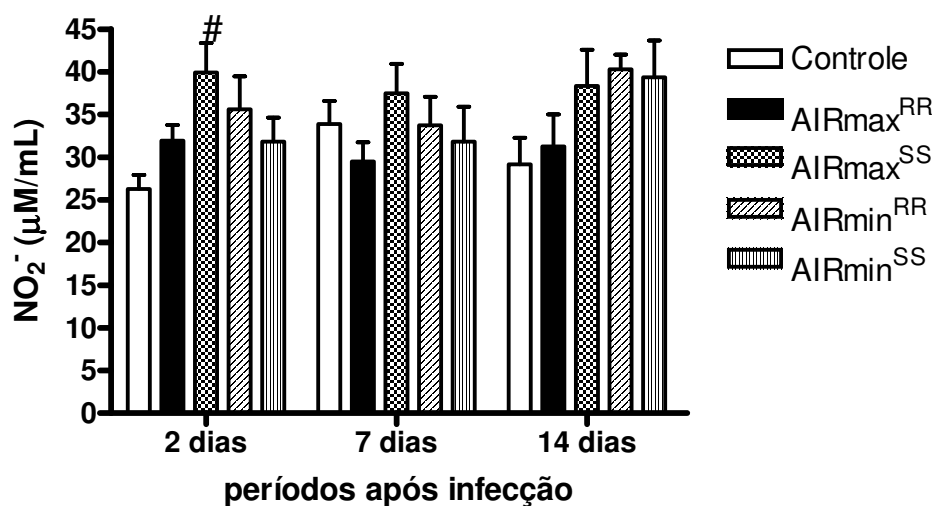


Figura 3. Produção de NO_2^- nos sobrenadantes do homogenato pulmonar de animais não-infectados (Controle) e animais infectados com 10^6 células leveduriformes de *P. brasiliensis*. Após 2, 7 e 14 dias de infecção os pulmões foram retirados, homogeneizados em 2 mL de RPMI-C e centrifugados. O NO_2^- foi determinado nos sobrenadantes através da reação de Griess. Dados são expressos como média $\pm$ EPM. [#]Diferença estatística *versus* respectivo Controle. (n = 9)

4.4. Produção de citocinas em sobrenadante de homogenatos de pulmões obtidos de animais infectados por *P. brasiliensis*

O perfil de produção de IL-1, IL-6, IL-4, IL-10, IL-12, TNF α e IFN- γ foi avaliado por ELISA após 2, 7 e 14 dias de infecção por *P. brasiliensis* em homogenatos de pulmões.

4.4.1. Produção de IL-1 e IL-6

As quatro linhagens, quando infectadas, tiveram uma alta produção de IL-1 no período mais agudo analisado, evidenciando o *P. brasiliensis* como um forte estímulo para a produção desta citocina no pulmão. Após 7 dias de infecção, a linhagem AIRmax^{RR} diminuiu a produção de IL-1 para nível basal, tendo o mesmo padrão de produção desta citocina aos 14 dias de infecção. Uma baixa significativa também foi encontrada na sublinhagem AIRmax^{SS} neste último período (Figura 4 A).

Na Figura 4 B, são mostrados os resultados referentes à quantificação de IL-6. Com dois dias de infecção, o alelo S do gene *Slc11a1* conferiu uma maior capacidade de produção de IL-6 nos animais com background da AIRmin (AIRmin^{SS}), o que não ocorreu entre as sublinhagens com o background AIRmax não havendo diferença entre elas. Nos pulmões dos animais das sublinhagens AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}, foi detectado uma maior produção de IL-6 que os AIRmin^{RR} e menor que os AIRmin^{SS}, tendo valores intermediários. Nos outros períodos analisados não houve modulação da produção desta citocina, apresentando uma produção basal em todos os grupos.

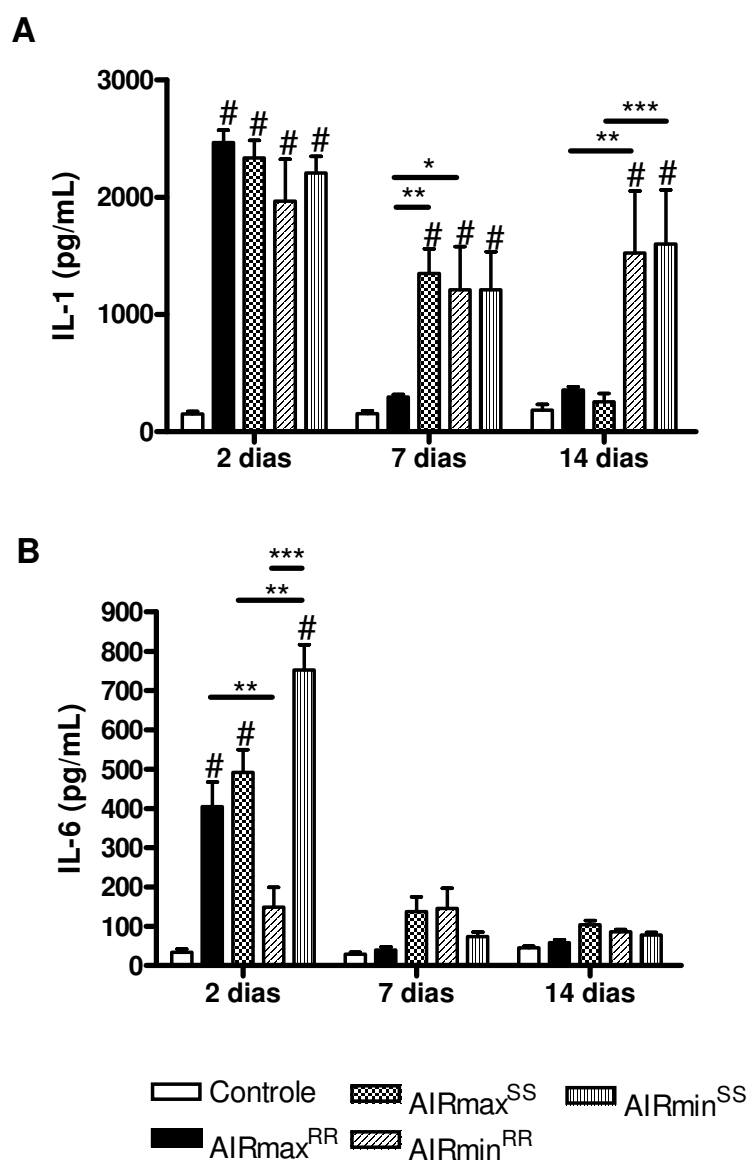


Figura 4. Determinação de IL-1 (A) e IL-6 (B) nos sobrenadantes do homogeneizado pulmonar de animais não-infectados (Controle) e animais infectados com 10^6 leveduras viáveis de *P. brasiliensis*. Após 2, 7 e 14 dias de infecção os pulmões foram retirados, homogeneizados em 2 mL de RPMI-C e centrifugados. As citocinas foram determinadas no sobrenadante através de ELISA. Dados são expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; #Diferença estatística *versus* respectivo Controle. (n = 9)

4.4.2. Produção de IL-4 e IL-10

Os níveis de IL-4 foram baixos em todos os períodos analisados (Figura 5 A). Comparando os animais infectados com os controles em todos os períodos estudados, observamos que somente nos AIRmin^{RR} e no segundo dia de infecção, a IL-4 apresentou-se aumentada. Esta sublinhagem e também a AIRmax^{SS} produziram níveis mais elevados de IL-4 que a AIRmax^{RR} neste período. Diferenças não foram encontradas com 7 e 14 dias pós-infecção.

Pode-se observar na Figura 5 B, que no segundo dia de infecção os níveis de IL-10 nos pulmões de animais AIRmax^{RR} são mais baixos que no grupo controle e nas outras sublinhagens infectadas. Já no sétimo dia pós-infecção, a concentração de IL-10 foi significativamente mais alta em AIRmin^{RR} em comparação as outras sublinhagens infectadas. No décimo quarto dia, as duas sublinhagens AIRmin (AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}) tiveram uma maior produção desta citocina que o grupo controle e as duas sublinhagens AIRmax (AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}) sugerindo que neste período o fenótipo selecionado para a AIR modula a produção de IL-10.

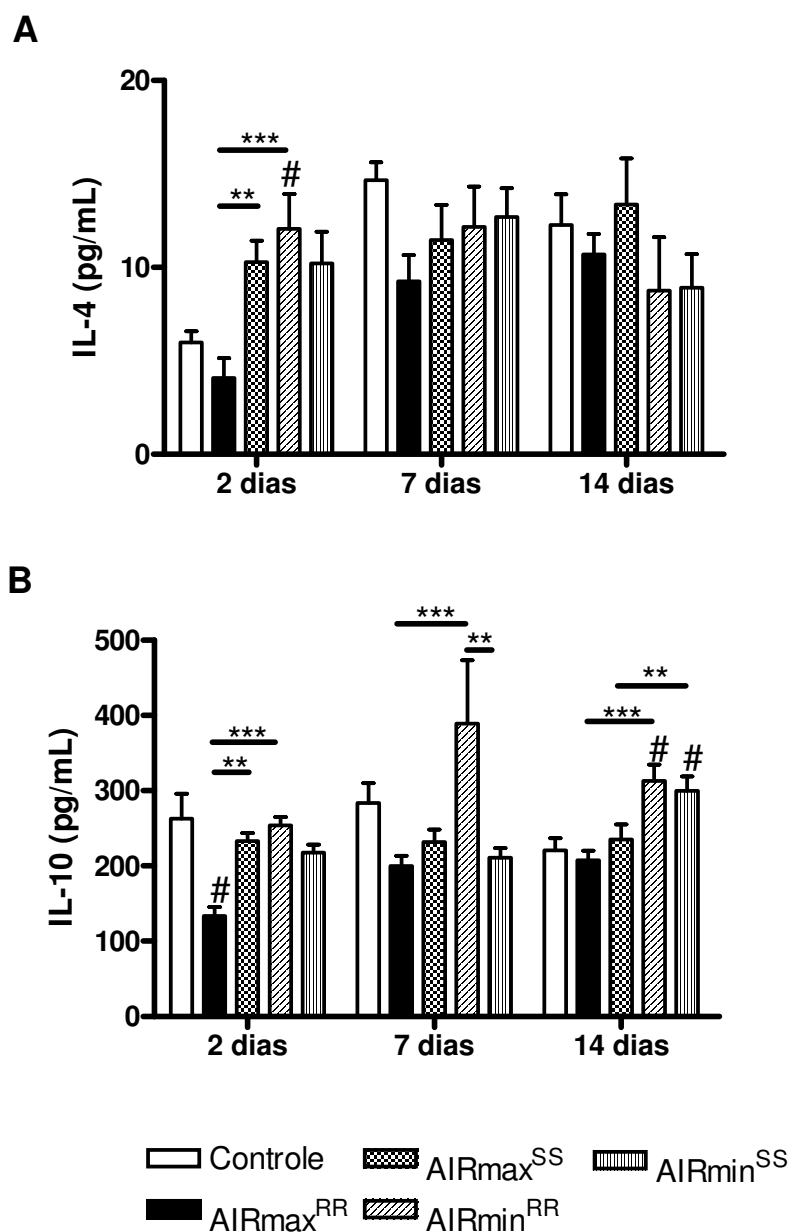


Figura 5. Determinação de IL-4 (A) e IL-10 (B) nos sobrenadantes do homogeneizado pulmonar de animais não-infectados (Controle) e animais infectados com 10^6 leveduras viáveis de *P. brasiliensis*. Após 2, 7 e 14 dias de infecção os pulmões foram retirados, homogeneizados em 2 mL de RPMI-C e centrifugados. As citocinas foram determinadas no sobrenadante através de ELISA. Dados são expressos como média $\pm$ EPM. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; #Diferença estatística versus respectivo Controle. (n = 9)

4.4.3. Produção de IL-12, IFN- γ e TNF- α

A Figura 6 A mostra os níveis de IL-12 em homogenatos de pulmões. Um possível papel regulatório do alelo S do gene *Slc11a1* na síntese de IL-12 durante a paracoccidiodomicose é evidenciado com nossos resultados onde, um aumento no nível desta citocina foi detectado nas sublinhagens AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} no 1º e 7º dia de infecção, quando comparados respectivamente a AIRmax^{RR} e AIRmin^{RR} e ao respectivo grupo controle. No 14º dia, esse efeito modulador do gene não pode ser observado já que não houve diferença estatística entre os grupos infectados. Somente foi detectado uma produção elevada de IL-12 em AIRmax^{SS} e AIRmin^{RR} comparado ao grupo controle.

