

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

**Efeito de um inibidor de leucotrienos no
processo inflamatório decorrente da infecção
por *Paracoccidioides brasiliensis* em
camundongos geneticamente selecionados**

Helanderson de Almeida Balderramas

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós
Graduação em Doenças Tropicais da
Faculdade de Medicina de Botucatu –
UNESP, para obtenção do título de Mestre
em Doenças Tropicais**

Orientador: Dr. Silvio Luis de Oliveira

Botucatu-SP

2009

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

Balderramas, Helanderson de Almeida.

Efeito de um inibidor de leucotrienos no processo inflamatório decorrente da infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* em camundongos geneticamente selecionados / Helanderson de Almeida Balderramas. – Botucatu : [s.n.], 2008

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2008.

Orientador: Silvio Luis de Oliveira

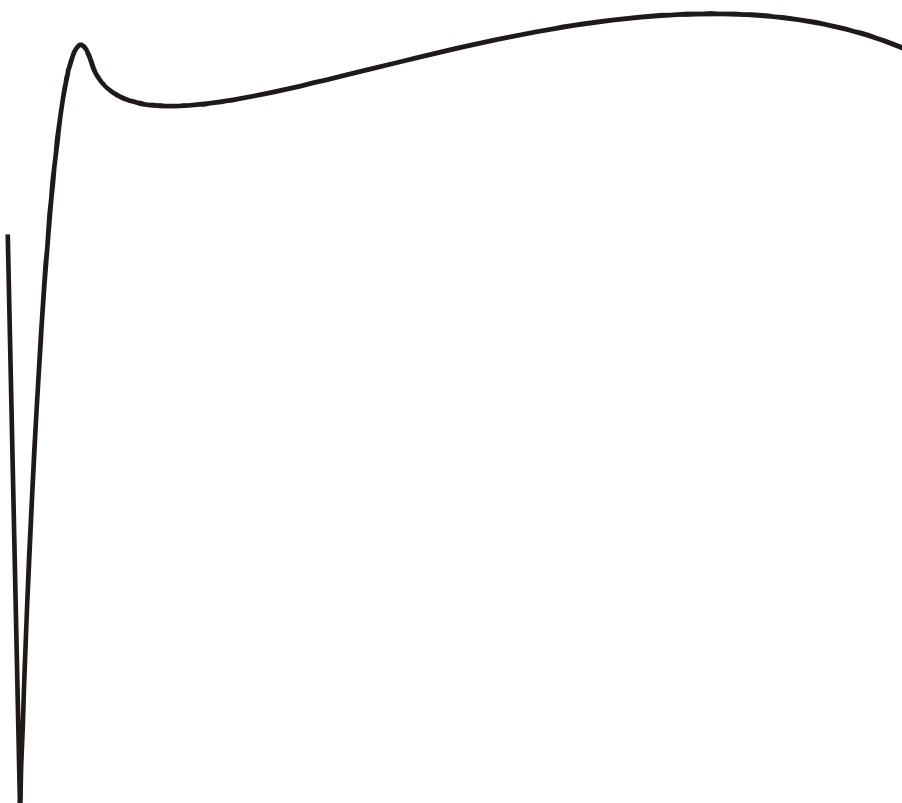
Assunto CAPES: 40101096

1.Paracoccidioidomicose - Aspectos imunológicos 2.
Paracoccidioides brasiliensis

CDD 616.992

Palavras-chave: Citocinas; Leucotrienos; Neutrófilos; *Paracoccidioides brasiliensis*; Resposta inflamatória aguda

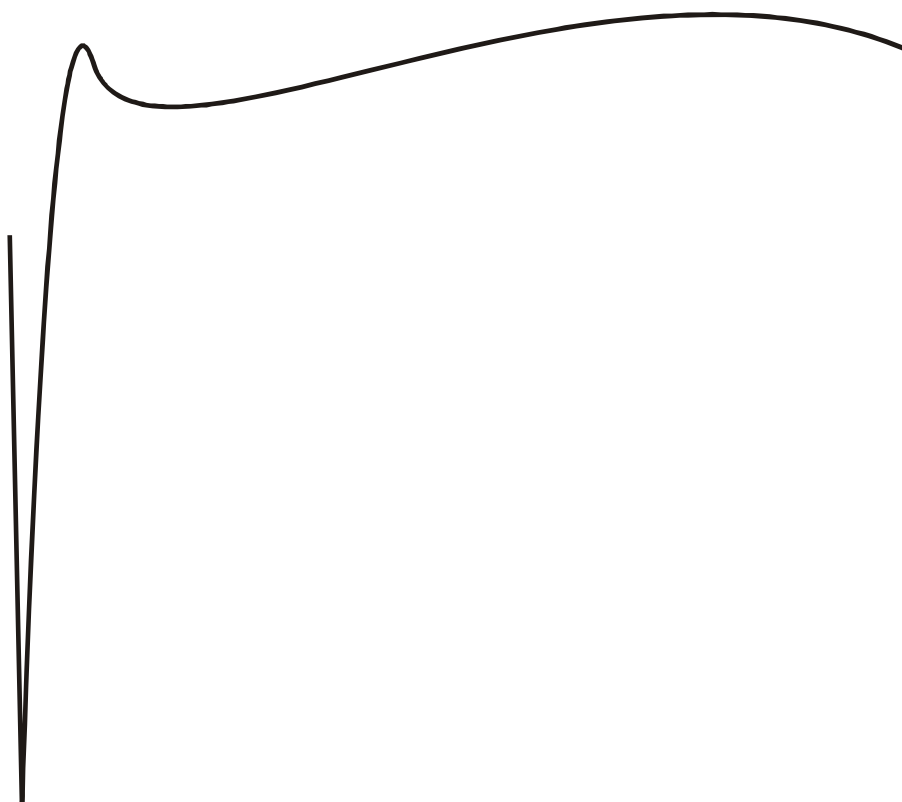
Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista campus Botucatu, e no Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan-SP.



Dedicatória



Dedico este trabalho aos meus pais que ao longo de minha vida me outorgaram sem penúria valores éticos, morais, humanos e religiosos, do qual sem eles o privilégio da vida seria desonrado!



Agradecimientos



Agradecimentos

A Deus, que me supre, me capacita e me respalda, sem Ti nada sou Senhor...

A minha família, pela confiança, incentivo e amor.

Ao meu orientador Prof. Dr. Silvio Luis de Oliveira, responsável pelo meu ingresso na ciência, e pela orientação não só científica, mas humana, social e paternal.

E antes de orientador, amigo incondicional!

Aos meus colegas pós-graduandos do Departamento de Microbiologia e Imunologia Juliana, Daniela Moris, Guilherme, Taty, Priscila, Graziela, Ana Paula, Ana, Michele, Elizandra, Fabi, Luciana, Vanessa, Érica, Douglas, Kattya, Keila, Cláudio, Camila, obrigado pela ajuda e pelos bons e agradáveis momentos de convívio.

Ao meu grande amigo Bruno Trindade (Araxá) pelo companheirismo, companhia e cumplicidade.

Aos Docentes do Departamento de Microbiologia e Imunologia (Alexandrina Sartori, Angela Maria Victoriano de Campos Soares, Maria Terezinha Serrão Peraçoli, Maurício Sforcin e Ramon Kaneno) por contribuírem de forma fundamental na minha formação e também para a realização desse trabalho.

As secretárias do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Sônia Faraldo e Leonice Garcia, que nunca mediram esforços para me ajudar

A secretária do Curso de Pós-graduação em Doenças Tropicais, Solange Sako Cagliari pela disponibilidade em me ajudar sempre.

Ao Luis Severino dos Santos (Lula) e Luis Henrique Alquati, pelo auxílio técnico e pelos momentos de descontração.

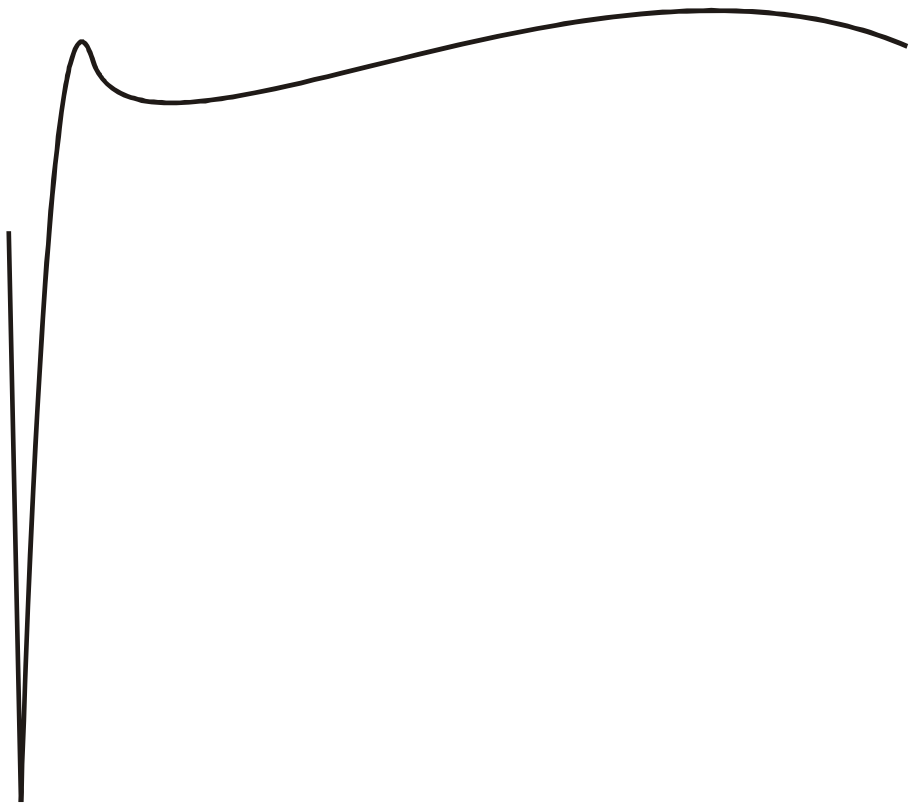
Ao prof. Dr. Orlando Garcia Ribeiro por abrir as portas do Instituto Butantan e possibilitar a conclusão de parte experimental desse projeto e também pelas sugestões no trabalho.

As colegas do Instituto Butantan Alessandra Suppa e Andréa Arruda por me auxiliarem nos experimentos desenvolvidos neste local.

Aos amigos moradores da república Kissassa (quanta história) João Paulo, Neto, Márcio, Podé e agregados: Paulinho, Daniel Rolim, Fábio Maffei, Flávio, Fábio Seiva, Pedro, Castilho, Érica, Livia, sem vocês nada disso teria acontecido...

Aos queridos amigos de Bauru Silvio, Josias, Márcio e Thiago sempre apoiando e incentivando minha caminhada.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo auxílio financeiro prestado.



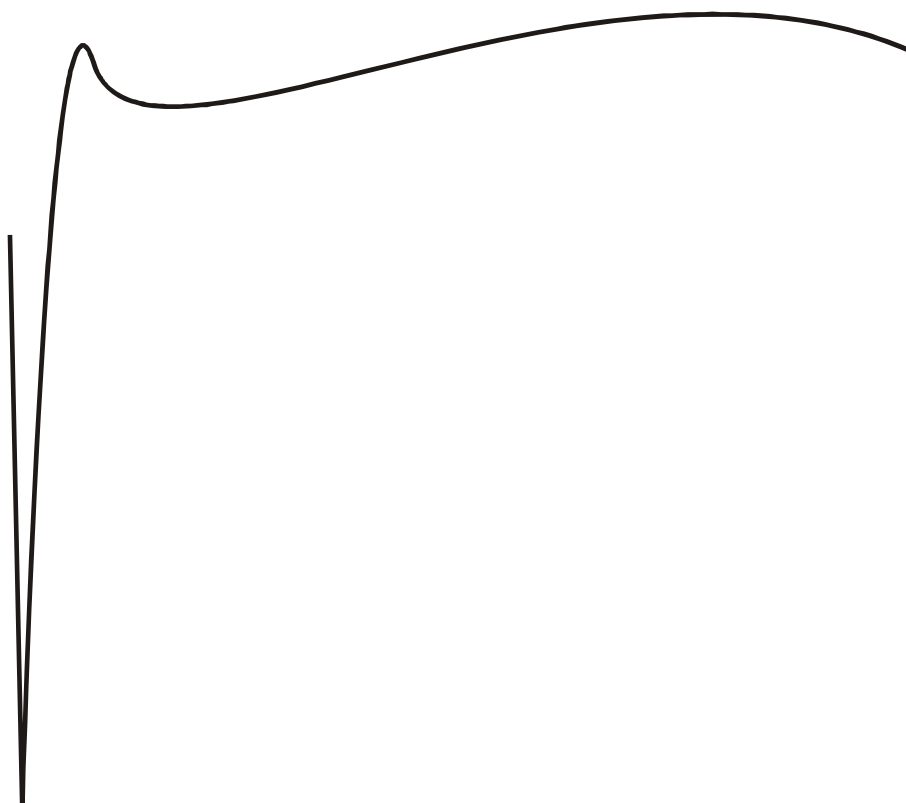
Abreviaturas



Abreviaturas

5-HPETE:	5-hidroperóxido eicosatetraenóico
5-LO:	5-lipoxigenase
AA:	Ácido araquidônico
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
ANOVA:	Análise de variância
cPLA2:	Fosfolipase A ₂ cistólica
ELISA:	“enzyme-linked immunosorbent assay” (ensaio imuno-enzimático)
EPM:	Erro padrão da média
GM-CSF:	Fator de estimulação de colônias de granulócitos e monócitos
i.p.:	Intraperitoneal
i.t.:	Intratraqueal
IFN-α:	Interferon alfa
Ig:	Imunoglobulina
IL:	Interleucina
iNOS:	Óxido nítrico sintase induzível
IP-10:	“IFN- α inducible protein 10”
KO:	Animal com disrupção em algum gene
LBA:	Lavado broncoalveolar
LPS:	Lipossacarídeo