O IFN- γ exerce um efeito protetor contra a paracoccidiodomicose, porém estas sublinhagens apresentaram níveis basais desta citocina nos pulmões em todos períodos analisados como mostrado na Figura 6 B. A única diferença estatística observada foi uma maior produção de IFN- γ nos AIRmax^{RR} que nos AIRmin^{RR} no 2º dia de infecção.

Nos animais AIRmax^{SS} e AIRmin^{RR}, a detecção de TNF- α no 2º dia pós-infecção foi significativamente maior que no grupo controle. Esta produção elevada de TNF- α nos animais AIRmax^{SS} foi observada também em relação aos animais AIRmax^{RR} e AIRmin^{SS} e a produção elevada desta citocina nos animais AIRmin^{RR} também foi observada em relação aos animais AIRmin^{SS}. Já no 7º dia de infecção, a produção elevada desta citocina foi observada nos animais AIRmin^{RR} quando comparado com os AIRmax^{RR} e AIRmin^{SS}. No 14º dia não foi observado diferença estatística entre os grupos analisados (Figura 6 C)

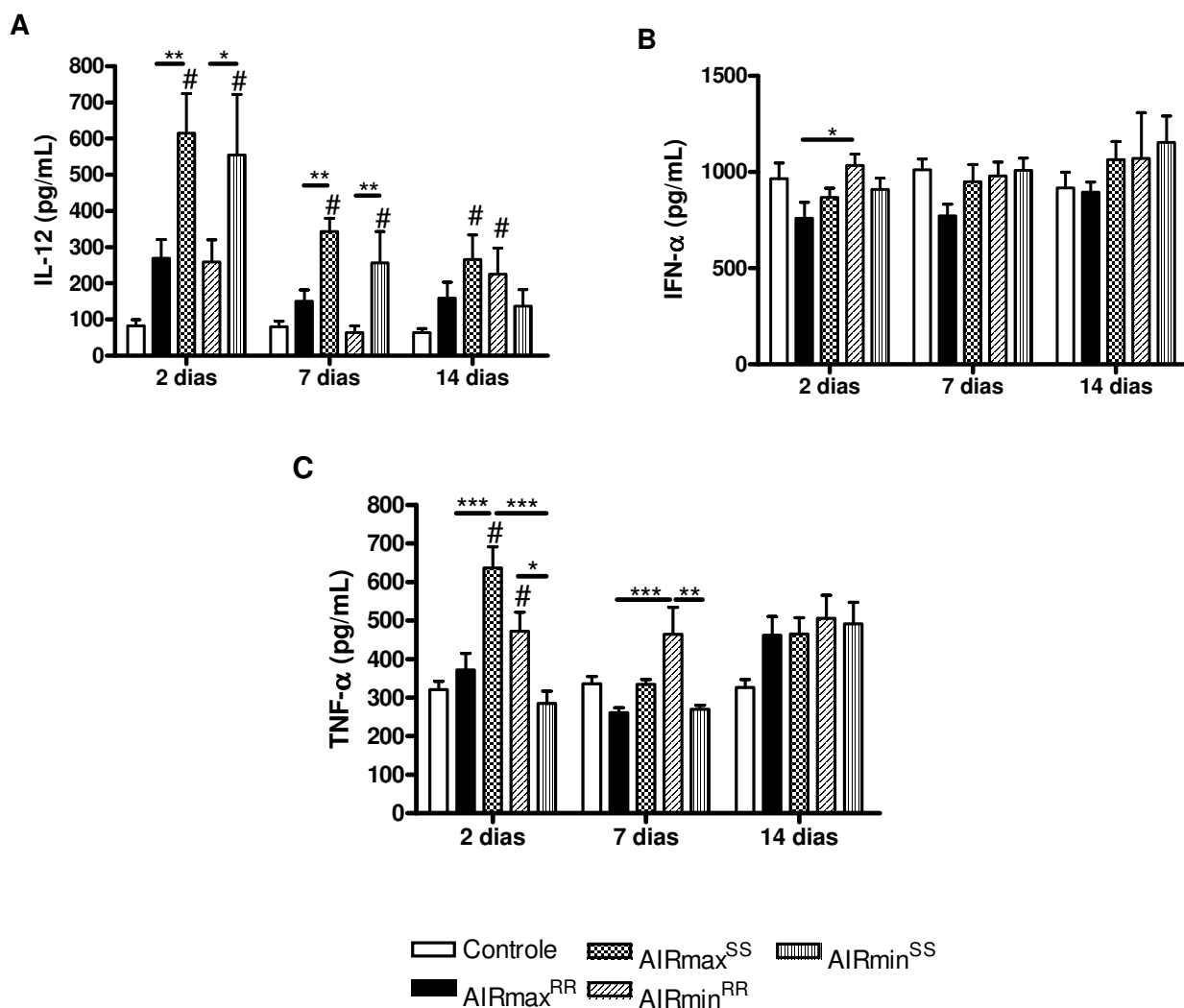


Figura 6. Determinação de IL-12 (A), IFN- γ (B) e TNF- α (C) nos sobrenadantes do homogenato pulmonar de animais não-infectados (Controle) e animais infectados com 10^6 leveduras viáveis de *P. brasiliensis*. Após 2, 7 e 14 dias de infecção os pulmões foram retirados, homogeneizados em 2 mL de RPMI-C e centrifugados. As citocinas foram determinadas no sobrenadante através de ELISA. Dados são expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; #Diferença estatística versus respectivo Controle. (n = 9)

4.5. Produção de óxido nítrico por células totais de baço

Analizamos a produção de NO_2^- por células totais de baço cultivadas por 48h após 7 e 14 dias de infecção por *P. brasiliensis* (Figura 7). O NO_2^- foi detectado em valores muito baixos no sobrenadante de células com ou sem o estímulo da Con A, porém significativa elevação da produção deste metabólito foi detectado aos 14 dias pós-infecção na sublinhagem AIRmax^{RR} em comparação com a sublinhagem AIRmax^{SS} sob o estímulo da Con A (Figura 7 B).

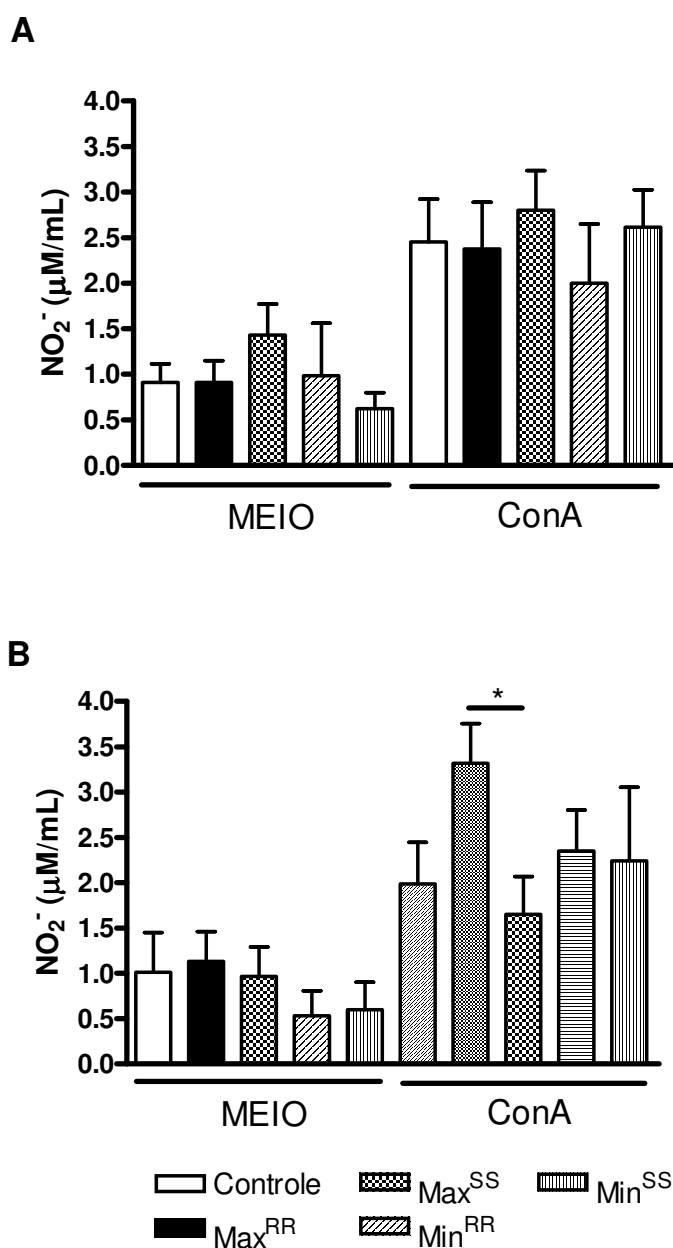


Figura 7. Produção de NO₂⁻ por células totais de baço, obtidas de animais não infectados (Controle) e animais infectados com 10⁶ leveduras viáveis de *P. brasiliensis*. Após 7 (A), e 14 (B) dias de infecção, 1x10⁶ células/0,5 mL foram incubadas com RPMI-C (Meio) ou RPMI-C + Con A (10 μL/poço). Após 48 horas, os sobrenadantes de cultura foram retirados e o NO₂⁻ determinado através da reação de Griess. Dados são expressos como média ± EPM. * $p < 0,05$. (n = 9)

4.6. Produção de citocinas por células totais de baço

Analizamos também a produção de IL-1, IL-4, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ por células totais de baço cultivadas por 48h após 7 e 14 dias de infecção por *P. brasiliensis*.

4.6.1 Produção de IL-1

A análise estatística dos dados mostrou que sob estímulo da Con A as células totais do baço de animais AIRmax^{SS} apresentaram níveis mais elevados de IL-1 que as células de animais AIRmin^{SS} com 7 dias de infecção (Figura 8 A). Apesar de pequena variação na produção de IL-1 entre as sublinhagens, não foram detectadas outras diferenças significativas na secreção desta citocina (Figura 8 A, B).

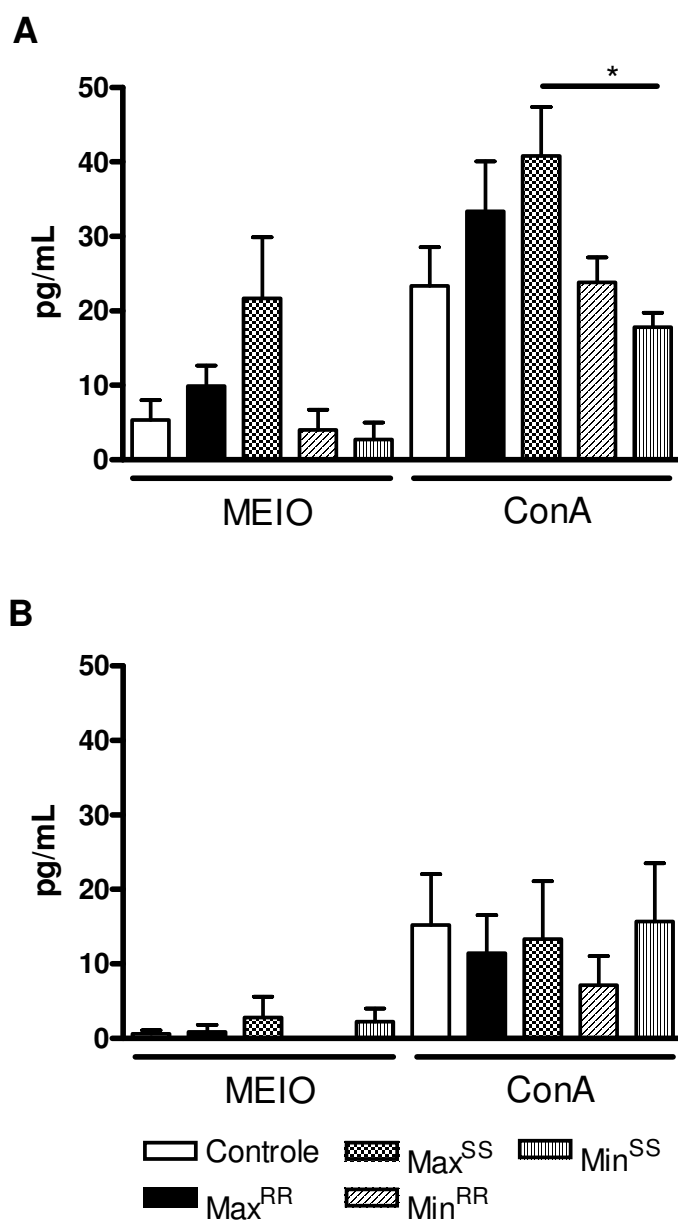


Figura 8. Produção de IL-1 por células totais de baço, obtidas de animais não infectados (Controle) e animais infectados com 10^6 leveduras viáveis de *P. brasiliensis*. Após 7 (A), e 14 (B) dias de infecção, 1×10^6 células/0,5 mL foram incubadas com RPMI-C (Meio) ou RPMI-C + Con A (10 μ L/poço). Após 48 horas, os sobrenadantes de cultura foram retirados e a IL-1 determinada por ELISA. Dados são expressos como média $\pm$ EPM.* $p < 0,05$. (n = 9)

4.6.2 Produção de IL-4 e IL-10

A secreção de IL-4 por células do baço sem o estímulo *in vitro* ocorreu em níveis muito baixos. Sob o estímulo da Con A houve aumento da produção desta citocina evidenciado principalmente no 14º dia. Entre os animais infectados e o grupo controle não observamos diferença nos dois períodos analisados, entretanto, diferença significativa foi obtida entre os animais AIRmin^{SS} e AIRmin^{RR} no 7º dia pós-infecção (Figura 9 A, B).

A análise da Figura 9 C e 9 D mostra que as células totais do baço sem a presença de um estímulo liberaram um baixo nível de IL-10. Porém na cultura de células com estímulo da Con A, houve uma alta produção da citocina analisada mostrando uma alta capacidade destas diferentes sublinhagens em produzir IL-10. Na figura 9 D é mostrado aos 14 dias de infecção um decréscimo na produção de IL-10 no grupo AIRmax^{SS} sob estímulo quando comparado ao grupo AIRmax^{RR} também estimulado.

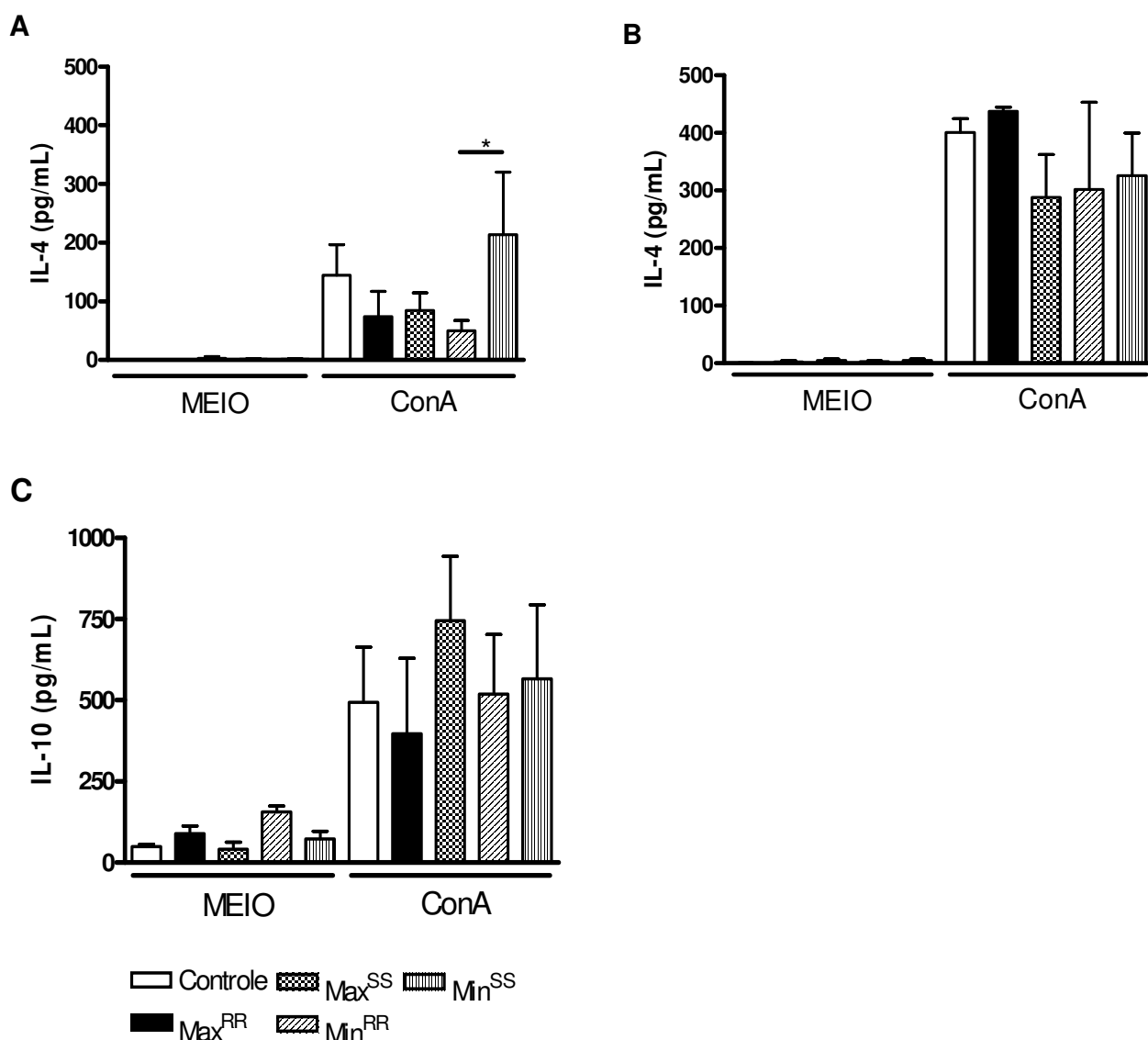


Figura 9. Produção de IL-4 (A e B) e IL-10 (C e D) por células totais de baço, obtidas de animais não infectados (Controle) e animais infectados com 10^6 leveduras viáveis de *P. brasiliensis*. Após 7 (A e C), e 14 (B e D) dias de infecção, 1×10^6 células/0,5 mL foram incubadas com RPMI-C (Meio) ou RPMI-C + Con A (10 μ L/poço). Após 48 horas, os sobrenadantes de cultura foram retirados e a IL-4 determinada por ELISA. Dados são expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; #Diferença estatística versus respectivo Controle. (n = 9)

4.6.3 Produção de IL-12, IFN- γ e TNF- α

Pode-se observar na figura 10 A uma clara participação do alelo R do gene *Slc11a1* na produção de IL-12 tanto no fenótipo da AIRmax quanto no fenótipo da AIRmin no 7º dia. As sublinhagens portadoras do alelo R mostraram uma maior capacidade em produzir IL-12 na cultura com e sem o estímulo da Con A do que as sublinhagens portadoras do alelo S e o grupo controle. Outra diferença observada foi entre AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} sob estímulo, com este último grupo sintetizando baixo nível de IL-12 no 7º dia. No 14º dia a síntese de IL-12 foi baixa em todas sublinhagens analisadas, estimuladas ou não (Figura 10 B).

Nos dois períodos analisados, os níveis de IFN- γ foram baixos e semelhantes no sobrenadante de células esplênicas sem estímulo em todos grupos estudados (Figura 10 C, D) . Nos sobrenadantes acrescidos de Con A, houve uma maior detecção de IFN- γ mas não ocorreu diferença estatisticamente significativa no dia 7 após infecção (Figura 10 C). No dia 14 (Figura 10 D), o estímulo da Con A levou ao aumento da produção desta citocina na linhagem AIRmax^{RR} comparando com o grupo controle e os grupos AIRmax^{SS} e AIRmin^{RR} infectados, e também foi observado um aumento de IFN- γ na linhagem AIRmin^{SS} em relação ao respectivo controle e ao grupo AIRmin^{RR}.

As concentrações médias de TNF- α não sofreram alterações significativas em todos os grupos estudados no 7º dia (Figura 10 E). Em contraste, as células esplênicas apresentaram uma tendência em diminuir a produção de TNF- α nos grupos infectados quando comparados aos seus respectivos controles no 14º dia. Isto foi

significativamente mostrado no grupo AIRmin^{SS} não estimulado e em todos os grupos estimulados com a Con A infectados com *P. brasiliensis* (Figura 10 F).