LTB₄:	Leucotrieno B ₄
LTC₄:	Leucotrieno C ₄
LTD₄:	Leucotrieno D ₄
LTE₄:	Leucotrieno E ₄
LTs:	Leucotrienos
MA:	Macrófagos alveolares
MCP:	“Monocyte chemoattractant protein”
MHC:	Complexo principal de histocompatibilidade
MIP:	Proteína inflamatória de macrófagos
NO:	Óxido nítrico
PBS:	Solução salina em tampão fosfato
PCM:	Paracoccidiodomicose
PMN:	Leucócitos polimorfonucleares
RANTES:	“Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted
RPMI-C:	Meio RPMI-completo
RPMI-I:	Meio RPMI-incompleto
Slc11a1:	Membro 1 da família 11 dos carreadores solúveis
TGF-β:	Fator de transformação do crescimento beta
Th1, Th2:	Células T helper 1 e células T helper 2
TNF-α:	Fator de necrose tumoral alfa
UFC:	Unidades formadoras de colônia



Sumário

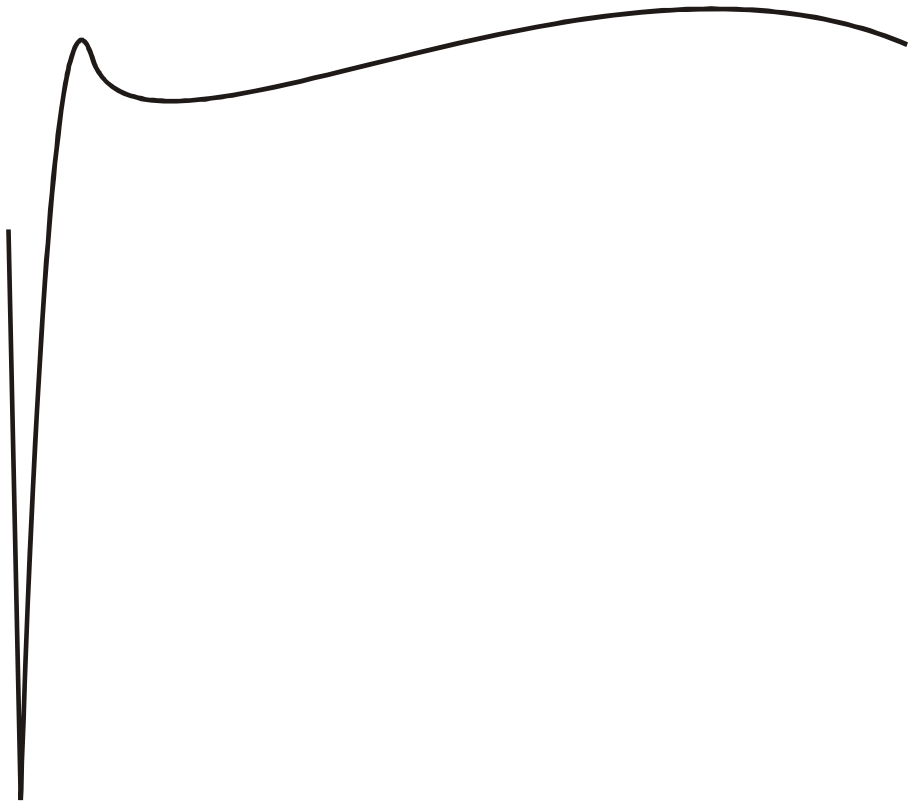


Sumário

RESUMO	17
ABSTRACT	20
1. INTRODUÇÃO	22
2. OBJETIVOS	38
3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 Animais	42
4.2 Cultivo do <i>P. brasiliensis</i>	42
4.3 Preparação do inóculo e determinação da viabilidade de <i>P. brasiliensis</i>	42
4.4 Infecção pulmonar com <i>P. brasiliensis</i> através da inoculação intratraqueal (i.t), por procedimento cirúrgico	43
4.5 Tratamento com o composto MK 886 inibidor da síntese de leucotrienos	43
4.6 Obtenção, contagem total e diferencial das células do LBA	44
4.7 Determinação de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) nos pulmões de animais infectados com <i>P. brasiliensis</i>	44

4.8	Preparação dos homogeneizados de pulmão para dosagem de citocinas e NO	45
4.9	Detecção de citocinas pelo Ensaio Imuno-Enzimático (ELISA)	46
4.10	Cultura de macrófagos pulmonares	47
4.11	Detecção de Nitrito (NO ₂ ⁻) em sobrenadante de cultura de células pulmonares	47
4.12	Determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO)	48
4.13	Análise estatística.....	48
5.	RESULTADOS	50
5.1	Caracterização do recrutamento de leucócitos para a cavidade broncoalveolar	50
5.2	Determinação da atividade da MPO no pulmão de camundongos infectados com <i>P.brasiliensis</i> , tratados ou não com MK 886	55
5.3	Efeito do inibidor da síntese de leucotrienos, MK 886, na multiplicação de leveduras nos pulmões de animais infectados com <i>P.brasiliensis</i>	58
5.4	Concentração de óxido nítrico em sobrenadante de homogeneizados de pulmões obtidos de animais infectados por <i>P.brasiliensis</i> tratados ou não com MK 886	60
5.5	Produção de citocinas em sobrenadante de homogeneizados de pulmões obtidos de animais infectados por <i>P.brasiliensis</i> tratados ou não com MK 886	62

5.5.1	Produção de IL-6	62
5.5.2	Produção de IL-10	64
5.5.3	Produção de IFN- γ	66
5.5.4	Produção de TNF- α	68
6. DISCUSSÃO		71
7. CONCLUSÃO		81
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		83



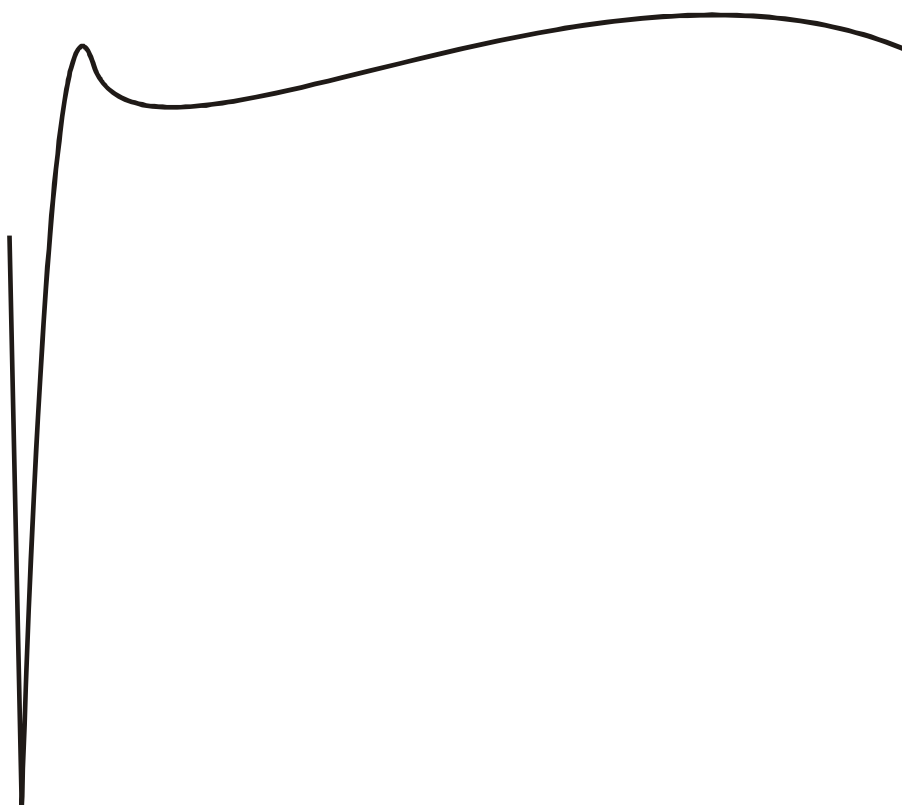
Resumo



Resumo

Leucotrienos são mediadores clássicos da resposta inflamatória, descritos como agentes quimiotáticos e reguladores da atividade microbida de células do sistema imune inato, tendo papel protetor contra diferentes agentes infecciosos. Neste estudo, nós investigamos o envolvimento de leucotrienos no curso da paracoccidiodomicose murina a partir dos seguintes parâmetros imunológicos: influxo celular, atividade da mieloperoxidase, produção de NO, produção de citocinas e recuperação fúngica em pulmões de camundongos selecionados de acordo com a intensidade da sua resposta inflamatória aguda máxima (AIRmax) e mínima (AIRmin). Observamos que a infecção por *P. brasiliensis* induz considerável produção de citocinas IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α , promove o recrutamento celular e produção de NO nos pulmões em diferentes períodos de estudo. Nos animais tratados com um inibidor da síntese de leucotrienos (MK886) observamos uma menor produção das citocinas IFN- γ , IL-6 e TNF- α concomitante com a queda do influxo de neutrófilos, e também diminuição na produção de NO, esses resultados podem explicar uma maior carga fúngica nos pulmões de animais que tiveram a síntese de leucotrienos inibida, sugerindo aos leucotrienos um possível papel protetor na paracoccidiodomicose experimental. Animais da linhagem AIRmax apresentaram menor carga fúngica quando comparado com animais AIRmin, este resultado pode ser relacionado ao fenótipo da AIR quanto à migração de neutrófilos, além de uma menor produção de NO e citocinas pró-inflamatórias, conferindo aos camundongos com background AIRmax maior resistência a infecção por *P. brasiliensis*.

Palavras chave: Leucotrienos, *Paracoccidioides brasiliensis*, Neutrófilos, Resposta imune inata, Citocinas



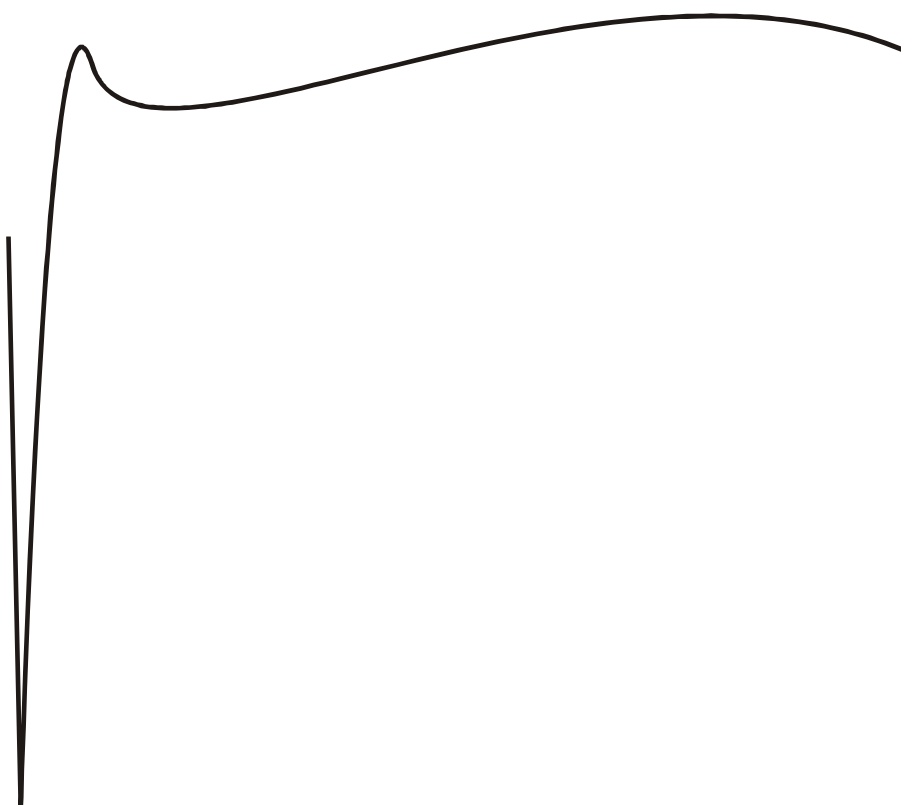
Abstract



Abstract

Leukotrienes are classic inflammatory response mediators considered chemotactic agents and microbicide activity regulators in cells of the innate immune system, playing a protective role against different infectious agents. In this study, we investigated the involvement of leukotrienes in the course of murine paracoccidioidomycosis based on the following immunologic parameters: cell influx, mieloperoxydase activity, NO production, cytokine production, and fungal recovery in lungs of mice selected according to the intensity of their low (AIRmin) and high (AIRmax) acute inflammatory response. Infection by *P. brasiliensis* induced considerable production of the cytokines IL-6, IL-10, IFN- γ , and TNF- α , and led to cell recruitment, as well as NO production, in lungs at different study periods. In animals treated with MK886, a leukotriene biosynthesis inhibitor, IFN- γ , IL-6 and TNF- α production was lower, while neutrophil influx and NO production decreased. These results may explain the higher fungal load in lungs of animals in which leukotriene synthesis was inhibited, suggesting that leukotrienes have a possible protective role in experimental paracoccidioidomycosis. AIRmax animals had lower fungal load relative to AIRmin ones, which can be related to the AIR phenotype regarding neutrophil migration, besides lower production of NO and pro-inflammatory cytokines; thus, mice presenting AIRmax background are more resistant to infection by *P. brasiliensis*.

Keywords: Leukotrienes, *Paracoccidioides brasiliensis*, Neutrophils, Innate immune response, Cytokines



Introdução



1. INTRODUÇÃO

O *Paracoccidioides brasiliensis*, agente etiológico de uma doença granulomatosa crônica denominada Paracoccidioidomicose (PCM), é um fungo termodimórfico conhecido apenas em sua forma assexuada ou imperfeita. Este fungo apresenta-se na forma leveduriforme em tecidos de hospedeiros ou quando cultivados a 37°C e sob forma miceliana no meio ambiente e em culturas mantidas a 25°C¹⁻². A PCM é a micose profunda mais comum no Brasil³ e ocorre de forma endêmica na maioria dos países da América Latina¹⁻⁴. Embora o nicho ecológico do *P. brasiliensis* não seja totalmente conhecido, acredita-se que este viva saprofiticamente no solo⁵. 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, Brasil⁶. 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 tatus⁷.

Evidências epidemiológicas e experimentais sugerem que a infecção natural se inicie após inalação de conídios produzidos pela forma micelial do fungo⁸. No pulmão, os conídios fagocitados pelos macrófagos alveolares (MA) iniciam a transformação em células leveduriformes após 12-18h⁹. 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 grave¹⁰⁻¹¹.