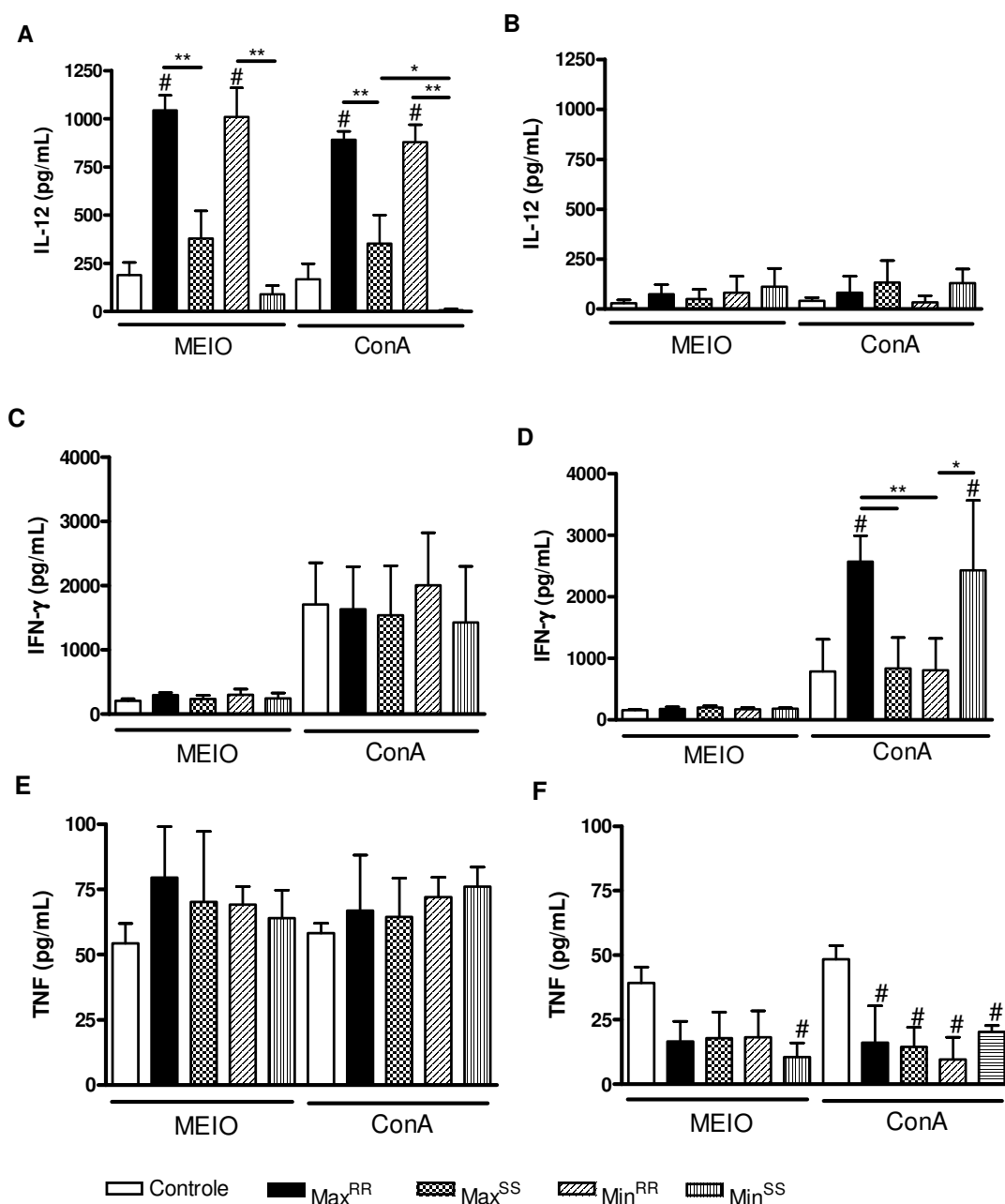


Figura 10. Produção de IL-12 (A e B), IFN- γ (C e D) e TNF (E e F) por células totais de baço, obtidas de animais não infectados (Controle) e animais infectados com 10^6 leveduras viáveis de *P. brasiliensis*. Após 7 (A, C e E), e 14 (B, D e F) dias de infecção, 1×10^6 células/0,5 mL foram incubadas com RPMI-C (Meio) ou RPMI-C + Con A (10 μ L/poço). Após 48 horas, os sobrenadantes de cultura foram retirados e a IL-12 determinada por ELISA. Dados são expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; #Diferença estatística *versus* respectivo Controle. (n = 9)

5 – DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho, demonstram a participação do gene *Slc11a1* na modulação da reação inflamatória aguda (AIR) e parâmetros imunológicos durante a paracoccidiodomicose em camundongos geneticamente selecionados, sugerindo que a região cromossômica onde está localizado o gene *Slc11a1* seja um *locus* de característica quantitativa (QTL) regulador da resposta inflamatória aguda e da sensibilidade à paracoccidiodomicose pulmonar.

Nosso primeiro passo foi determinar a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório buscando caracterizar uma diferença neste fenótipo selecionado originalmente com microesferas de poliacrilamida (Biogel) no tecido subcutâneo. Os resultados demonstraram que a infecção i.t. por *P. brasiliensis* induziu uma reação inflamatória local, com predominância de neutrófilos no 2º dia de infecção, seguido de influxo de células mononucleares no 7º dia de infecção. As diferenças no fenótipo para migração celular no 2º dia foi mantida segundo a seleção original, havendo também uma diferença entre AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} com um maior recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório na sublinhagem AIRmax^{RR}. Estes resultados indicam que o alelo R do gene *Slc11a1* estaria interagindo com os QTL de máxima reação inflamatória aguda, recrutando maior número de neutrófilos para o local da injúria.

Estudos de análise de co-segregação dos alelos do gene *Slc11a1* com os fenótipos da resposta inflamatória aguda (Borrego et al., 2006; Peters et al., 2006), corroboram com nossos resultados referentes as linhagens AIRmax, sugerindo que a região cromossômica onde o gene *Slc11a1* está localizado represente um QTL

modulador da resposta inflamatória aguda, sendo o próprio *Slc11a1* um possível gene candidato.

Outro resultado importante obtido, foi quanto à diferença de células mononucleares presentes nos pulmões dos animais AIRmax aos 7 dias de infecção, com o alelo R determinando uma maior presença destas células no sítio inflamatório. Este dado também sugere que a região cromossômica onde o gene *Slc11a1* está localizado, seja moduladora da migração de células mononucleares para o pulmão em períodos menos precoces de infecção por *P.brasiliensis*.

A infecção nas micoses sistêmicas normalmente ocorre através das vias respiratórias (Bustamante et al., 1985; Restrepo et al., 1986; Miller et al., 1991) de modo que uma resposta efetiva no pulmão seria importante para a defesa do hospedeiro.

Os leucócitos polimorfonucleares são células imunoprotetoras na paracoccidioidomicose pulmonar, mas a sua ação depende do padrão genético do hospedeiro. Estas células participam muito ativamente dos mecanismos protetores da imunidade natural, mas não na fase de imunidade adquirida contra o *P. brasiliensis* (Pina et al., 2006). Alguns estudos têm reforçado a idéia de que os neutrófilos exercem um importante papel efetor principalmente durante os estágios iniciais da infecção, uma vez que estas células desempenham atividade fungicida e fungistática eficiente após ativação por várias citocinas (Kurita et al., 1999a; kurita et al., 1999b; Rodrigues et al., 2003).

Mais tardiamente que os neutrófilos, ocorre a migração de macrófagos para o tecido afetado, tendo o seu número aumentado em virtude da migração de monócitos do sangue para o local. Sendo células centrais da imunidade natural e adquirida, os macrófagos são responsáveis por numerosos processos imunológicos, metabólicos e

inflamatórios, tanto em condições normais como patológica. Além de suas funções primárias como a fagocitose, os macrófagos podem secretar vários produtos, incluindo citocinas que mobilizam outras células residentes no tecido (Gordon, 1998). Como os neutrófilos, macrófagos ativados são apresentados como células hábeis em matar ou inibir o crescimento de *P. brasiliensis* (Brummer et al., 1988; Jimenez & Murphy, 1984). *In vivo*, acredita-se que os macrófagos e linfócitos sejam as principais células efetoras envolvidas no controle da doença (Myiaji & Nishmura, 1983; Burguer et al., 1996).

Nosso próximo passo foi determinar as UFC nos pulmões dos animais, 2 e 7 dias após a infecção. O maior número de leveduras foi recuperado dos animais AIRmin^{RR}, ficando mais evidente no 7º dia onde pode ser verificado também um aumento no número de UFC recuperados nos animais AIRmin^{SS}. As sublinhagens AIRmax foram mais eficientes na contenção do processo infeccioso. Este resultado sugere que a presença do alelo *Slc11a1* R leva a uma deficiência na atividade fungicida ocasionando em um maior número de UFC no pulmão dos animais, porém a sua ação no processo de multiplicação do fungo na linhagem AIRmax^{RR} pode ter sido compensada por um maior aporte de neutrófilos no sítio inflamatório durante o início da infecção, o que não foi verificado nos animais AIRmin.

Trabalhos anteriores abordando as linhagens AIRmax e AIRmin mostraram semelhanças funcionais e no estágio de maturação dos neutrófilos (Ribeiro et al., 2003). Apesar destas semelhanças funcionais dos neutrófilos, a linhagem AIRmax apresentou maior resistência à infecção experimental por *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes*, portanto, não estaria associada a uma melhor capacidade funcional de suas células inflamatórias, mas sim ao maior aporte de neutrófilos nos

sítios de proliferação bacteriana, levando a um controle mais efetivo deste crescimento (Araújo et al., 1998).

Ao contrário do esperado, a presença do alelo R do gene *Slc11a1* interagindo com os QTL da AIR parece determinar uma maior suscetibilidade ao *P. brasiliensis*. Resultados obtidos por Jiménez et al. (2006) mostraram que macrófagos derivados de camundongos suscetíveis B10.A que expressam a proteína *Slc11a1* (B10R), fagocitam uma maior porcentagem de conídios de *P. brasiliensis* que macrófagos que não expressam a proteína *Slc11a1* (B10S). Em camundongos, a mutação ocorrida no gene *Slc11a1* tornando-o funcionalmente nulo, confere suscetibilidade a patógenos como *Candida albicans* (Puliti et al., 1995), *Toxoplasma gondii* (Blackwell et al., 1994) e a uma variedade de bactérias intracelulares, mas não a *Mycobacterium tuberculosis* (Chackerian & Behar, 2003) e *Rhodococcus equi* (Cohen et al., 2004).

A influência do polimorfismo *Slc11a1* na suscetibilidade a infecções não é tão evidente em linhagens heterogêneas como é em camundongos *inbred* (Hill, A. V., 1996; Liu et al., 1995), o que poderia explicar a diferença no padrão de resposta desse gene em nosso estudo e também o mascaramento da multiplicação de leveduras no pulmão ocasionado pelo alelo R no *background* AIRmax. Isto não é surpreendente desde que a heterogeneidade em populações humanas torna muito difícil a detecção do efeito do gene em casos de características complexas, provavelmente incluindo resistência a infecções.