No controle de uma infecção ocorre a interação entre o sistema imune inato e o adaptativo. Na PCM pulmonar, como em outras doenças, ocorre a interação de antígenos do *P. brasiliensis* com o sistema imune. Ao penetrar no organismo o mecanismo de defesa inato é ativado e, se o *P. brasiliensis* não for eliminado, permite-se à adaptação e transformação do fungo e conseqüentemente, as respostas adaptativas específicas são requisitadas a fim de controlar a disseminação do fungo¹².

O mecanismo de resposta imune inicial do hospedeiro frente ao *P. brasiliensis* tem sido amplamente investigado, como a fagocitose, a quimiotaxia de leucócitos, a ação de células “*natural killers*” (NK), assim como de fatores genéticos e do sistema complemento. A ativação de macrófagos e a formação do granuloma protegem o hospedeiro da disseminação extra-pulmonar da infecção. Macrófagos ativados, células NK e leucócitos polimorfonucleares (PMN) são capazes de matar ou inibir o crescimento fúngico *in vitro*^{13,14,15}. *In vivo*, macrófagos e linfócitos são as principais células efetoras envolvidas no controle da doença através da síntese das citocinas de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon-gama (IFN- γ). A ausência de IFN- γ conduz a formação de granulomas não organizados que não são capazes de controlar a disseminação do *P. brasiliensis*¹⁶⁻¹⁷.

Quando o *P. brasiliensis* alcança o alvéolo pulmonar, o fungo interage com os MA induzindo a liberação de peptídeos que atraem PMN. Xidieh *et al*¹⁸ demonstraram que durante a PCM murina os PMN têm sua produção, mobilização e atividade funcional influenciada pelo padrão genético do hospedeiro, tempo de infecção e condições de exposição ao *P. brasiliensis*. Tem sido verificado em pacientes com a PCM que os PMN circulantes e os MA obtidos

de lavado broncoalveolar (LBA) têm níveis de atividade fagocítica normais, embora falhem na capacidade de digerir ambas as formas, de levedura ou conídio do *P. brasiliensis* ¹⁹. Estudos *in vitro* têm demonstrado que células NK murina limitam o crescimento do *P. brasiliensis*, sugerindo papel importante na fase inicial da infecção ¹⁴. O *P. brasiliensis* também é capaz de ativar o sistema complemento, resultando em um efeito opsonizante que facilita a fagocitose pelos macrófagos ²⁰. Na PCM bem como em outras micoses profundas e em infecções causadas por agentes intracelulares, a imunidade celular é fundamental para conferir resistência frente à infecção. Entretanto há estudos que confirmam que o *P. brasiliensis* possui mecanismos de evasão eficientes para inibir a resposta imune celular e conseqüente disseminação. Estes mecanismos são pouco conhecidos, mas sabe-se que além da conversão dos conídios para a forma leveduriforme, que é fundamental para o estabelecimento da infecção, a modificação do padrão de resposta de T-“helper” 1 (Th1) para T-“helper” 2 (Th2) pode alterar o padrão de suscetibilidade do hospedeiro ^{21,22,23}.

Muitos indivíduos expostos ao *P. brasiliensis* desenvolvem infecção pulmonar assintomática, indicando que estes são hospedeiros resistentes, enquanto outros indivíduos são altamente suscetíveis à infecção e desenvolvem a PCM doença ²⁴⁻²⁵.

Nos indivíduos que desenvolvem doença são observados quadros clínicos diversos, que são agrupados em dois padrões principais que definem as formas aguda, subaguda ou juvenil e a forma crônica ou adulta ²⁴. A forma aguda apresenta história clínica de curta duração, em geral um a dois meses e sinais clínicos compatíveis com o envolvimento do sistema fagocítico mononuclear (baço, fígado, linfonodo e medula óssea), caracterizado por hepato e/ou

esplenomegalia ²⁶. Nos pacientes com a forma aguda, as lesões são pouco freqüentes e o acometimento pulmonar é raro ²⁷⁻²⁸. A forma crônica da PCM representa cerca de 90% dos casos e apresenta quadro clínico de duração prolongada, com freqüência acima de seis meses e revela envolvimento pulmonar e mucoso na maioria dos casos ²⁹.

A idade, o sexo e a ocupação são fatores de risco para a PCM. 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 em levedura na ocasião da infecção primária ³⁰.

Em relação à interação parasita-hospedeiro na PCM, os hospedeiros que exibem maior controle sobre a produção de anticorpos, além da preservação da imunidade celular, apresentam menor grau de gravidade da doença, enquanto que as formas mais graves estão associadas à hipergamaglobulinemia (níveis altos de IgA, IgG e IgE) e de imunocomplexos séricos, além da ativação policlonal de linfócitos B ³¹⁻³². Na PCM, a produção de altos títulos de anticorpos específicos não é protetora e sim, representa um prognóstico ruim da doença ³³⁻³⁴. Estas características foram indicativas de que a resposta imune relacionada com a produção de anticorpos, tais como as respostas imunes governadas por linfócitos T CD4+ do tipo Th2 conduzem a um padrão de doença mais grave e aquelas associadas preferencialmente com a ativação da imunidade celular comandadas pelos linfócitos T CD4+ do tipo Th1 conduzem a uma patologia mais branda ²¹⁻³⁴.

Trabalhos recentes têm demonstrado claramente que pacientes com a forma grave da PCM produzem níveis de isótipos de IgE, IgG4 [regulados pela

interleucina 4 (IL-4)] e IgA [regulado pelo fator de transformação do crescimento beta (TGF-B), interleucina 5 (IL-5) e interleucina 10 (IL-10)] mais altos do que aqueles com a forma branda da doença³⁵⁻³⁶. Além disso, a secreção de níveis mais altos de citocinas do tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) e TGF-B, bem como a presença de eosinofilia, foi detectada em pacientes com a infecção mais disseminada de que naqueles com a doença menos grave³⁷. Em pacientes com a doença ativa foi encontrada diminuição na secreção de IFN- γ ³⁷⁻³⁸. Mamoni *et al.*³⁶, ao avaliarem as concentrações de interleucina 6 (IL-6), TNF- α e *Monocyte chemoattractant protein-1 α* (MIP-1 α) não observaram diferença nas suas concentrações entre a forma juvenil e adulta da PCM. Entretanto, níveis mais elevados destas citocinas foram detectados na forma adulta multifocal no que na forma adulta unifocal. Níveis de interleucina 8 (IL-8) em pacientes com a forma juvenil foram significativamente mais baixos do que aqueles detectados na forma adulta unifocal, indicando uma resposta do tipo Th2 em pacientes com a forma juvenil, uma vez que a IL-8 modula a síntese de IgE induzida pela IL-4³⁹ e, dessa forma, a diminuição na produção desta citocina pode contribuir para polarização da resposta Th2 na forma juvenil e assim facilitar a disseminação da doença.

Em conjunto, estes dados indicam que a PCM é regulada por um padrão de resposta imune Th1/Th2, isto é, a ativação de células do tipo Th2 está associada com a doença progressiva e grave e a de células do padrão Th1 associada com a forma benigna da infecção.

Fatores controlados geneticamente são conhecidos por regular o curso e a progressão da infecção por *P. brasiliensis*²¹. A comparação de diferentes linhagens de camundongos isogênicos, infectados intraperitonealmente por células leveduriformes de *P. brasiliensis*, apresentaram um diferente padrão de

resistência e suscetibilidade determinada pelo tempo de sobrevivência. A linhagem A/Sn foi caracterizada como a mais resistente enquanto a linhagem B10.A mostrou-se altamente suscetível à infecção por *P. brasiliensis* ²⁰.

Células de linfonodos de camundongos resistentes infectados intraperitonealmente com *P. brasiliensis* produziram precocemente níveis sustentáveis de interleucina 2 (IL-2) e IFN- γ ao passo que os camundongos resistentes 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 ⁴⁰. 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 homogeneizados 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 relativa resistência da linhagem suscetível B10.A ¹⁶.

Logo após a infecção por *P. brasiliensis*, possivelmente o fungo interage com MA induzindo a liberação de quimiocinas, nas quais atraem neutrófilos, as primeiras células a chegarem ao sítio inflamatório ⁴¹. De fato, peptídeos de baixo peso molecular do sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais incubados com *P. brasiliensis* vivos são capazes de atrair neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos ²⁰.

Os neutrófilos têm um papel fundamental no controle da multiplicação de bactérias patogênicas como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* ⁴², fungos como *Candida albicans* ⁴³ e o *P. brasiliensis* ⁴⁴⁻⁴⁵. Na infecção por conídios de *P. brasiliensis*, estudos prévios revelaram uma regulação positiva da reação inflamatória caracterizada por abundante

recrutamento de PMN⁸⁻⁴⁶ e aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, interleucina 1 β (IL-1 β) e *Monocyte chemoattractant protein-2* (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^{34,47,48,49}. A capacidade de fagocitar e matar microrganismos é via geração de intermediários reativos do oxigênio e liberação de enzimas líticas armazenadas em seus grânulos⁵⁰. McEwen *et al.*⁵¹ demonstraram que a morte de leveduras de *P. brasiliensis* por células PMN obtidas de camundongos infectados foi correlacionada com a capacidade dessas células em produzir reativos intermediários do oxigênio.

Apesar de estas células serem importantes na defesa contra o *P. brasiliensis*, Pina *et al.*⁵², 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.

Pelo exposto, os trabalhos experimentais realizados no modelo murino sobre PCM, demonstram que linhagens diferentes dentro da mesma espécie podem apresentar maior ou menor suscetibilidade à infecção, envolvendo complexas interações entre a imunidade inata e adquirida, sendo que a influência de cada um destes compartimentos na determinação da resistência a infecção não está completamente esclarecido.

A potencialidade das respostas inflamatórias ou de resposta imune específica são caracteres complexos, que variam de forma contínua e têm uma distribuição normal numa população heterogênea, pois estão sob controle

poligênico, ou seja, são regulados pela interação aditiva de vários *loci* gênicos que segregam independentemente ⁵³.

O Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan vem desenvolvendo linhagens de camundongos visando o estudo da regulação genética da imunidade específica e natural. A partir de populações heterogêneas quanto à expressão de caracteres como a capacidade de produção de anticorpos contra antígenos complexos ou de reatividade inflamatória aguda obteve-se, pelo processo de seleção genética bidirecional, linhagens que expressam extremos desses fenótipos.

A seleção genética foi realizada através de várias gerações de acasalamentos entre os indivíduos que expressavam os fenótipos extremos do caráter estudado. Evitando cruzamentos consangüíneos, buscou-se atingir o máximo de separação fenotípica entre essas linhagens, ponto em que, admite-se que os alelos com efeito aditivo e oposto na determinação do caráter, estejam segregados em homozigose nas respectivas linhagens (limite de seleção).

O processo de seleção promove uma progressiva divergência entre as linhagens com concomitante redução da variância fenotípica intralinhagem. As linhagens selecionadas expressam fenótipos extremos não encontrados na população inicial, devido ao efeito aditivo de vários *loci* gênicos, responsáveis pela alta e baixa resposta, que são acumulados nas respectivas linhagens, durante o processo seletivo ⁵⁴.

A resposta inflamatória representa o componente não específico da resposta do hospedeiro e apesar de estar bem caracterizada bioquímica e fisiopatologicamente, pouco se conhece sobre seu controle genético. Com este fim, foram desenvolvidas linhagens de camundongos geneticamente selecionadas

para a resposta inflamatória aguda (AIR) através do processo de seleção genética bidirecional.

Uma população geneticamente heterogênea obtida através do inter cruzamento das linhagens isogênicas A, DBA2, P, SWR, SLJ, CBA, BALB/c e C57BL/6, onde cada indivíduo possui a combinação aleatória de 12,5% do conjunto gênico de cada uma das oito linhagens isogênicas originais, constituiu a população inicial (F0) da seleção AIR, a qual apresentou um perfil de distribuição normal quanto ao caráter intensidade de resposta inflamatória aguda ⁵⁵.

A quantificação desta resposta foi feita considerando-se os parâmetros da concentração da proteína extravasada e do número de leucócitos infiltrados no exsudato formado após injeção subcutânea de partículas de poliacrilamida (Biogel P100), segundo modelo de Fauve *et al.* ⁵⁶. Utilizou-se essa substância insolúvel, não biodegradável e não antigênica, objetivando assim excluir a possibilidade do envolvimento da resposta imune específica na caracterização do fenótipo em estudo.

A diferença entre as linhagens no número de leucócitos infiltrantes ao foco inflamatório é em torno de 10 vezes, enquanto que na quantidade de proteína extravasada esta diferença é em torno de duas vezes. Estimou-se que a divergência progressiva no fenótipo destas linhagens resulta da interação de 11 *loci* gênicos independentes, com efeito aditivo para o caráter ⁵⁷.

O fenótipo que sofreu grande modificação nestas linhagens foi a habilidade em recrutar células PMN para o foco inflamatório. Na população inicial estas células perfaziam um total de 71% dos leucócitos infiltrados e após a divergência entre as linhagens, a população de PMN no exsudato da linhagem AIRmax perfazia 95%, enquanto que nos AIRmin este percentual decresceu para 45% ⁵⁸.

A diferença nos parâmetros da AIR entre os animais AIRmax e AIRmin, ocorreu para outros agentes inflamatórios não relacionados entre si ou com o Biogel (agente selecionador), como o zymozan, a carragenina ⁵⁹ e ao veneno de *Bothrops jararaca* ⁶⁰.

Possíveis modificações na resposta imunológica específica foram investigadas e a análise da produção de diferentes isótipos de anticorpos frente a antígenos complexos revelou ser semelhante em ambas as linhagens, exceto pela maior produção nos animais AIRmax de IgE, cuja biossíntese 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 ⁶¹.

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, as linhagens AIR mostraram diferença quanto a resistência a infecções por *S. typhimurium* e por *Listeria monocytogenes*, sendo a linhagem AIRmax significativamente mais resistente do que os AIRmin, sugerindo que a capacidade de resposta inflamatória influenciou na resistência destes animais ⁶¹.

Respostas inflamatórias são controladas por citocinas ou outros mediadores, assim, sob infecções sistêmicas causadas por fungos, o ácido araquidônico (AA) pode ser liberado sobre os fosfolipídeos de membrana de diferentes tipos celulares, incluindo neutrófilos, e por um processo de

cicloxigenação e lipoxigenação enzimáticas, são produzidos prostaglandinas e leucotrienos (LTs), respectivamente.

Leucotrienos são mediadores lipídicos derivados dos metabólitos do AA pela via da 5-lipoxigenase (5-LO). Estes têm como principal função a quimiotaxia para neutrófilos e eosinófilos⁶²⁻⁶³, e são liberados após ativação celulares por patógenos ou mediadores solúveis. Estes estímulos causam um distúrbio da membrana celular que leva ao aumento de cálcio intracelular que resulta na translocação da fosfolipase A₂ citosólica (cPLA₂) para as membranas nuclear e plasmática. Este processo culmina na liberação do AA dos fosfolípidios de membrana. O AA liberado pode ser metabolizado por diversas vias dando origem as prostaglandinas, tromboxanos, lipoxinas, 15-HPETE e aos LTs, substâncias chamadas coletivamente de eicosanóides. Para que ocorra a síntese de LTs o AA liberado é transformado no envelope nuclear em ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico (5-HPETE) que, por ser instável, é rapidamente convertido em leucotrieno A₄ (LTA₄) pela ação da 5-LO. Essa enzima é transposta do citosol para a membrana nuclear e ativada pela Proteína Ativadora da 5-lipoxigenase (FLAP). Ao final da via da 5-LO, o LTA₄ é enzimaticamente hidrolisado e transformado em LTB₄, pela ação da LTA₄ hidrolase, ou em LTC₄ intracelular pela ação da enzima LTC₄ sintase, que catalisa a conjugação de LTA₄ com glutathione reduzida. LTC₄ intracelular é transportado através da membrana e convertido, pela ação da gama-glutamil transferase em LTD₄ e LTE₄⁶⁴. Para que ocorram as ações biológicas do LTB₄, é necessária a sua ligação a receptores de membranas, BTL₁ e BTL₂, acoplados a proteína G. O BTL₁ é o receptor de alta afinidade (K_d ≈ 0.4nM) que parece ser responsável pela atividade quimiotática e quimiocinética, enquanto que o BTL₂ é um receptor de baixa afinidade que parece

mediar a liberação de enzimas lisossomais e o aumento do metabolismo oxidativo, apesar de também promover quimiotaxia ^{65,66,67}.

Os LTs são secretados por diferentes células, entre elas macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos ⁶⁸⁻⁶⁹. Dentre essas células destacam-se os MA residentes, que são células responsáveis pela manutenção da esterilidade do espaço alveolar ⁷⁰ e cuja capacidade fagocítica, microbicida e de síntese de LTs, excede à dos macrófagos de outros tecidos. LTs estão envolvidos na patogênese de uma variedade de desordens inflamatórias do pulmão, incluindo asma ⁷¹ e doenças infecciosas do trato respiratório ⁷²⁻⁷³. Esses mediadores são produzidos rapidamente após o estímulo, pois a maquinaria enzimática para síntese destes compostos é constitutiva nas células mielóides. Nesse aspecto, LTs diferem dos mediadores protéicos, que requerem síntese “de novo”, e portanto são produzidos horas após a estimulação celular ⁷⁴.

Embora esteja bem estabelecido o papel de LTs como ativador celular e fator quimiotático para neutrófilos e eosinófilos ^{62,63,75} pouco se sabe ainda sobre o papel destes mediadores na defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos. Alta concentração LTB₄ foi detectada no fluído do LBA de pacientes com pneumonia bacteriana ⁷⁶, com infecções pelo vírus influenza A ⁷⁷, pelos vírus da hepatites A e B ⁷⁸ e vírus Epstein-Barr (EBV) ⁷⁹. Além disso, a produção de LTB₄ está diminuída no sobrenadante de cultura de leucócitos infectados com vírus da septicemia hemorrágica (VHSV), sendo observado diminuição na replicação viral após adição exógena de LTB₄ ⁸⁰. Medeiros *et al.* ⁸¹, demonstrou aumento na síntese de LTB₄ e LTC₄ no pulmão de camundongos infectados com *H. capsulatum*. Além disso, alguns autores relataram que pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) apresentam aumento da suscetibilidade às infecções pulmonares

devido à deficiência na síntese de LTs⁸²⁻⁸³. Nestes indivíduos, a deficiência na produção de LTs está associada com a redução na expressão da FLAP⁸³⁻⁸⁴. Macrófagos alveolares e PMN obtidos destes indivíduos apresentaram atividade microbida reduzida para *Cryptococcus neoformans*, sendo que a adição exógena de LTB₄ reverteu esta deficiência⁸³.

A realização de experimentos utilizando camundongos que não possuem o gene funcional da enzima 5-LO^{-/-} permitiu a investigação precisa do papel dos LTs nos diferentes processos de ativação celular. O aumento da suscetibilidade dos animais 5-LO^{-/-} às infecções pulmonares, também parece estar associado à deficiência na fagocitose e atividade microbida dos MA. A adição exógena de LTB₄ a culturas de MA obtidos de animais 5-LO^{-/-} aumentou a capacidade fagocítica dos mesmos⁷³. Medeiros *et al.*⁸¹ demonstrou que a depleção deste mediador na infecção experimental por *Histoplasma capsulatum*, resultou na morte de 100% dos animais, até 30 dias após a infecção.

Alguns autores têm sugerido ainda a participação dos LTs na formação e manutenção de granulomas. Yoshino⁸⁵ demonstrou que a formação de granulomas induzido por polímeros isolados da parede celular de *Streptococcus sp* também é dependente de LTB₄ e PGE₂. Outros autores descreveram ainda que MA, obtidos do LBA de pacientes com sarcoidose, liberaram grandes quantidades de LTs, sugerindo que estes mediadores contribuem localmente para a formação de granulomas⁸⁶. Medeiros *et al.*⁸¹ demonstrou importante papel de LTs na formação de granulomas na histoplasmose, uma vez que a ausência deste mediador inibiu a formação de granulomas compactos, resultando na multiplicação e disseminação do *H. capsulatum* para o baço e aumento da mortalidade dos animais. Estes resultados sugerem o importante papel de LTs na ativação celular e

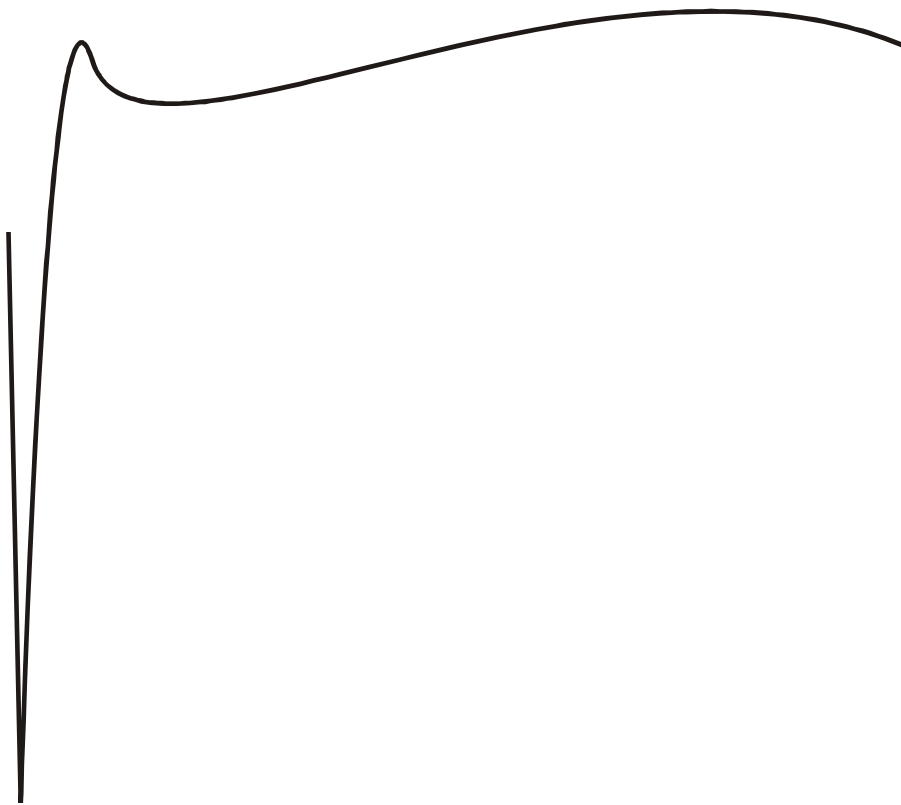
regulação da atividade microbicida de fagócitos e consequentemente na proteção contra diferentes agentes infecciosos.

Estudos utilizando antagonistas, inibidores da síntese de LTs e mais recentemente animais 5-LO^{-/-}, sugerem importante papel imunomodulatório de LTs na síntese de diferentes mediadores nos processos infecciosos^{70,74,81}. Neste contexto foi demonstrado que o aumento da suscetibilidade às infecções pulmonares em animais 5-LO^{-/-} e em indivíduos infectados pelo HIV está associado com a ausência de LTs e sua modulação na síntese de citocinas. Por outro lado, o tratamento de pacientes, portadores do vírus HIV, com GM-CSF restaurou a capacidade de síntese de LTs e aumentou a atividade microbicida dos PMN, *in vitro*, contra *Mycobacterium avium* e *C. neoformans*⁸³. Também, Morita *et al.*⁸⁷ descreveram que células do baço estimuladas com anti-CD3 e incubadas com antagonista do receptor de LTs, o composto FK506, apresentaram inibição da proliferação celular e da síntese de IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-12. No entanto, Vellenga *et al.*⁸⁸ relataram que monócitos estimulados com LPS na presença de um inibidor da síntese de LTC₄, o composto MK 571, liberaram entre três a cinco vezes mais IL-1 e IL-6, do que monócitos apenas estimulados com LPS. Também células do baço, provenientes de animais infectados com *H. capsulatum* e tratados com MK 886, um inibidor da síntese de LTs, produziram menos IFN- γ e IL-12. Por outro lado, o tratamento dos animais infectados com MK 886 induziu aumento de TNF- α , IL-1, KC e IL-6 e da expressão do RNAm das quimiocinas RANTES, MIP-1 α , MIP-2, IP-10, MCP-1⁸¹ e TCA-3 quando comparado com animais infectados não tratados⁸¹. Estes resultados demonstram que LTs estão envolvidos na regulação da síntese de citocinas inflamatórias e imunes, assim como, na expressão de

quimiocinas, sugerindo um importante papel deste mediador na histoplasmose e outras micoses pulmonares.

Além do papel imunomodulador de LTs na síntese de citocinas e quimiocinas, sabe-se que estes mediadores lipídicos contribuem para a produção de óxido nítrico (NO), uma substância crítica para o controle da replicação de diferentes agentes infecciosos como fungos, bactérias e vírus ⁸⁹. Trabalhos recentes descreveram que a ausência de LTs pode modular a síntese de NO ⁹⁰⁻⁹¹. Medeiros *et al.* ⁸¹ demonstraram que células do LBA de animais infectados com *H. capsulatum*, quando estimuladas com LPS e IFN- γ , produziram níveis elevados de NO, e que a ausência de LTs, resultante do tratamento dos animais infectados com MK 886, inibiu a síntese de NO sete e 15 dias após a infecção. Estes dados sugerem que LTs, além de modular a síntese de citocinas e quimiocinas, também regulam a produção de óxido nítrico.

Sendo a PCM uma doença inflamatória que tem o pulmão como órgão alvo e que sua contenção está intrinsecamente relacionada à migração de PMN para o foco infeccioso, e que o NO é a molécula responsável pelo efeito citotóxico exercido por macrófagos sobre o *P. brasiliensis*, torna-se interessante estudar o efeito de LTs no curso da infecção; e pela grande diferença no potencial inflamatório nos animais da seleção AIR, consideramos que esta linhagem constituiu um modelo interessante e original para avaliarmos a PCM pulmonar murina.



Objetivos

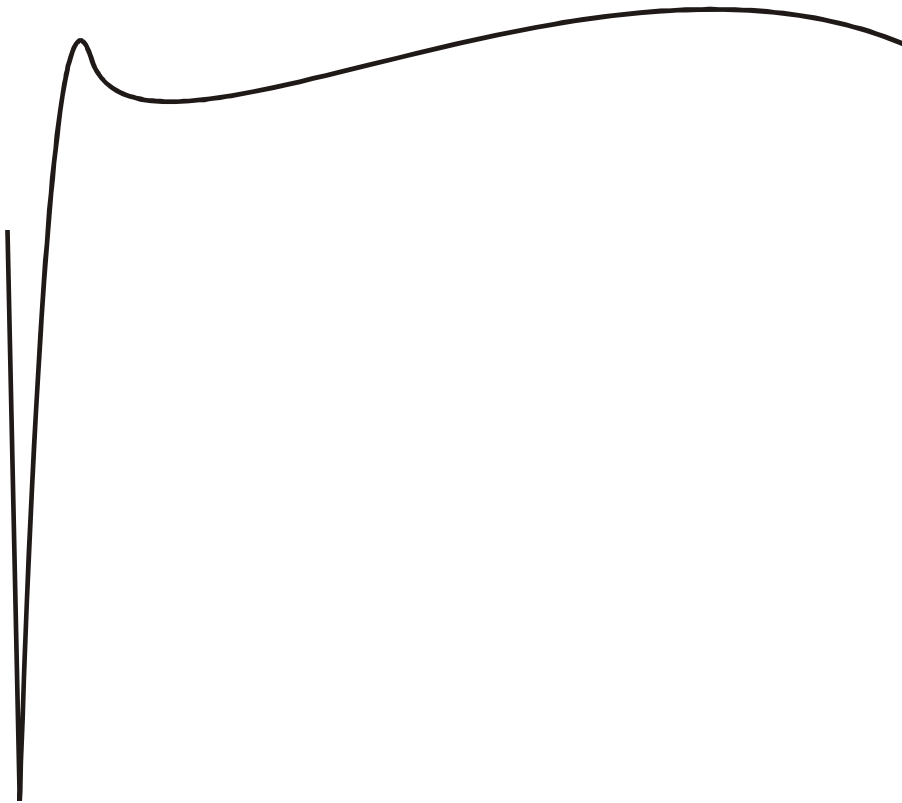


2. OBJETIVOS

Avaliar o efeito de leucotrienos no processo inflamatório decorrente da infecção por *Pararacoccidioides brasiliensis* em camundongos selecionados para resposta inflamatória máxima (AIRmax) e mínima (AIRmin).