Está bem documentado que os reativos intermediários do nitrogênio têm efeito antimicrobiano contra vários tipos de infecções bacterianas e parasitárias (Green & Nacy, 1993; Fang, 1997; MacMicking et al., 1997), incluindo o *P. brasiliensis* (González

et al., 2000). Porém a alta produção de NO foi associada à suscetibilidade em camundongos B10.A (Nascimento et al., 2002). Apesar da importância dos intermediários do nitrogênio na infecção por *P. brasiliensis*, houve um leve aumento de NO nos pulmões dos animais AIRmax^{SS} no 2º dia pós-infecção quando comparado ao controle mas a produção deste metabólito mostrou-se muito parecida entre as sublinhagens e em um nível basal de produção, indicando que o NO não é o agente modificador do fenótipo de resistência interlinhagens. Isto pode ser explicado por uma baixa produção de IFN- γ detectado nos pulmões das diferentes sublinhagens. Nossos resultados foram condizentes com um estudo abordando a infecção por *Trypanossoma cruzi* nas linhagens selecionadas segundo a AIR, onde a produção de NO foi equivalente entre as linhagens AIRmax e AIRmin (Vorrano, 2001). Como o principal mecanismo dos neutrófilos para matar o *P. brasiliensis* é dependente de oxigênio (Brummer, E. 1994), nós podemos supor que a atividade fungicida *in vivo* possa ocorrer principalmente devido à produção de reativos intermediários do oxigênio durante a fase inicial do processo de contenção à multiplicação do fungo, principalmente nas linhagens AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}, participando efetivamente no fenótipo AIRmax.

Quando estimulamos células totais de baço com ConA *in vitro*, pudemos observar no 14º dia de infecção uma maior capacidade de liberação de NO nos sobrenadantes do grupo AIRmax^{RR} em relação ao grupo AIRmax^{SS}. Sabidamente o alelo R aumenta a produção de NO em macrófagos (Jiménez et al., 2006; Blackwell et al., 2000), o que pode explicar a maior produção nas células detentores do alelo R provenientes de animais com background AIRmax e consequentemente colaborando para a atividade fungicida dos fagócitos durante uma possível disseminação do fungo.

Para estudarmos a participação do gene *Slc11a1* no padrão de resposta imune ao *P.brasiliensis* em camundongos AIR, analisamos citocinas em homogenatos de pulmões e em cultura de células totais de baço.

O início da infecção nos pulmões foi marcado por alta produção de IL-1 em todas as sublinhagens analisadas e IL-6 nas sublinhagens AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS}, mostrando que o *P.brasiliensis* é um forte estímulo para a síntese dessas citocinas pró-inflamatórias no pulmão. Em culturas de células do baço a produção de IL-1 foi detectada a um baixo nível.

Estas citocinas são fundamentais para ativação de células endoteliais e de leucócitos sanguíneos resultando no aumento da expressão de moléculas de adesão que favorecem o recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamado (Moser et al., 1989; Issekutz & Issekutz, 1993). Gonzalez et al. (2003), mostraram que camundongos BALB/c respondem com recrutamento de leucócitos para o pulmão e um aumento no nível de IL-1 e IL-6 durante estágios precoces de infecção por *P. brasiliensis*, o que corrobora com nossos resultados. Outros fungos como *Histoplasma capsulatum* e *Aspergillus fumigatus*, também induzem a liberação de IL-1 e IL-6 durante a infecção, a qual tem um importante papel na atividade microbicida de neutrófilos (Schelenz et al., 1999; Kurita et al., 2000). Apesar do fungo causar uma alta produção destas citocinas, elas não foram condizentes com o fenótipo diferenciado para migração celular entre as sublinhagens, indicando que a migração de células para o pulmão é dependente também de outros fatores quimiotáticos. A menor produção de IL-6 nos pulmões dos animais AIRmin^{RR} infectados, mostra a influência do alelo R com os QTL da AIRmin induzindo uma menor produção desta citocina na paracoccidiodomicose murina. No modelo de artrite induzido por pristane, um aumento nas células esplênicas secretoras

de IL-6 foi observado aos 20 dias após o estímulo por pristane nas sublinhagens AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} em comparação com as AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} (Peters et al., 2006). Em camundongos congênicos portadores do alelo R e S do gene *Slc11a1* infectados com *Salmonelle dublin* não houve diferença na produção de IL-6 e o mesmo foi observado para a produção de IL-1 (Eckmann et al., 1996). Nossos resultados referentes ao 7º e 14º dia após a infecção mostraram que houve apenas produção basal de IL-6 e a produção de IL-1 foi diminuída na sublinhagem AIRmax^{RR} a partir do 7º dia e nas linhagens AIRmax^{SS} no 14º dia. Esta queda na síntese de IL-1 pode estar relacionada a um melhor controle da infecção nas linhagens AIRmax e consequentemente diminuindo o estímulo para a sua produção.

Ao investigarmos as citocinas de perfil Th2, verificamos no 2º dia de infecção que a IL-4 e IL-10 em homogeneizado pulmonar apresentaram-se diminuídas na sublinhagem AIRmax^{RR} em relação as outras sublinhagens infectadas. No 7º dia pós-infecção, o nível de IL-10 foi maior nos animais AIRmin^{RR} e no 14º dia nos AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}. No sobrenadante de células totais do baço, pudemos notar uma baixa produção dessas citocinas, mas o estímulo da Con A mostrou que essas células são aptas a produzi-las. Somente foi observado maior produção de IL-4 na sublinhagem AIRmin^{SS} aos 7 dias de infecção, e menor produção de IL-10 na sublinhagem AIRmax^{SS} aos 14 dias se comparadas aos outros grupos infectados quando as células foram estimuladas com Con A.

As citocinas anti-inflamatórias como a IL-4 e a IL-10 desempenham atividade desativadora de macrófagos e a sua produção desbalanceada leva a infecções graves, principalmente aquelas produzidas por patógenos intracelulares (Mosmann et al., 1991; Scott et al., 1998; Hoft et al., 2000). Interessantemente, após estímulo com

Mycobacterium tuberculosis, macrófagos de camundongos *Slc11a1* S tiveram um aumento da produção de IL-10 comparado com macrófagos de camundongos resistentes *Slc11a1* R (M. Rojas et al., 1999). Kashino et al. (2000), observaram altos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10 em homogenatos de pulmões em camundongos B10.A suscetíveis a paracoccidiodomicose. Pina et al. (2004) demonstraram que a deficiência de IL-4 determinada geneticamente pode exercer um papel protetor na paracoccidiodomicose pulmonar. Em camundongos deficientes de IL-4 infectados com *P. brasiliensis* ou *Schistosoma mansoni*, também foi observado um maior número de leucócitos polimorfonucleares nas lesões causadas por estes microrganismos (Pina et al., 2004; La Flamme et al., 2001). Com base nesses trabalhos podemos sugerir que a detecção de níveis mais baixos de IL-4 nos homogenatos de pulmões dos animais AIRmax^{RR} é em conjunto com outros fatores, responsável pelo maior número de neutrófilos nos pulmões de animais dessa linhagem. Os dados até agora mostrados nos permite dizer também, que a maior produção de IL-4, IL-10 e a menor de IL-6 podem estar relacionadas a uma maior multiplicação do fungo na sublinhagem AIRmin^{RR} desfavorecendo o *clearance* fúngico.

A produção de algumas citocinas de perfil Th1 foram avaliadas durante o processo infeccioso. Nossos resultados demonstraram que a IL-12 foi produzida em níveis mais elevados em um período precoce da infecção e mostra claramente o alelo *Slc11a1* S modulando positivamente a produção de IL-12 no pulmão após 2 e 7 dias de infecção. Contrariamente ao resultado obtido no pulmão, o alelo S do gene *Slc11a1* modulou negativamente a produção desta citocina no sobrenadante de células esplênicas estimuladas ou não após 7 dias de infecção. No sobrenadante de 14 dias o nível de IL-12 foi baixo mesmo sobre ação da Con A. Estes dados evidenciam que os

alelos do gene *Slc11a1* podem interagir com os QTL da AIRmax ou AIRmin e repercutir em diferentes resultados de acordo com o período de infecção e compartimento analisado, sugerindo que o seu efeito é dependente da interação com o microambiente.

Produzida principalmente por células fagocíticas, a IL-12 é uma citocina pró-inflamatória que provém uma importante ligação entre a imunidade inata e adquirida (Trinchieri, G., 1995). Na paracoccidioidomicose experimental, camundongos *knockouts* para a IL-12, quando infectados com leveduras viáveis de *P. brasiliensis* pela via i.t. apresentaram doença mais grave (Deepe et al., 2000). Células de pacientes com paracoccidioidomicose liberam baixos níveis de IL-12. No entanto, o tratamento com IL-12 exógena não recupera totalmente a resposta mediada por Th1. Essa recuperação ocorre somente após o tratamento com IL-12 e neutralização da IL-10 produzida nas culturas, mostrando que nos pacientes, a resposta não protetora está associada à produção de baixos níveis de IL-12 associados a altos níveis de IL-10 (Romano et al., 2002). Em modelos animais, a administração de IL-12 em camundongos suscetíveis B10.A induz uma infecção menos severa com alta resposta inflamatória detectada nos pulmões (Arruda et al., 2002). Estes fatos nos permitem sugerir que a baixa produção de IL-12 nos pulmões dos animais portadores do alelo *Slc11a1* R está envolvida com uma resposta não protetora. Além disso, a menor produção de IL-12 nas sublinhagens AIRmin^{RR}, estaria agindo de forma sinérgica com o baixo nível detectado de IL-6 e o aumento de IL-4 propiciando a multiplicação do *P. brasiliensis* nesses animais.

O IFN- γ e o TNF- α , outras duas citocinas de padrão Th1, foram avaliadas neste trabalho. A produção de IFN- γ nos homogenatos de pulmões se mantiveram a níveis basais ao longo da infecção havendo um leve aumento na sublinhagem AIRmin^{RR} em relação a sublinhagem AIRmax^{RR}. Em cultura de células do baço a produção do IFN- γ

sem o estímulo foi baixa, porém quando acrescido de Con A, houve um aumento da produção com as sublinhagens AIRmax^{RR} e AIRmin^{SS}. Quando dosamos o TNF- α , uma citocina pró-inflamatória, notamos uma inibição desta aos 14 dias de infecção nos sobrenadantes de cultura de células esplênicas de todas as sublinhagens infectadas quando comparadas ao controle, notado principalmente na cultura estimulada com a Con A. Nos pulmões, a produção de TNF- α foi aumentada nos animais AIRmax^{SS} e AIRmin^{RR} no 2º dia após a infecção e nos AIRmin^{SS} no 7º dia.

De acordo com a literatura, o gene *Slc11a1* possui efeitos pleiotrópicos na função de macrófagos, incluindo a produção de TNF- α (Denis et al., 1988; Blackwell, et al., 2000; M. Rojas et al., 1999). Lalmanack et al. (2001) também demonstrou o gene agindo positivamente na produção de IFN- γ por camundongos CBA/J *Slc11a1* R. Os nossos resultados sugerem que o efeito do gene *Slc11a1* na produção de TNF- α e IFN- γ na paracoccidiodomicose é dependente do *background* genético do hospedeiro, já que um diferente padrão de resposta foi observado nas sublinhagens independentemente da presença do alelo R ou S.