Para tanto, desenvolvemos a seguinte programação:

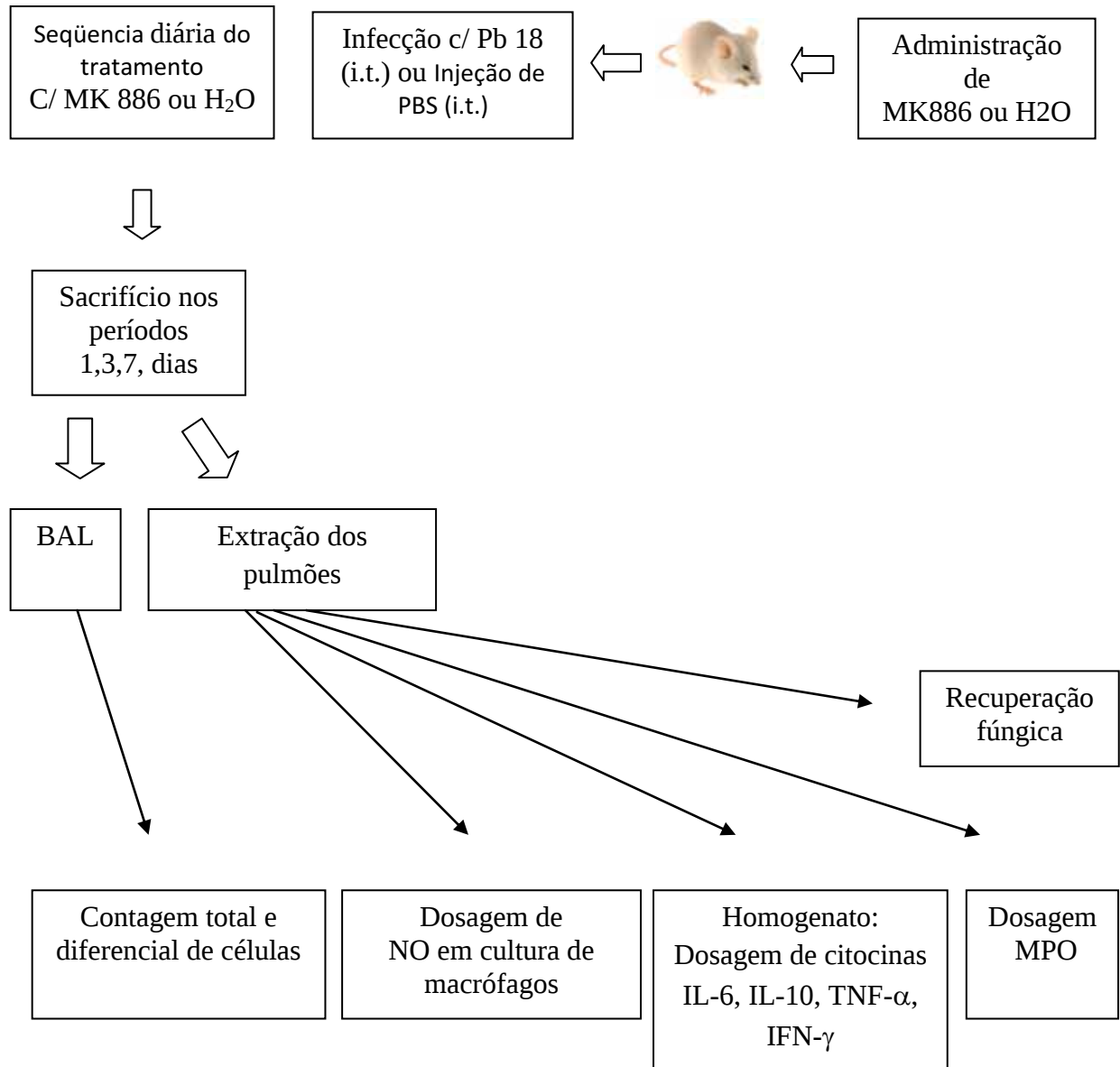
1. Avaliar a cinética do recrutamento celular para os pulmões de animais infectados com *P. brasiliensis* tratados ou não com inibidor da síntese de leucotrienos (MK 886);
2. Avaliar as unidades formadoras de colônias (UFC) nos pulmões de animais infectados com *P. brasiliensis* tratados ou não com MK 886;
3. Determinar citocinas relacionadas ao padrão de resposta imune celular em pulmões de animais infectados com *P. brasiliensis* tratados ou não com MK 886;
4. Determinar a produção de NO pelas células pulmonares de animais infectados com *P. brasiliensis* tratados ou não com MK 886;
5. Determinar a atividade de mieloperoxidase (MPO) pelas células pulmonares de animais infectados com *P. brasiliensis* tratados ou não com MK 886;

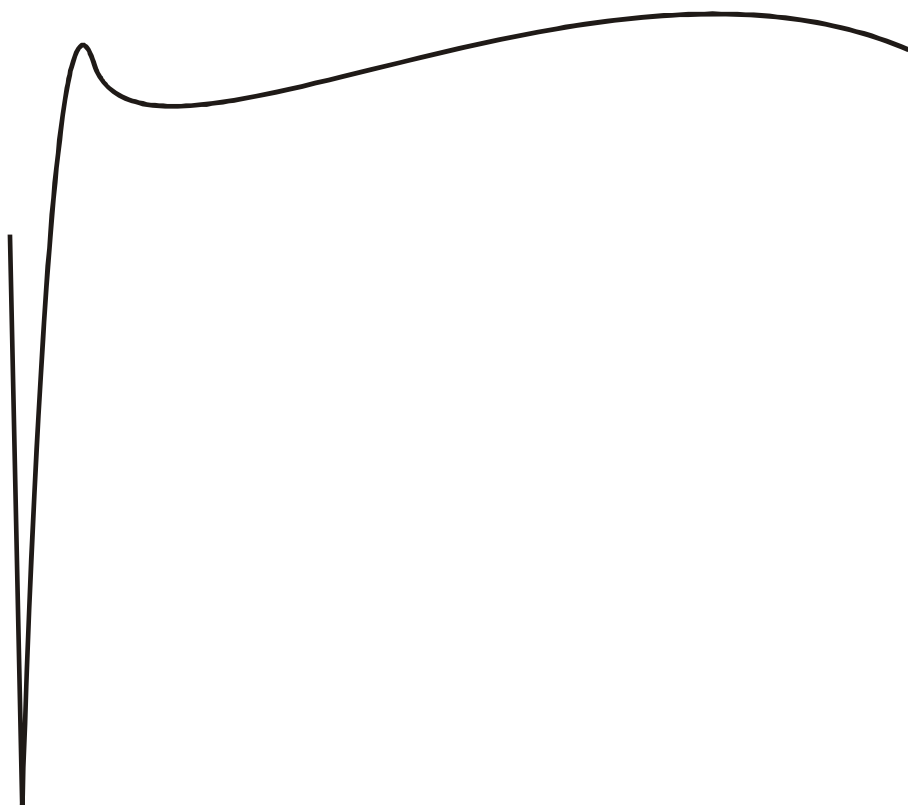


*Delineamento
Experimental*



3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL





Material e Métodos



4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos das linhagens geneticamente selecionadas para máxima (AIRmax) e mínima (AIRmin) reatividade inflamatória aguda, com 8-12 semanas de idade, provenientes do Biotério do Departamento de Imunogenética do Instituto Butantan e mantidos no Laboratório de Experimentação Animal do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu. Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Medicina de Botucatu (protocolo n. 537/2006)

4.2. Cultivo do *P. brasiliensis*

Foi utilizada a forma leveduriforme da cepa 18 do fungo *P. 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 seis dias de cultivo.

4.3. 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 três ciclos de 10 segundos

cada. A seguir, a suspensão de leveduras foi mantida a 37°C durante cinco minutos, para sedimentar grumos não desfeitos durante a agitação. O sobrenadante contendo células isoladas ou com poucos brotamentos foi colhido e a viabilidade das células fúngicas, estabelecida por contagem em câmara hemocitométrica, tipo *Neubauer*, em microscópio de contraste de fase. Foram consideradas como células viáveis às de aspecto brilhante e refringente, uma vez que as células mortas mostraram-se opacas e de coloração escura. Após a contagem, a concentração de células fúngicas foi padronizada para 1×10^7 leveduras viáveis/mL. Foram empregadas para inóculo, culturas de *P. brasiliensis* que apresentaram, pelo menos, 80% de viabilidade.

4.4. Infecção pulmonar com *P. brasiliensis* através da inoculação intratraqueal (i.t), 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.

4.5. Tratamento com o composto MK 886, inibidor da síntese de leucotrienos

O Composto MK 886 ou L-663,536 (3 [1-(4-clorobenil)-3-t-butil-tio-5-isopropilindol-2-yl]-2,2-ácidodimetilprpoanóico) é um potente inibidor da síntese de LTs, tanto *in vivo* como *in vitro*, não tendo efeito em outras vias do AA. Sua ação

de dá na translocação da 5-LO e bloqueio de sua subsequente ativação, evitando assim a biossíntese celular desse metabólito ⁹². O MK 886 doado pela Merck Frosst, Canadá Inc, foi diluído segundo instruções do fabricante, em 100 uL de etanol absoluto (Merck, Montreal, Canadá) e acrescido de água, de modo a se obter a solução de tratamento ⁸¹. Os animais foram tratados diariamente com 5mg/kg em 0,5mL por via oral, sendo a primeira e a última dose administradas 1 hora antes da injeção dos estímulos e sacrifícios dos animais, respectivamente. Como controle experimental, animais injetados i.t. com PBS ou infectados com *P. brasiliensis* foram tratados diariamente com o mesmo volume de etanol e água.

4.6. Obtenção, contagem total e diferencial das células do LBA

As células do LBA foram obtidas através da inserção na traquéia de um cateter acoplado a uma seringa contendo 1 ml de solução de PBS estéril. Esse procedimento foi repetido três 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* em 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).

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

Animais infectados com *P. brasiliensis*, tratados ou não com MK 886 foram sacrificados após 1, 3 e 7 dias de infecção e tiveram parte do pulmão esquerdo retirado e submetido à pesagem em placas de Petri (Falcon, B-D, Franklin Lakes, N.J.). Após a pesagem os fragmentos pulmonares foram transferidos individualmente para graal de porcelana, sendo macerados com auxílio de pistilo e homogeneizados em 1 mL de solução salina estéril. Alíquotas de 100 µL dessa suspensão foram semeadas, em duplicatas, com auxílio de bastões de vidro em L, em placas de Petri 20 x 100 mm, contendo Brain Heart Infusion Agar (BHI), suplementado com 5% de fator de crescimento (filtrado de cultura de células leveduriformes da cepa 192 de *P. brasiliensis*, cultivada sob agitação a 36°C em meio de Casals, durante 7 dias ; 4% de soro eqüino; 50 mg/mL de gentamicina). A seguir, as placas de Petri foram vedadas e incubadas a 36,5°C e as colônias contadas diariamente até que nenhum aumento em UFC fosse observado. O resultado foi expresso pelo número de UFC por g de órgão (log 10).

4.8. 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* ou injeção i.t. com PBS, tratados ou não com MK 886, os mesmos foram sacrificados nos períodos de 1, 3 e 7 dias após a infecção. Após a coleta do exsudato do LBA, os pulmões foram retirados e submetidos à homogeneização utilizando peneiras de *nylon*. 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 congelado a -70°C para posterior dosagem de

citocinas, o botão celular foi ressuspensionado em 1 mL de RPMI-I e as células submetidas a cultivo, para posterior dosagem de NO.

4.9. Detecção de citocinas pelo Ensaio Imuno-Enzimático (ELISA)

A determinação da concentração de TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-10 foi realizada através de ensaio imunoenzimático (ELISA). Inicialmente foram adicionados 100 μ L de uma solução contendo tampão carbonato-bicarbonato (TCB) e anticorpos monoclonais diluídos conforme orientação do fabricante (BD Biosciences, San Diego, EUA) às placas de poliestireno (Maxisorp- Nunc, EUA) e incubadas “overnight” à 4°C em câmara úmida. Após cinco lavagens dos orifícios com solução salina tamponada (PBS) acrescido de Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO) 0,05%, ocorreu o bloqueio dos orifícios com soro bovino fetal em PBS (10%) para a saturação dos sítios de ligação e, em seguida, a placa foi incubada à temperatura ambiente por 1 hora. Após nova lavagem, os padrões recombinantes, em diluições crescentes para construção das curvas e as amostras foram adicionadas à placa e estas incubadas por duas horas a temperatura ambiente. Os orifícios foram novamente lavados e, o anticorpo de detecção policlonal biotinilado, foi adicionado ao conjugado estreptoavidina-peroxidase, incubando-se novamente por mais uma hora. Novas lavagens foram realizadas e, para revelação, foram adicionados 100 μ L da solução contendo o substrato (peróxido de hidrogênio) e tetrametilbenzidina (TMB). Após 30 minutos à temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 μ L de H₂SO₄ 4N. As leituras foram realizadas em leitor ELISA com filtro de 450 nm.

4.10 Cultura de macrófagos pulmonares

Os homogeneizados pulmonares colhidos como descrito no item 3.8 tiveram a concentração acertada em câmara de *Neubauer*, após coloração com vermelho neutro, para 2×10^6 células/mL. A seguir, 0,1mL dessa suspensão foram distribuídos em placas de microcultura de 96 orifícios de fundo chato. Essas células foram incubadas a 37°C em tensão de 5% de CO₂ por 24 horas, para coleta de sobrenadantes para dosagem de NO.

4.11 Detecção de Nitrito (NO₂⁻) em sobrenadante de cultura de células pulmonares

A detecção da produção de NO foi avaliada através da dosagem de nitrito (NO₂⁻) pelo método de *Griess*. Para a dosagem de nitrito, 100 µL de sobrenadante da cultura de células dos homogeneizados de pulmões foram adicionados a 100 µL do reagente de *Griess* 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 (H₃PO₄) 5%. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, a densidade ótica (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 construída na mesma placa a curva padrão contendo nitrito em concentrações variando entre 200 a 3 µM de nitrito de sódio. A quantidade de nitrito das amostras foi correlacionada aos valores de absorbância obtidos na curva padrão.