Kurita et al. (2000), observaram que em períodos precoces de infecção por *P. brasiliensis*, neutrófilos humanos ativados por IFN- γ , mas não por TNF- α , parecem desenvolver um importante papel na defesa do hospedeiro devido ao aumento da atividade fungicida. Uma maior atividade microbicida também pode ser observada em macrófagos peritoneais e alveolares quando ativados por IFN- γ em modelo murino contra o *P. brasiliensis* e diversos patógenos (Brummer et al., 1988; Cano et al., 1992; Brummer et al., 1994). Souto et al., (2000), demonstraram que a paracoccidiodomicose experimental induzida por via intravenosa era mais grave em camundongos C57BL/6 cujos genes para o IFN- γ ou para o gene p55 do receptor do TNF- α haviam sido

nocauteados. No modelo de resistência/suscetibilidade à paracoccidiodomicose a resistência foi associada ao aumento de TNF (Nascimento et al., 2002). Considerando as informações acima, a produção de TNF- α e IFN- γ parecem estar relacionadas a um padrão de resistência à paracoccidiodomicose, porém nas sublinhagens aqui estudadas esta relação não ficou clara, mas um efeito benéfico destas citocinas não pode ser descartado, uma vez que houve grande alteração na produção de várias citocinas e a ação em conjunto destas é que provavelmente irá determinar um comportamento de resistência ou suscetibilidade.

Tomando em conjunto, os nossos resultados nos permitem dizer que a influência do gene *S/c11a1* no padrão de produção de citocinas é dependente da cinética da infecção e da sua interação com os outros QTL envolvidos na regulação da intensidade da reação inflamatória aguda.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados nos levam a concluir que:

A presença do alelo *Slc11a1* R e um menor influxo leucocitário polimorfonuclear para os pulmões durante o período inicial da infecção, parecem ser fatores decisivos na determinação do perfil de suscetibilidade na infecção por *P. brasiliensis*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araujo, L. M. M., Ribeiro, O. G., Siqueira, M., De Franco, M., Starobinas, N., Massa, S., Cabrera, W. H. K., Mouton, D., Seman, M. & Ibañez, O. M. Innate resistance to infection by intracellular bacterial pathogens differs in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory response. **Eur. J. Immunol.**, v.28, p.2913-20, 1998.

Arruda, C., M. F. Franco, S. S. Kashino, F. R. F. Nascimento, R. A. Fazioli, C. A. C. Vaz, M. Russo, and V. L. G. Calich. IL-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. **Clin. Immunol.**, v.103, p185-95, 2002

Atkinson, P. G. & Barton, C. H. Ectopic expresión of Nramp1 in COS-1 cells modulates iron accumulation. **FEBS Lett.**, v.425, p.239-42, 1998.

Atkinson, P. G. & Barton, C. H. High level expression of Nramp1 G169 in RAW264.7 cell transfectants: analysis of intracellular iron transport. **Immunology**, v.96 p.656-62, 1999.

Bagagli E, Sano A, Coelho KI, Alquati S, Miyaju M, Camargo ZP, Franco M, Montenegro MR. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of Paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v58, p.505-12, 1998.

Barton, C. H., Whitehead, S. H., Blackwell, J. M., Nramb transfection transfers lty/Lsh/Bcg-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on oxidative burst and nitric oxide pathways. **Mol. Med.**, v.1, p.267-79, 1995.

Benard, G., Mendes-Giannini, M. J., Juvenale, M., Miranda, E. T., Duarte, A. J. Immunossuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. **J. Infect. Dis.**, v.175, p.1263-7, 1997.

Bethlem, E. P.; Capone, D.; Maranhão, B.; Carvalho, C. R., Wanke, B. Paracoccidioidomycosis. **Curr. Opin. Pulm. Med.**, v. 5, n.5, p. 319-25, 1999.

Biozzi, G., Ribeiro, O. G., Saran, A., Araújo, L. M., Maria, D. A., De Franco, M., Cabrera, W. K., Sant'anna, O. A., Massa, S., Covelli, V., Mouton, D., Neveu, T., Siqueira, M. & Ibañez, O. M. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. **Carcinogenesis**, v.19, n.2, p.337-46, 1998.

Blackwell, J. M., Barton, C. H., White, J. K., Roach, T. I. A., Shaw, M. A., Whitehead, S. H., Mock, B. A., Searle, S., Williams H., Baker, A. M. **Immunol. Lett.**, v.43, p.99–107, 1994.

Blackwell, J. M., Barton, C.H., White, J. K., Searle, S., Baker, A. M., Williams, H. e col. Genomic organization and sequence of the human NRAMP1 gene: identification and mapping of a promoter region polymorphism. **Mol. Med.**, v.1, p.194-205, 1995.

Blackwell, J. M., Searle, S., Goswami, T., Miller, E. N. Understanding the multiple functions of *Nramp1*. **Microbes Infect.**, v.2, p.317–21, 2000.

Blackwell, J.M., Jiang, H.-R., White, J.K. Role of Nramp family in pro-inflammatory diseases. In: M.F.M. Cellier and P. Gros (Eds). The Nramp family. New york, NY.: Kluwer Academic/Landes, 2004. p.53-64.

Bocca, A. L., Hayashi, E. E., Pinheiro, A. G., Furlanetto, A. B., Campanelli, A. P., Cunha, F. Q., Figueiredo, F. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. **J. Immunol.** v.161, p.3056, 1998.

Bocca, A. L., Silva, M. F., Silva, C. L., Cunha, F. Q., Figueiredo, F. Macrophage expression of class II major histocompatibility complex gene products in *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.61, p.280-7.,1999.

Borrego A, Peters LC, Jensen JR, Ribeiro OG, Koury Cabrera WH, Starobinas N, Seman M, Ibanez OM, De Franco M. Genetic determinants of acute inflammation regulate *Salmonella* infection and modulate Slc11a1 gene (formerly Nramp1) effects in selected mouse lines. **Microbes Infect.**, v.8, p.2766-71. 2006.

Bradley, D. J. Letter: Genetic control of natural resistance to *Leishmania donovani*. **Nature**, v.250, p.353-4, 1974.

Bradley, D. J., Taylor, B. A., Blackwell, J., Evans, E. P., Freeman, J. Regulation of *Leishmania* population within the host. Mapping of the locus controlling susceptibility to visceral leishmaniasis in the mouse. **Clin. Exp. Immunol.**, v.37, p.7-14, 1979.

Brummer E, Hanson LH, Restrepo A, Stevens DA: In vivo and in vitro activation of pulmonary macrophage by IFN- γ for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatidis*. **J. Immunol**, v.140, p.2786-9, 1998.

Brummer, E. Interaction of *Paracoccidioides brasiliensis* with host defense cells. In: M. Franco, C. S. Lacaz, A. Restrepo, and G. Del Negro (Eds.). **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 1994. p. 213-23.

Burger, E., Vaz, C.C.A., Sano, A., Calich, V. L. G., Singer-Vermes, L. M., Xidieh, C. F., Kashino, S. S., Nishimura, K., Miyaji, M. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in nude mice: studies with isolates differing in virulence and definition of their T-cell-dependent and T-cell-independent components. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.55, p.391-8, 1996.

Bustamante-Simon, B., McEwen, J. G., Arango, M. & Restrepo, A. Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of *P. brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.23, p.407-14, 1985.

Buu, N. T., Sellier, M., Gros, P., Schurr, E. Identification of a highly polymorphic length variant in the 3'UTR of NRAMP1. **Immunogenetics**, v.42, p.428-9, 1995.

Calich, V. L. G., Singer-Vermes, L., Siqueira, A. & Burger, E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br. J. Exp. Pathol.**, v.66, p.585–94, 1985.

Calich, V. L. G., Burger, E., Kashino, S., Fazioli, R. & Singer-Vermes, L. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in mice is controlled by a single dominant autosomal gene. **Infect. Immun.**, v.5, p.1919–23, 1987.

Calich, V. L. G. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. **J. Med. Mycology**, v.27, p.71-82, 1989.

Calich, V. L. G., Russo, M., Vaz, C. A. C., Burger, E., Singer-Vermes, L. M. Resistance mechanism to experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Cien. Cult.**, v.46, p.455-61, 1994.

Calich, V. L. G., Vaz, C. A. C., Burger, E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Res. Immunol.**, v.149, p.407-16, 1998.

Cano, L. E.; Arango, R.; Salazar, M. E.; Brummer, E.; Stevens, D. A.; Restrepo, A. Killing of *P. brasiliensis* conidia by pulmonary macrophages and the effects of cytokines. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.30, p.161-8, 1992.

Cano, L. E., Singer-Vermes, L. M., Vaz, C. A. C., Russo, M., Calich, V. L. G. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. **Infect. Immun.**, v.63, p.1777-83, 1995.

Cano, L. E., Kashino, S. S., Arruda, C., André, D., Xidieh, C. F., Singer-Vermes, L. M., Vaz, C. A. C., Burger, E., Calich, V. L. G. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v.66, p.800-6, 1998.

Carbonell, L. M., Rodrigues, J. Transformation of mycelial and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis* in cultures and experimental inoculations. **J. Bacteriol.**, v.90, p.504-10, 1965.

Carneiro, A. S., Ribeiro, O. G., De Franco, M., Cabrera, W. H. K., Vorraro, F., Siqueira, M., Ibañez, O. M. & Starobinas, N. Local inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* venom differs in mice selected for acute inflammatory response. **Toxicon**, v.40, p.1571-9, 2002.

Carvalho EM, Almeida RP. In: Ferreira AW & Ávila SLM, (Eds). **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001. v.4, p.60-6.

Cassatela, M. A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. **Immunol. Today**, v.16, p.21-27, 1995.

Cellier, M., Govoni, G., Vidal, S., Kwan, T., Groulx, N., Liu, J. e col. Human natural resistance-associated macrophage protein: Cdna cloning, chromosomal mapping, genomic organization and tissue specific expression. **J. Exp. Med.**, v.180. p.1741-52, 1994.

Cellier, M., Prive, G., Belouch, A., Kwan, T., Rodrigues, V., Chia, W., e col. Nramp defines a family of membrane proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, p.10089-93, 1995.

Cellier, M., Shustik, C., Dalton, W., Rich, E., Hu, J., Malo, D., e col. The NRAMP1 gene as a marker of professional primary phagocytes: Studies in blood cells and in induced HL-60 promyelocytic leukemia. **J. Leuk. Biol.**, v.61, p. 96-105, 1997.

Chackerian, A. A., Behar, S. M. Susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis*: lessons from inbred strains of mice. **Tuberculosis**, v.83, p.279–85, 2003.

Chequer-Bou-Habib, D., Daniel-Ribeiro, B. D. M., Francisconi do Valle, A. C., Galvão-Castro, B. Polyclonal B-cell activation in paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v.108, p.89-93, 1989.

Coelho K. I. R., De Faveri, J., Rezkallah-Iwasso, M. T., Peraçoli, M. T. S. Experimental Paracoccidioidomycosis. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, (Eds). **Paracoccidioidomycosis**. Florida: CRC Press, 1994: Chap 6.

Cock, A. M., Cano, L. E., Vélez, D., Aristizabal, B. H., Trujillo, J., Restrepo. Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: Histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non-viable *Paracoccidioides brasiliensis* propagules. **An. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, v.42, p.59-66, 2000.

Cohen, N. D., Harrington, J., Gros, P., Del Castro, L., Meyer, D., Martens, R. J. Nramp1 deletion does not confer susceptibility to *Rhodococcus equi* infection in mice. **Immunogenetics**, v.56, n.1, p.65-7, 2004.