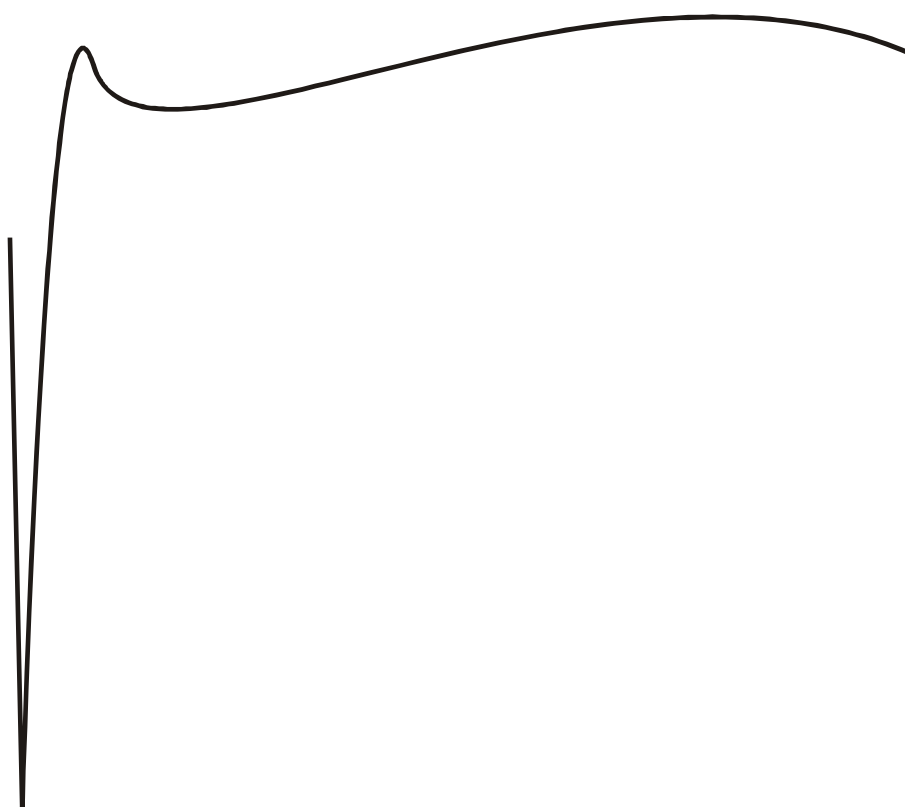
4.12. Determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO)

Para a determinação da atividade de MPO, foi realizado o seguinte procedimento: após a infecção i.t. dos camundongos com *P. brasiliensis*, tratados ou não com MK 886, os mesmos foram sacrificados nos períodos de 1, 3 e 7 dias após a infecção. Após a coleta do exsudato do LBA, fragmentos dos pulmões foram retirados e armazenados a -70°C até o momento da dosagem. Após o descongelamento, eles foram lavados em PBS e homogeneizados durante 40 segundos em politron (Brinckman) na presença de 1 mL de Brometo de Hexadeciltrimetilamônio (HTAB) a 0,5% em EDTA 10mM. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12000g durante 10 minutos à 4°C . A atividade de MPO foi determinada no sobrenadante.

O ensaio de MPO foi conduzido adicionando 10 uL da amostra em duplicata em placa de 96 poços e 200 uL de tampão substrato constituído de: tampão fosfato a 50mM, pH 6.0, peróxido de hidrogênio a 0,1%, orto-dianisidina 1,3% em H_2O . Os valores de atividade de MPO foram expressos pelo valor das absorbâncias obtidas a 450nm em leitor de ELISA (Bio-Tek Instruments).

4.13 Análise estatística

Os resultados são 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 $p < 0,05$.



Resultados

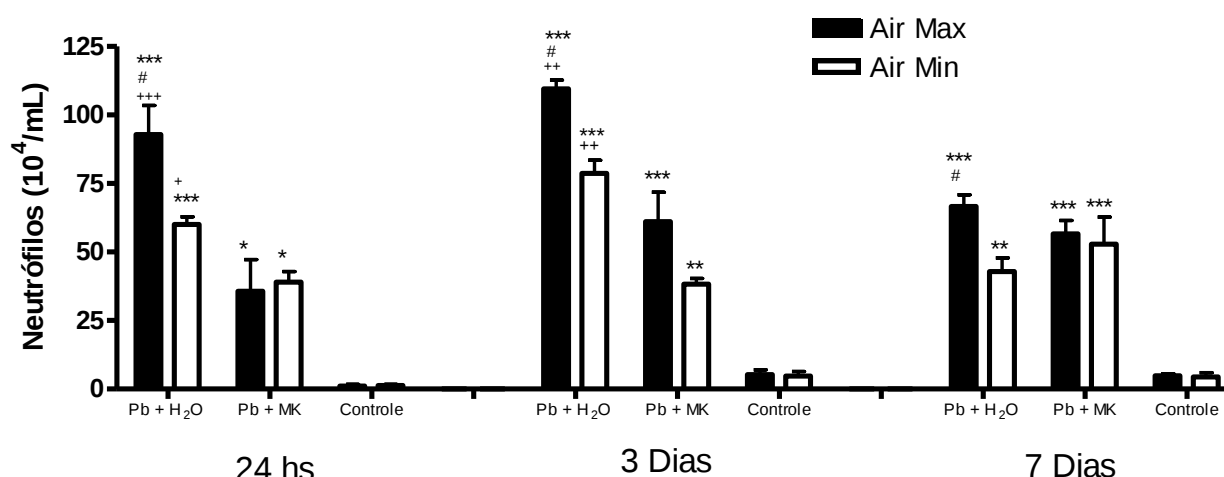


5. RESULTADOS

5.1 Caracterização do recrutamento de leucócitos para a cavidade broncoalveolar

Inicialmente tivemos como objetivo analisar qualitativamente e quantitativamente as células inflamatórias recrutadas na fase aguda da PCM murina. Desta forma, avaliamos a cinética de migração celular para o espaço broncoalveolar dos animais inoculados i.t. com *P. brasiliensis*. Posteriormente, avaliamos o envolvimento de leucotrienos no recrutamento celular na infecção aguda induzida por *P. brasiliensis* nas diferentes linhagens. Para tanto animais infectados foram tratados com MK 886, um inibidor da síntese de leucotrienos. A Figura 1 mostra o influxo de neutrófilos para o espaço broncoalveolar no 1º, 3º e 7º dia de infecção pelo fungo. A infecção i.t. com *P. brasiliensis* induziu migração significativa de neutrófilos em ambas linhagens nos três períodos analisados comparando com seus respectivos controles, que receberam PBS pelo mesmo processo cirúrgico e foram tratados por via oral com H₂O. Comparando a linhagem AIRmax nos diferentes grupos, observamos um maior influxo de neutrófilos no grupo de animais que foram somente infectados com o *P. brasiliensis* sem tratamento com MK 886 no 1º e 3º dia após a infecção em relação ao grupo infectado e tratado, no 7º período houve uma diminuição na migração celular e não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Comparando a linhagem AIRmin nos diferentes grupos, animais pertencentes ao grupo de infectados e não tratados com MK 886, também recrutaram mais células em relação ao grupo infectado e tratado, com significância estatística no 1º e 3º dia após a infecção, no 7º período não foi observada diferença

estatística entre os AIRmin. Na comparação interlinhagens (AIRmax x AIRmin) no grupo de infectados e não tratados com MK 886, AIRmax recrutaram mais neutrófilos em relação aos AIRmin nos três períodos estudados. No grupo de animais infectados e tratados com MK 886 não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as linhagens.



* diferença estatística dos animais infectados em relação ao respectivo controle * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

diferença estatística interlinhagens (AIRmax x AIRmin) no mesmo grupo # p < 0,05

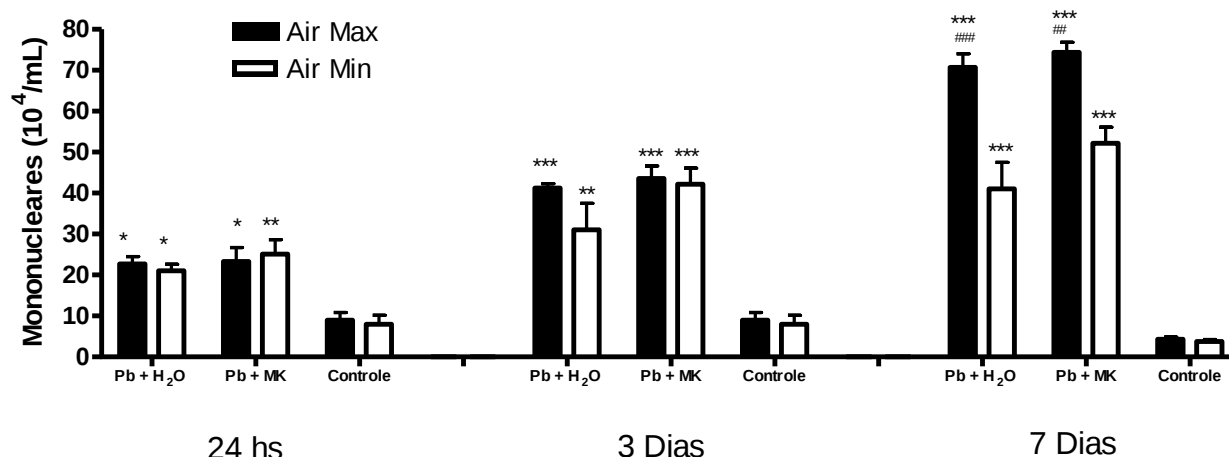
+ diferença estatística entre animais da mesma linhagem em grupos diferentes ++ p < 0,01; +++ p < 0,001

Figura 1. Número absoluto de neutrófilos no BAL de camundongos inoculados i.t. com 10^6 células leveduriformes de *P. brasiliensis* tratados ou não com MK 886. Animais controles receberam i.t 100 ul de PBS estéril. Os pulmões dos camundongos foram lavados com PBS 1, 3 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 material e métodos. Os resultados representam a média $\pm$ EPM obtidos de cinco animais por linhagem nos diferentes grupos avaliados em cada período.

O influxo de células mononucleares para o espaço broncoalveolar (Figura 2) em resposta a leveduras de *P. brasiliensis* nas diferentes linhagens nos diferentes grupos foi significativo nos três períodos de estudo, quando comparado com seus respectivos controles, o recrutamento de células mononucleares aumentou progressivamente atingindo o pico de migração 7 dias após a infecção, que foi o período máximo de observação.

Comparando a linhagem AIRmax nos diferentes grupos, observamos que não houve diferença estaticamente significativa nos três períodos de estudo, assim como na linhagem AIRmin. Na comparação interlinhagens, no grupo de animais infectados e não tratados com MK 886 foi observada diferença estaticamente significativa apenas no 7º período de estudo, onde os AIRmax recrutaram cerca de 70% mais células em relação aos AIRmin. No grupo de animais infectados e tratados com MK 886, a diferença estaticamente significativa também foi observada somente no 7º dia de infecção onde a linhagem AIRmax recrutou cerca de 40% mais células em relação a linhagem AIRmin.

Esses dados demonstram que a ausência de leucotrienos parece interferir no perfil de migração de neutrófilos nos períodos mais agudos da infecção, mas não influencia o perfil de migração de células mononucleares.



* diferença estatística dos animais infectados em relação ao respectivo controle * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$
 # diferença estatística interlinhagens (AIRmax x AIRmin) no mesmo grupo ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$

Figura 2. Número absoluto de células mononucleares no BAL de camundongos inoculados i.t. com 10^6 células leveduriformes de *P. brasiliensis* tratados ou não com MK 886. Animais controles receberam i.t. 100 μ L de PBS estéril. Os pulmões dos camundongos foram lavados com PBS 1, 3 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 material e métodos. Os resultados representam a média $\pm$ EPM obtidos de cinco animais por linhagem nos diferentes grupos avaliados em cada período.

5.2 Determinação da atividade da MPO no pulmão de camundongos infectados com *P. brasiliensis*, tratados ou não com MK 886

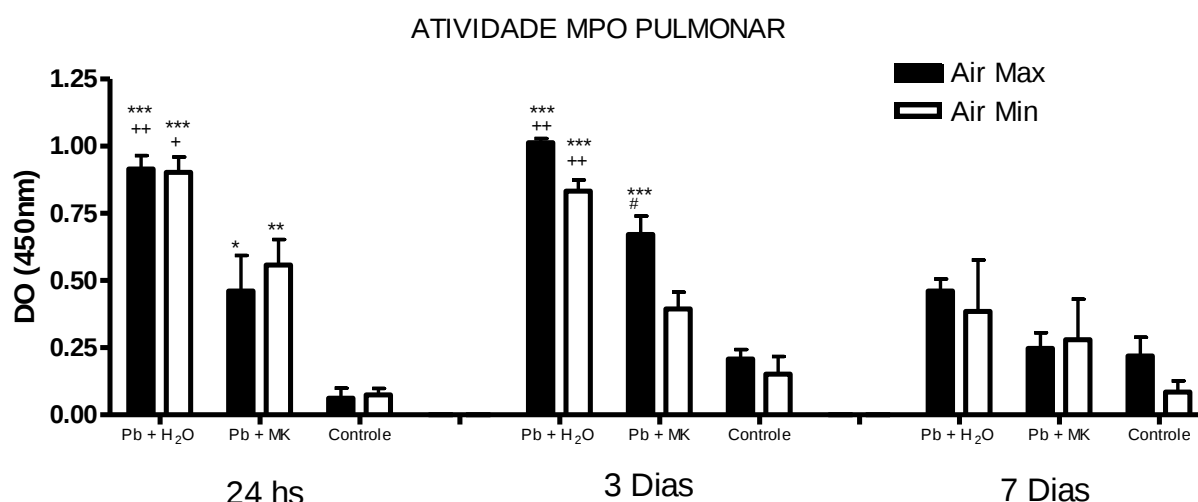
Para estudar o perfil da resposta inflamatória no pulmão de camundongos da linhagem AIR, avaliamos o infiltrado inflamatório celular induzido pela infecção i.t. do *P. brasiliensis* em 1, 3 e 7 dias. A determinação da atividade da MPO no pulmão caracteriza o infiltrado de neutrófilos. Animais controles receberam i.t., 100ul de PBS estéril.

Na figura 3 observamos que a infecção i.t. com *P. brasiliensis* induziu significativamente a atividade da MPO em ambas linhagens no 1º e 3º dia após a infecção, em comparação com seus respectivos controles, no 7º período não foi observada diferença entre animais infectados e seus respectivos controles. Comparando a linhagem AIRmax nos diferentes grupos, observamos uma maior atividade da MPO no grupo de animais que foram somente infectados com o *P. brasiliensis* no 1º e 3º dia após a infecção em relação ao grupo infectado e tratado com MK 886, no 7º dia a atividade da MPO não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos assim como entre as linhagens. Na linhagem AIRmin, animais pertencentes ao grupo de infectados e não tratados com MK 886 apresentaram uma maior atividade da MPO também no 1º e 3º dia após a infecção em relação ao grupo de animais infectados e tratados. Em 7 dias a atividade da MPO não apresentou significância nesta linhagem assim como nos diferentes grupos.

Na comparação interlinhagens, a diferença estatística foi somente observada no 3º dia após a infecção no grupo de animais infectados e tratados com MK 886,

onde a atividade da MPO foi de aproximadamente 1,7 vezes maior a favor dos AIRmax.

Esses dados nos sugerem, assim como no recrutamento de neutrófilos, que a ausência de leucotrienos interfere na atividade da MPO nos períodos mais agudos da infecção.



* diferença estatística dos animais infectados em relação ao respectivo controle. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

diferença estatística interlinhagens (AIRmax x AIRmin) no mesmo grupo # $p < 0,05$

+ diferença estatística entre animais da mesma linhagem em grupos diferentes + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$

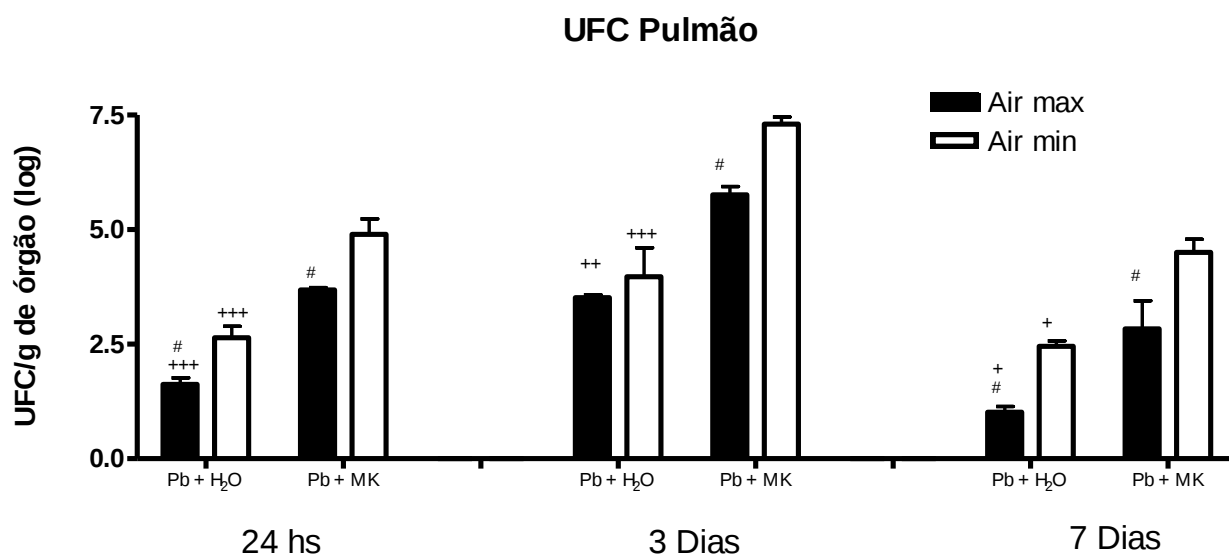
Figura 3. Atividade da MPO pulmonar por grama do órgão em camundongos inoculados i.t. com 10^6 células leveduriformes de *P. brasiliensis* tratados ou não com MK 886. Animais controles receberam i.t 100 ul de PBS estéril. A atividade da MPO foi calculada como descrito em material e métodos. Os resultados representam a média $\pm$ EPM obtidos de cinco animais por linhagem nos diferentes grupos avaliados em cada período.

5.3 Efeito do inibidor da síntese de leucotrienos MK 886, na multiplicação de leveduras nos pulmões de animais infectados com *P. brasiliensis*

A resistência à infecção por *P. brasiliensis* em animais tratados ou não com MK 886 foi analisada nas linhagens AIRmax e AIRmin através da obtenção do número de UFC a partir de macerados de fragmentos dos pulmões no 1º, 3º e 7º dia de infecção, figura 4.

Comparando a linhagem AIRmin nos diferentes grupos, nossos resultados demonstraram através da contagem do número de UFC, que o número de leveduras recuperadas nos pulmões, foi significativamente maior nos animais que receberam o tratamento com MK 886 nos três períodos analisados, tendo pico no 3º dia e um decréscimo ao 7º dia. Comparando a linhagem AIRmax nos diferentes grupos, o número de leveduras recuperadas nos pulmões, também foi maior nos animais que receberam o tratamento com MK 886 nos três períodos de análise.

Na comparação Interlinhagens, a linhagem AIRmin obteve maior recuperação fúngica em relação aos AIRmax em todos os grupos e em todos os períodos, apenas não apresentando diferença estatística no 3º período no grupo de animais infectados e não tratados com MK 886. Esses dados mostram que a linhagem AIRmin é mais suscetível a infecção e que leucotrienos parecem estar envolvidos no mecanismo de resistência/suscetibilidade na PCM murina.



diferença estatística interlinhagens (AIRmax x AIRmin) no mesmo grupo [#]p<0,05

+ diferença estatística entre animais da mesma linhagem em grupos diferentes ⁺p<0,05; ⁺⁺ p < 0,01; ⁺⁺⁺ p < 0,001

Figura 4. Recuperação de fungos viáveis, a partir de tecido pulmonar de camundongos inoculados i.t. com 10^6 células leveduriformes de *P. brasiliensis* tratados ou não com MK 886, após 1, 3 e 7 dias de infecção. Os resultados representam a média $\pm$ EPM obtidos de cinco animais por linhagem nos diferentes grupos avaliados em cada período.

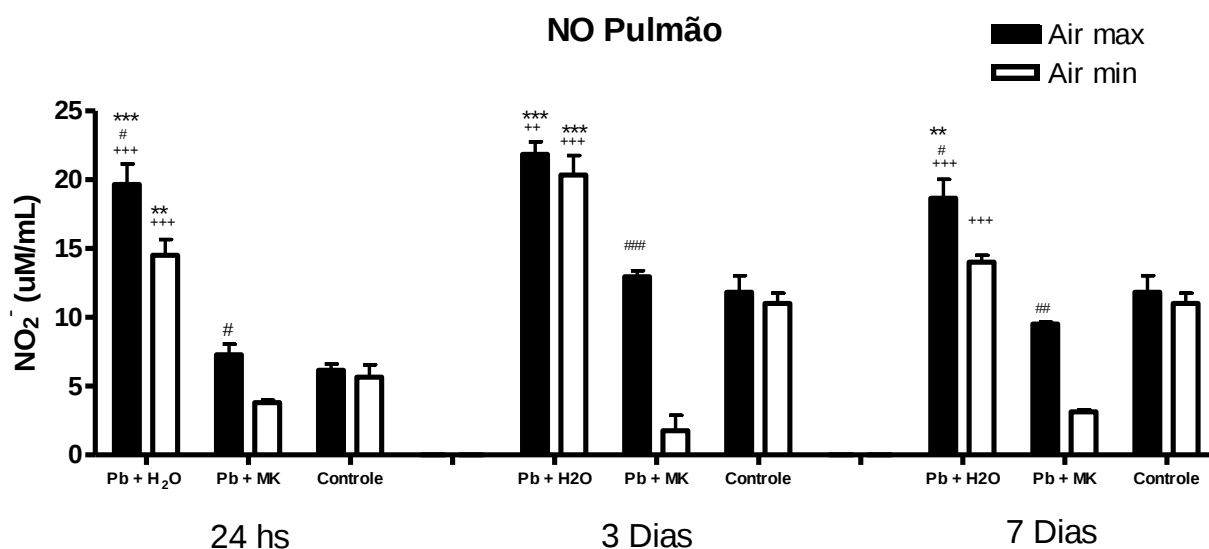
5.4 Concentração de óxido nítrico em sobrenadante de homogeneizados de pulmões obtidos de animais infectados por *P. brasiliensis* tratados ou não com MK 886

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 1, 3 e 7 dias de infecção, figura 5.

No grupo de animais infectados e não tratados com o inibidor da síntese de leucotrienos, ambas linhagens em relação aos seus respectivos controles, apresentaram maior produção de NO nos três períodos de estudo, com pico de produção no 3º dia; já no grupo de animais infectados e tratados com MK 886 não foi observada nenhuma diferença estatística em relação aos controles

Comparando a linhagem AIRmax nos diferentes grupos, animais pertencentes ao grupo infectados e não tratados com MK 886 em 1, 3 e 7 dias produziram significativamente mais NO em relação aos AIRmax do grupo de infectados e tratados, o mesmo aconteceu com a linhagem AIRmin na comparação entre grupos.

No grupo de animais infectados e tratados com MK 886, a linhagem AIRmax em relação a AIRmin apresentou maior produção de NO estatisticamente significante nos três períodos de estudo, no grupo de animais infectados e não tratados, essa diferença também foi observada a favor dos AIRmax, em 1 e 7 dias.



* diferença estatística dos animais infectados em relação ao respectivo controle ** p < 0,01; *** p < 0,001
 # diferença estatística interlinhagens (AIRmax x AIRmin) no mesmo grupo #p<0,05 ### p < 0,01; ### p < 0,001
 + diferença estatística entre animais da mesma linhagem em grupos diferentes ** p < 0,01; *** p < 0,001

Figura 5. Produção de NO_2^- nos sobrenadantes do homogenato pulmonar de animais infectados com 10^6 leveduras viáveis de *P. brasiliensis* tratados ou não com MK 886 e de animais controles injetados com PBS. Após 1, 3 e 7 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*. Os resultados representam a média $\pm$ EPM obtidos de cinco animais por linhagem nos diferentes grupos avaliados em cada período.

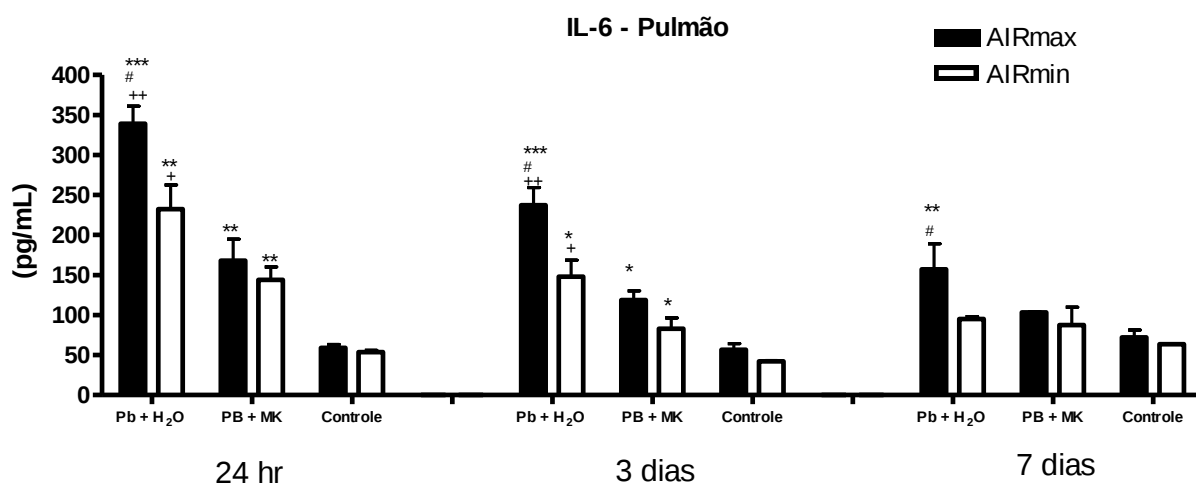
5.5. Produção de citocinas em sobrenadante de homogenatos de pulmões obtidos de animais infectados por *P. brasiliensis* tratados ou não com MK 886

O perfil de produção de, IL-6, IL-10, TNF α e IFN- γ foi avaliado por ELISA após 1, 3 e 7 dias de infecção por *P. brasiliensis* em homogenatos de pulmões.

5.5.1. Produção de IL-6

Os resultados obtidos com a produção de IL-6 no pulmão estão demonstrados na figura 6. O pico de produção desta citocina em animais infectados ocorreu no 1º dia, tendo um decréscimo ao longo dos demais períodos. Animais infectados de ambas linhagens tratados ou não com MK 886 apresentaram produção de IL-6 maior que seus respectivos controles em 1 e 3 dias após a infecção, no 7º dia essa diferença foi somente observada nos AIRmax do grupo infectado e não tratado com MK 886, esses dados mostram o *P. brasiliensis* como um forte estímulo para a produção de IL-6 e o MK 886 modulador desta citocina nos períodos mais agudos da infecção.

Comparando a linhagem AIRmax nos diferentes grupos, aqueles que não foram tratados com MK 886 produziram maior quantidade de IL-6 em relação aos tratados em 1 e 3 dias, comparando a linhagem AIRmin nos diferentes grupos animais não tratados produziram mais IL-6 em relação aos tratados também em 1 e 3 dias. Na comparação interlinhagens, no grupo de animais infectados e não tratados com MK 886, a detecção de IL-6 foi maior na linhagem AIRmax nos três períodos de estudo, no grupo de animais infectados e tratados com MK 886, a maior produção de IL-6 também foi observada a favor dos AIRmax nos três períodos de estudo apesar de não haver diferença estatística.