Conlan, J. W., Critical roles of neutrophils in host defense against experimental systemic infections of mice by *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Yersinia enterocolitica*. **Infect. Immun.**, v.65, p.630–5, 1977.

Costa, D. L., Dias-Melicio, L. A., Acorci, M. J., Bordon, A. P., Tavian, E. G., Peraçoli, M. T. S., Soares, A. M. V. C., Effect of interleukin-10 on the *Paracoccidioides brasiliensis*

killing by gamma-interferon activated human neutrophils. **Microbiol. Immunol.**, v. 51, p. 73-80, 2007.

Deepe, G. S., Romani, L., Calich, V. L. G., Huffnagle, G., Arruda, C., Molinari-Madlum, E. E. I. W., and J. R. Perfect. Knockout mice as experimental models of virulence. **Med. Mycol.**, v.38, p.87-98, 2000.

Denis M. *et al.*, Pleiotropic effects of the *Bcg* gene. I. Antigen presentation in genetically susceptible and resistant congenic mouse strains. **J. Immunol.**, v.140, p. 2395–400, 1988.

Eckmann, L., Fierer, J., Kagnoff, M. F. Genetically resistant (Ityr) and susceptible (Itys) congenic mouse strains show similar cytokine responses following infection with *Salmonella dublin*. **J. Immunol.**, v.156, n.8, p.2894-900, 1996.

Fang, F. C. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. **J. Clin. Invest.**, v.99, p.2818–25, 1997.

Fauve, R. M., Jusforgues, H. & Hevin, B. Maintenance of granuloma macrophages in serum-free medium. **J. Immunol. Methods.** v.64, 345-51, 1983.

Fleming, M. D., Romano, M. A., Su, M. A., Garrick, L. M., Garrick, M. D., Andrews, N. C. Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, p.1148–53, 1998.

Franco, M., Mendes, R. P., Moscardi-Bacchi, M., Rezkallah-Iwasso, M. T., Montenegro, M. R. Paracoccidioidomycosis: a recent proposed classification of its forms. **Ver. Soc. Méd. Trop.**, v.20 p.129-32, 1987.

Franco, M., Poncio-Mendes, R., Moscardi-Bacchi, M., Rezkallah-Iwasso, M. T., Montenegro, M. R. Paracoccidioidomycosis. **Bailliere's Clin. Trop. Méd. Commun. Dis.**, v.4, p.185-220, 1989.

Franco, M., Peraçoli, M. T. S., Soares, A. M. V. C., Montenegro, M. R., Mendes, R. P., Meira, D. A. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **Curr. Top. Med. Mycol.**, v.5, p.115-49, 1993.

Fulurija, A., Ashman, R. B., Papadimitriou, J. M., Neutrophil depletion increases susceptibility to systemic and vaginal candidiasis in mice, and reveals differences between brain and kidney in mechanisms of host resistance. **Microbiology**, v.142, p.3487–96, 1966.

Gomes, S. M. & Appelberg, R. Evidence for a link between iron metabolism and Nramp1 gene function in innate resistance against *Mycobacterium avium*. **Immunology**, v.95, p.165-8, 1998.

Gonzalez, A., W. de Gregori, D. Velez, A. Restrepo, and L. E. Cano. 2000. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine

macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect. Immun.**, v.68, p.2546-52, 2000.

Gonzalez, A., Sahaza, J. H., Ortiz, B. L., Restrepo, A., Cano, L. E. Production of pro-inflammatory cytokines during the early stages of experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Med. Mycol.**, v.41, p.391-9, 2003.

Gordon, S. The role the macrophage in immune regulation. **Res. Immunol.**, v.149, p.685-8, 1998.

Goswami, T., Bhattacharjee, E., Babal, P., Searle, S., Moore, E., Li, M. e col. Natural-resistance associated macrophage protein 1 is a H⁺/bivalent cation antiporter. **Biochem. J.**, v.354, p.511-9, 2001.

Govoni, G. & Gros, P. Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections. **Inflamm. Res.**, v.47, p.277-84, 1998.

Green, S. J. & Nacy, C. Antimicrobial and immunopathological effects of cytokine-induced nitric oxide synthesis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v.6, p.384–96, 1993.

Herodin, F., Calvas, P. Dormont, D., Fauve, R. M. Inflammation sous-cutanée induite chez la souris par le polyacrylamide. **Ann. Immunol.**, v.134C, p.401-10, 1983.

Hill, A. V. Genetics of infectious disease resistance. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v.6, p.348–53, 1996.

Hoft, D. F.; Schnapp, A. R.; Eickhoff, C. S.; Roodman, S. T. Involvement of CD4⁺ Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.**, v.68, p.197-204, 2000.

Ibañez, O. M., Stiffel, C., Ribeiro, O. G., Cabrera, W. H., Massa, S., De Franco, M., Sant'anna, O. A., Decreusefond, C., Mouton, D., Siqueira, M. & Biozzi, G. Genetics of nonspecific immunity: I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. **Eur. J. Immunol.**, v.22, p. 2555-63, 1992.

Issekutz, A. C. & Issekutz, T. B. Quantitation and kinetics of blood monocyte migration to acute inflammatory reactions, and IL-1 alpha, tumor necrosis factor-alpha and IFN-gamma. **J. Immunol.**, v.151, n.4, p.2105-15, 1993.

Jimenez, B. E, Murphy, J, W. In vitro effects of natural killer cells against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase. **Infect. Immun.**, v.46, p.552-8, 1984.

Jimenez, M del P., Restrepo, A., Radzioch, D., Cano, L. E., Garcia, L. F. Importance of complement 3 and mannose receptors in phagocytosis of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by Nramp1 congenic macrophages lines. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v.47, p.56-66, 2006.

Kashino, S. S., R. A. Fazioli, C. Cafalli-Favati, L. H. Meloni-Bruneri, C. A. C. Vaz, E. Burger, and V. L. G. Calich. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response whereas susceptibility is associated with absence of IFN- γ production. **J. Interferon Cytokine Res.**, v.20, p.89-97, 2000.

Kerr, I. B., Araripe, J. R., Oliveira, P. C., Lenzi, H. L. Paracoccidioidomycosis: a sequential histopathologic study of lesions in experimentally infected rats. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.30, p.336-50, 1988.

Khun, D. E., Baker, B. D., Lafuse, W. P., Zwilling, B. S. Differential iron transport into phagosomes isolated from the RAW264 macrophage cell lines transfected with Nramp1^{Gly169} or Nramp1^{Asp169}. **J. Leuk. Biol.**, v.66, p.113-9, 1999.

Khun, D. E., Lafuse, W. P., Zwilling, B. S. Iron transport into Mycobacterium avium-containing phagosomes from an Nramp1 (Gly 169)-transfected RAW264.7 macrophage cell line. **J. Leuk. Biol.**, v.69, p.43-9, 2001.

Kita, E., Emoto, M., Oku, D., Nishikawa, F., Hamuru, A., Kamikaidou, N., e col., Contribution of interferon gamma and membrane-associated interleukin 1 to the resistance to murine typhoid of *lty* r mice. **J. Leukoc. Biol.**, v.51, p.244-50, 1992.

Kurita, N., Biswas, S. K., Oarada, M., Sano, A., Nishimura, K., Miyaji, M. Fungistatic and fungicidal activities of murine polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, v.37, p.19-24, 1999a.

Kurita, N., Oarada, M., Ito, E., Miyaji, M., Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, v.37, p.261-7, 1999b.

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.**, v.38, p.177-82, 2000.

Lacaz, C. S.; Porto, E., Martins, J. E. C. **Micologia médica**: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. 8.ed. São Paulo: Sarvier, 1991.

La Flamme, A. C., Patton, E. A., Bauman, B., Pearce. E. J. IL-4 plays a crucial role in regulating oxidative damage in the liver during schistosomiasis. **J. Immunol.**, v.166, p.1903-11, 2001.

Lalmanach, A. C., Montagne, A., Menanteau, P., Lantier, F., Effect of the mouse Nramp1 genotype on the expression of IFN-gamma gene in early response to Salmonella infection, **Microbes Infect.**, v.3, p.639-44, 2001.

Lam-Yuk-Tseung, S. & Gros, P. Genetic control of susceptibility to bacterial infections in mouse models. **Cel. Microbiol.**, v.5, p.299-313, 2003.

Linares, LI & Friedman, L. Experimental paracoccidioidomycosis in mice. **Infect. Immun.**, v.5, p.681-7, 1972.

Lissner, C. R., Weinstein, D. L., O'Brien, A. D., Mouse chromosome 1 Ity locus regulates microbicidal activity of isolated peritoneal macrophages against a diverse group of intracellular and extracellular bacteria. **J.Immunol.** v.135 p.544-7, 1985.

Liu, J., Fujiwara, T. M., Buu, N. T., Sanchez, F. O., Cellier, M., Paradis, A. J., Frappier, D., Skamene, E., Gros, P., Morgan, K. and Schurr, E. Identification of polymorphisms and sequence variants in human homologue of the mouse natural resistance-associated macrophage protein gene. **Am. J. Hum. Genet.**, v.56, p.845-53, 1995.

Londero, A. T., Ramos, C. D. Paracoccidioidomicose. Estudo clínico e micológico de 260 casos observados no interior do Estado do Rio Grande do Sul. **J. Pneumol.**, v.16, p.129, 1990.

Mackinnon JE. Pathogenesis of South American Blastomycosis. **Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg.**, v.53, p.487-94, 1959.

MacMicking, J., Xien, Q-W. & Nathan, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol.**, v.15, p.323–50, 1997.

Malo, D. & Skamene, E. Genetic control of host resistance to infection. **Trends Genet.**, v.10, p.365-71, 1994.

Martinez, R. Etioepidemiologia e ecologia. In: Veronesi R & Focaccia R. **Tratado de Infectologia**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1997. 1803p.

McEwen, J. G.; Bedoya, V.; Patiño, M.; Salazar, M. & Restrepo, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.25, p.165–75, 1987.

Meloni-Bruneri, L. H.; Campa, A.; Abdalla, D. S.; Calich, V. L.; Lenzi, H. L.; Burger, E. Neutrophil oxidative metabolism and killing of *P. brasiliensis* after air pouch infection of susceptible and resistant mice. **J. Leukoc. Biol.**, v.59, p.526-33, 1996.

Mendes, R. P.; Scheinberg, M.A.; Rezkallah-Iwasso, M. T.; Marcondes-Machado, J.; Milano, S. I. M.; Pereira, P. C. M.; Meira, D. A.; Barraviera, B.; Curi, P. R. Evaluation of IgE in sera of patients with paracoccidioidomycosis. In: **Resumenes del IV Encuentro International sobre Paracoccidioidomicosis**, 124., 1989, Caracas, Venezuela.

Mendes, R. P. The gamut of clinical manifestations. In: Franco, M., Lacaz, C. S., Restrepo-Moreno, A., Del Negro, G. **Paracoccidioidomycosis**. Florida: CRC Press p.223-58, 1994.

Miller, M. F.; Mitchell, T. G. Killing of *Cryptococcus neoformans* strain by human neutrophils and monocytes. **Infect. Immun.**, v.59, p.24-8, 1991.

Miyaji, M.; Nishimura, K. Granuloma formation and killing functions of granuloma in congenitally athymic nude mice infected with *Blastomyces dermatitides* and *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**, v.82, p.129-41, 1983.

Moser, R.; Schleiffenbaum, B.; Groscurth, P.; Fehr, J. Interleukin 1 and tumor necrosis factor stimulate human vascular endothelial cells to promote transendothelial neutrophil passage. **J. Clin. Invest.**, v.83, p. 444-55, 1989.

Mosmann, T. R.; Schumaker, J. H.; Street, N. F.; Bud, R.; O'Garra, A.; Bond, M. W.; Moore, K. W. M.; Sher, A.; Fiorentino, D. F. Diversity of cytokine synthesis and function of mouse CD4⁺T cells. **Immunol. Rev.**, v.123, p.209-29, 1991.

Mota, N. G. S.; Rezkallah-Iwasso, M. T.; Peraçoli, M. T. S.; Audi, R. C.; Mendes, R. P.; Marcondes, J.; Marques, S. A.; Dillon, N. L.; Franco, M. F. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg.**, v.79, p.765-72, 1985.

Naiff, R. D.; Ferreira, L. C.L.; Barret, T.V. Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no Estado do Pará. **Rev. Inst. Méd. Trop.**, v.28, p.19-29, 1986.

Nascimento, F. R. F.; Calich V. L. G.; Rodrigues, D. and Russo, M. Dual role of nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance but overproduction associated with susceptibility. **J. Immunol.**, v.168, p.4593-600, 2002.

O'Brien, A.; Rosenstreich, D. & Taylor, B. Control of natural resistance to *Salmonella typhimurium* and *Leishmania donovani* in mice by closely linked but distinct genetic loci. **Nature**, v.287, p.440–5, 1980.

Peraçoli, M. T. S.; Soares, A. M. V. C.; Mendes, R. P., Marques, S. A.; Guastale, H. A.; Meira, D. A.; Rezkallah-Iwasso, M. T. Cell-mediated immunity in patients with the chronic form of paracoccidioidomycosis. Early and late evaluation after treatment. **Rev. Iber. Micol.**, v.5 (Supl.1), p.69, 1988.

Peters, L. C.; Jensen, J. R.; Borrego, A. Cabrera, W. H.; Baker, N.; Starobinas, N.; Ribeiro, O. G.; Ibanez, O. M.; De Franco, M. Slc11a1 (formerly NRAMP1) gene modulates both acute inflammatory reactions and pristane-induced arthritis in mice. **Genes Immun.**, v.8, p.51-6, 2007.

Pina, A.; Valente-Ferreira, R. C.; Molinari-Madlum, E. E.; Vaz, C. A.; Keller, A. C.; Calich, V. L. Absence of interleukin-4 determines less severe pulmonary paracoccidioidomycosis associated with impaired Th2 response. **Infect. Immun.**, v.72, p.2369-78, 2004.

Pina A.; Saldiva, P. H. N.; Restrepo, L. E. C. and Calich, V. L. G. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. **J Leukoc. Biol.**, v.79, n.6, p.1202-13, 2006.

Plant, J. & Glynn, A. A. Natural resistance to *Salmonella* infection, delayed hypersensitivity and Ir genes in different strains of mice. **Nature**, v.248, p.345-7, 1974.

Plant, J. & Glynn, A. A. Genetics of resistance to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. **J. Infect. Dis.**, v.133, p.72-8, 1976.

Puliti, M.; Radzioch, D.; Mazzolla, R.; Barluzzi, R.; Bistoni, F.; Blasi, E. Influence of the Bcg locus on macrophage response to the dimorphic fungus *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, v.63, n.10, p.4170-3, 1995.

Ramarathinam, L.; Niesel, D. W.; Kimpel, G. R. Ity influences the production of IFN-gamma by murine splenocytes stimulated in vitro with *Salmonella typhimurium*. **J. Immunol.**, v.150, p.3965-72, 1993.

Restrepo, A.; Salazar, M. E.; Cano, L. E.; Stoves, E. P.; Feloman, D.; Stevens, D. Estrogens inhibit mycelium to yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: Implications for resistance of females to Paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v.46, p.346, 1984.

Restrepo, A. The ecology of *P. brasiliensis*, a puzzle still unsolved. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.23, p.323-34, 1985.

Restrepo, A.; Salazar, M. E.; Cano, L. E. & Patiño, M. M. A technique to collect and dislodge conidia produced by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.24, p. 247–50, 1986.

Restrepo, S.; Tóbon, A.; Trujillo, J.; Restrepo, A. Development of pulmonary fibrosis in mice during infection with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **J. Méd. Vet. Mycol.**, v.30 p.173-84, 1992.

Restrepo, A.; Del Negro, G. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton, Florida, **CRC Press**, p.97-102, 1994.

Restrepo, A. & Tobón, A. M. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Mandell, G. L., Bennett, J. E. & Dollin, R. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. 6th ed. Philadelphia: Elsevier, 2005. Chapter 266, p. 3062–3068.

Ribeiro, O. G. **Controle genético da inflamação**. São Paulo, 1994. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo.

Ribeiro, O. G.; Maria, D. A.; Adriouch, S.; Pechberty, S.; Cabrera, W. H.; Morisset, J.; Ibanez, O. M.; Seman, M. Convergent alteration of granulopoiesis, chemotactic activity,

and neutrophil apoptosis during mouse selection for high acute inflammatory response.

J. Leukoc. Biol., v.74, n.4, p.497-506, 2003.

Rodrigues, D. R. **Efeito de citocinas sobre a atividade fungicida e fungistática de neutrófilos humanos contra o *Paracoccidioides brasiliensis***. Botucatu, 2003.

Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Rojas, M. *et al.* TNF- α and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. **J. Immunol.**, v.162, p.6122-31, 1999.

Romano, C. C.; Mendes-Giannini, M. J. S.; Duarte, A. J. S.; Benard, G. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. **Cytokine**, v.18, p.149-57, 2002

San-Blás, F.; San-Blás, G. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Szaniszlo PJ. **Fungal Dimorphism**. New York: Plenum, 1985. p.93-120.

San-Blas, G.; San-Blas, F. Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* dimorphism. In: Franco, M.; Lacaz, C. S.; Restrepo-Moreno, A.; Del Negro, G. (Eds). **Paracoccidioidomycosis**. Florida: CRC Press, 1994. p.49-66.

Santos, W. A.; Silva, B. M.; Passos, E. D.; Zandonade, E.; Falqueto, A. Associação entre tabagismo e paracoccidioidomicose: um estudo de caso-controle no Estado do Espírito Santo, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v.19, p.1, 2003.

Schelenz, S.; Smith, D. A.; Bancroft, G. J. Cytokine and chemokine responses following pulmonary challenge with *Aspergillus fumigatus*: obligatory role of TNF-alpha and GM-CSF in neutrophil recruitment. **Med. Mycol.**, v.37, p.183-194, 1999.

Scott, P.; Farrel, J. P. Experimental cutaneous leishmaniasis, induction and regulation of T cells following infection of mice with *Leishmania major*. **Chem. Immunol.**, v.70, p.60-80, 1998.

Searle, S.; Blackwell, J. M. Evidence for a functional repeat polymorphism in the promoter region of human *NRAMP1* that correlates with infectious versus autoimmune disease susceptibility. **J. Med. Genet.**, v.36 p.295–9, 1999.

Singer-Vermes, L. M.; Burguer, E.; Franco, M. F.; Moscar, D. I.; Bacchi, M.; Mendes-Giannini, M. J. S., et al. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. **J. Med. Mycol.**, v.27, p.71-82, 1989.

Skamene, E.; Gros, P.; Forget, A.; Kongshavn, P. A. L.; St Charles, C.; Taylor, B. A. Genetic regulation of resistance to intracellular pathogens. **Nature**, v.197, p.506-9, 1982.

Skamene, E.; Gros, P.; Forget, A.; Patel, P. J.; Nesbitt, M. N. Regulation of resistance to leprosy by chromosome 1 locus in the mouse. **Immunogenetics**, v.19, p.117-24, 1984.

Souto, J. F.; Figueiredo, F.; Furlanetto, A.; Pfeffer, K.; Rossi, M. A., and Silva, J. S. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α determines resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Am. J. Pathol.**, v.156, p.1811-20, 2000.

Stiffel, C.; Ibañez, O. M.; Ribeiro, O. G.; Decreusefond, C.; Mouton, D.; Siqueira, M. & Biozzi, G. Genetics of acute inflammation: inflammatory reactions in inbred lines of mice and their interline crosses. **Exp. Clin. Immunol. genet.**, v.7, p.221-33, 1990.

Tracey, K. J.; Cerami A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. **Ann. Rev. Med.**, v.45, p.491-503, 1994.

Trinchieri, G.; Scott, P. Interleukin 12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions. **Res. Immunol.**, v.146, p.423-31, 1995.

Vidal, S. M.; Malo, D.; Vogan, K.; Skamene, E.; Gros, P. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. **Cell**, v.73, p.469-85, 1993.

Vidal, S. M.; Tremblay, M. L.; Govoni, G. The *lty/ Lsh/Bcg* locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene. **J. Exp. Med.**, v.182, p.655-66, 1995.

Vidal, S. M.; Pinner, E.; Lepage, P.; Gauthier, S. & Gros, P. Natural resistance to intracellular infections. *Nramp1* encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (*Nramp1*D169) mouse strains. **J. Immunol.**, v.157, p.3559–68, 1996.

Vorrano, F. **A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em linhagens geneticamente selecionadas para a produção de anticorpos ou para a resposta inflamatória aguda.** São Paulo, 2001. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

Wanke, B.; Londero, A. T. Epidemiology and Paracoccidioidomycosis infection. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Delnegro G, (Eds). **Paracoccidioidomycosis.** Florida: CRC Press, Boca Raton, 1994. p.109-20.

White, J. k.; Shaw, M. A.; Bartom, C. H.; Cerretti, D. P.; Williams, H.; Mock, B. A. Genetic and physical mapping of 2q35 in the region of *NRAMP* and *IL8R* genes: Identification of polymorphic repeat in exon 2 of *NRAMP*. **Genomics**, v.24, p.295-302, 1994.

Wilson, M.; Seymour, R., Henderson, B. Bacterial perturbation of cytokine network. **Infect. Immun.**, v.66, p.2401-9, 1998.

Wyllie, S.; Seu, P.; Goss, J. A. The natural resistance-associated macrophage protein 1 Slc11a1 (formerly Nramp1) and iron metabolism in macrophages, **Microbes Infect.**, v.4, p.351-9, 2002.

Xue, R., Wang, S., Wang, C., Zhu, T., Li, F., Sun, H. HFIP-induced structures and assemblies of the peptides from the transmembrane domain 4 of membrane protein Nramp1. **Biopolymers**, v.84, p. 329–39. 2006. doi:10.1002/bip.20478. PMID:16479587.

Zwilling, B. S.; Khun, D. E.; Wikoff, L.; Brown, D.; Lafuse, W. Role of iron in Nramp1-mediated inhibition of mycobacterial growth. **Infect. Immun.**, v.67, p.1386-92, 1999.