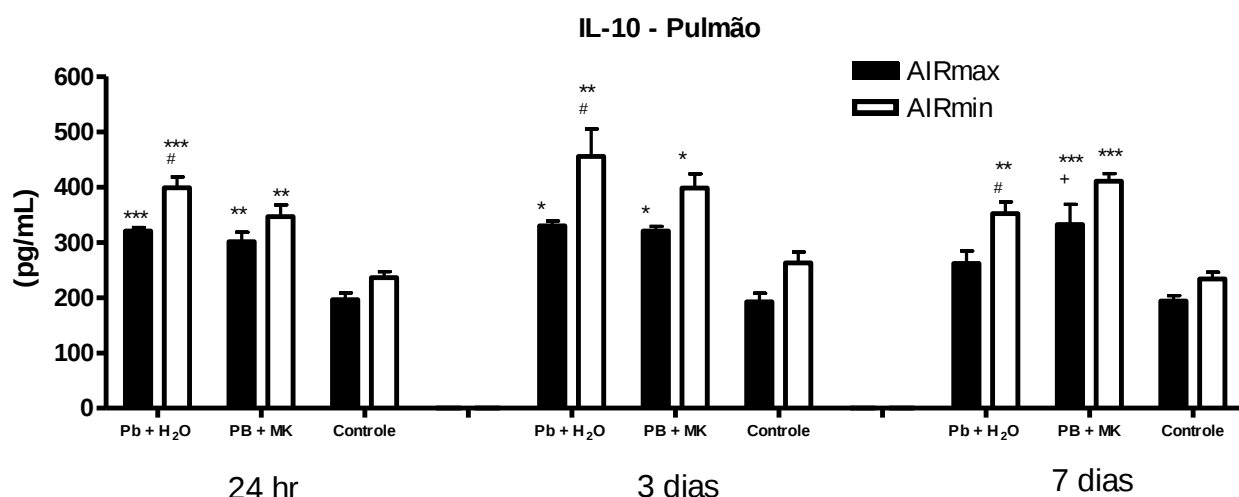


* diferença estatística dos animais infectados em relação ao respectivo controle * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$
 # diferença estatística interlinhagens (AIRmax x AIRmin) no mesmo grupo # $p < 0,05$
 + diferença estatística entre animais da mesma linhagem em grupos diferentes * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Figura 6. Determinação de IL-6 nos sobrenadantes do homogenato pulmonar de animais infectados com 10^6 leveduras viáveis de *P. brasiliensis*, tratados ou não com MK 886, animais controles receberam i.t., 100ul de PBS estéril. Após 1, 3 e 7 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. Os resultados representam a média $\pm$ EPM obtidos de cinco animais por linhagem nos diferentes grupos avaliados em cada período.

5.5.2. Produção de IL-10

Na Figura 7, são mostrados os resultados referentes à quantificação de IL-10. A infecção i.t. com *P. brasiliensis* induziu a produção desta citocina em ambas linhagens nos três períodos analisados, comparando com seus respectivos controles. No grupo de animais infectados e não tratados com MK 886, a linhagem AIRmin apresentou significativamente maior produção de IL-10 em relação a linhagem AIRmax em todos os períodos, no grupo de infectados e tratados com MK 886 este aumento de produção de IL-10 a favor dos AIRmin também foi observado, porem sem significância estatística. Na comparação de animais da mesma linhagem em grupos diferentes, animais AIRmin não apresentaram diferença entre si nos três períodos de estudo, já os AIRmax do grupo de infectados e tratados com MK 886 produziram significativamente mais IL-10 apenas no 7º dia de infecção em relação as AIRmax do grupo que foi somente infectado com o *P.brasiliensis*, nos demais períodos não foi observada diferença.



* diferença estatística dos animais infectados em relação ao respectivo controle * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

diferença estatística interlinhagens (AIRmax x AIRmin) no mesmo grupo # p < 0,05

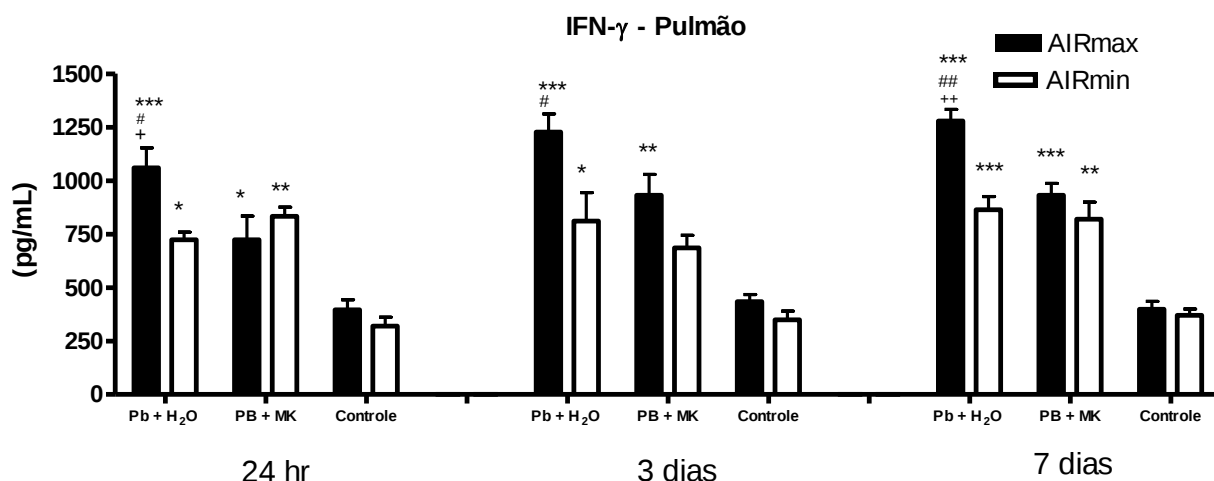
+ diferença estatística entre animais da mesma linhagem em grupos diferentes + p < 0,05

Figura 7. Determinação de IL-10 nos sobrenadantes do homogenato pulmonar de animais infectados com 10^6 leveduras viáveis de *P. brasiliensis*, tratados ou não com MK 886, animais controles receberam i.t., 100ul de PBS estéril. Após 1, 3 e 7 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. Os resultados representam a média $\pm$ EPM obtidos de cinco animais por linhagem nos diferentes grupos avaliados em cada período.

5.5.3. Produção de IFN- γ

Animais infectados de ambas linhagens tratados ou não com MK 886 apresentaram produção de IFN- γ maior que seus respectivos controles em 1, 3 e 7 dias após a infecção (figura 8). Comparando a linhagem AIRmax nos diferentes grupos, animais infectados e não tratados com MK 886 produziram mais IFN- γ em relação aos animais pertencentes ao grupo de infectados e tratados com MK 886 em 1 e 7 dias após a infecção. Comparando a linhagem AIRmin nos diferentes grupos, não foi observada diferença.

Na comparação interlinhagens, no grupo de animais infectados e não tratados com MK 886 a produção de IFN- γ foi significativamente maior na linhagem AIRmax nos três períodos de estudo. No grupo infectado e tratado com MK 886 essa diferença interlinhagens não foi constatada.



* diferença estatística dos animais infectados em relação ao respectivo controle. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

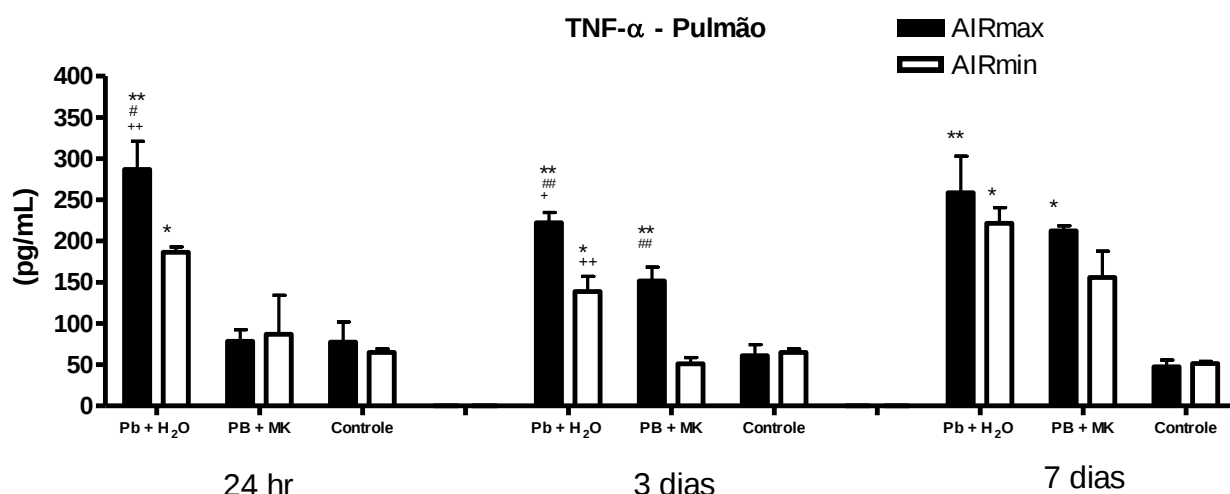
diferença estatística interlinhagens (AIRmax x AIRmin) no mesmo grupo # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$

+ diferença estatística entre animais da mesma linhagem em grupos diferentes + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$

Figura 8. Determinação de IFN- γ nos sobrenadantes do homogenato pulmonar de animais infectados com 10^6 leveduras viáveis de *P. brasiliensis*, tratados ou não com MK 886, animais controles receberam i.t., 100ul de PBS estéril. Após 1, 3 e 7 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. Os resultados representam a média $\pm$ EPM obtidos de cinco animais por linhagem nos diferentes grupos avaliados em cada período.

5.5.4. Produção de TNF- α

Na Figura 9, são mostrados os resultados referentes à quantificação de TNF- α . No grupo de animais infectados e não tratados com o inibidor da síntese de leucotrienos ambas linhagens apresentaram maior produção desta citocina nos três períodos de estudo em relação aos seus respectivos controles, no grupo de animais infectados e tratados com MK 886 apenas a linhagem AIRmax produziu mais TNF- α em relação aos seus respectivos controles em 3 e 7 dias após a infecção. Comparando a linhagem AIRmax nos diferentes grupos, aqueles que não tiveram tratamento com MK 886 produziram maior quantidade de TNF- α em relação aos tratados em 1 e 3 dias. Comparando a linhagem AIRmin nos diferentes grupos, a maior produção de TNF- α foi observada nos animais do grupo não tratado com MK 886, no 3º dia após a infecção.

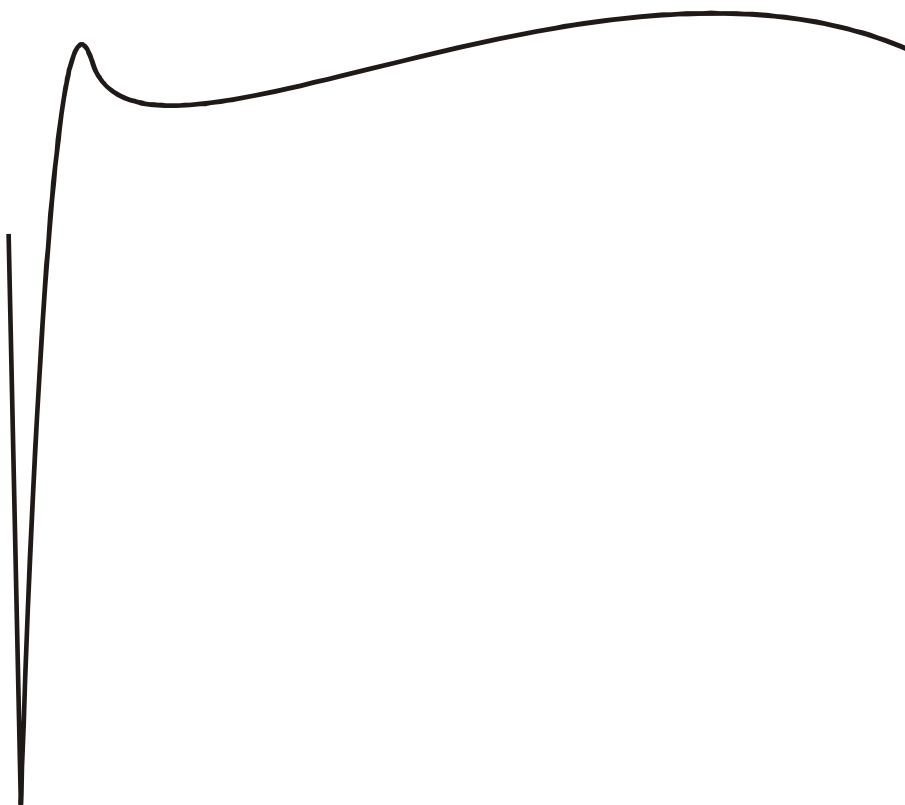


* diferença estatística dos animais infectados em relação ao respectivo controle * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

diferença estatística interlinhagens (AIRmax x AIRmin) no mesmo grupo # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$

+ diferença estatística entre animais da mesma linhagem em grupos diferentes + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$

Figura 9. Determinação de TNF- α nos sobrenadantes do homogenato pulmonar de animais infectados com 10^6 leveduras viáveis de *P. brasiliensis*, tratados ou não com MK 886, animais controles receberam i.t., 100ul de PBS estéril. Após 1, 3 e 7 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. Os resultados representam a média $\pm$ EPM obtidos de cinco animais por linhagem nos diferentes grupos avaliados em cada período.



Discussão



6. DISCUSSÃO

A caracterização do papel de leucotrienos nos processos infecciosos vem sendo amplamente estudado, indicando que este mediador não é somente um potente agente quimiotático envolvido no recrutamento celular, mas também um modulador dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Em nosso trabalho investigamos o envolvimento de leucotrienos na PCM pulmonar em camundongos selecionados segundo a reatividade inflamatória aguda a microesferas de poliacrilamida (Biogel) no tecido subcutâneo. Resultados obtidos nesse trabalho demonstraram que leucotrienos tem importantes funções na modulação da resposta inflamatória e na indução da resposta imune nesta micose.

Nosso primeiro passo foi avaliar se a ausência de leucotrienos na PCM pulmonar poderia interferir no padrão de migração celular nas linhagens AIR. Nossos resultados demonstraram que a infecção i.t. com *P. brasiliensis* induziu intensa reação inflamatória local com predominância de neutrófilos nos primeiros três dias de infecção seguido de um maior influxo de células mononucleares no 7º dia de infecção. Em animais tratados com inibidor da síntese de leucotrienos observamos um menor influxo de neutrófilos nos primeiros três dias de infecção em comparação com os animais apenas infectados com *P. brasiliensis*. O influxo de neutrófilos foi também demonstrado em análise da atividade da MPO em células pulmonares de animais infectados, tratados ou não com MK 886, e esta atividade acompanhou de maneira geral os resultados obtidos referentes à migração neutrofílica para o espaço broncoalveolar.

Os leucócitos polimorfonucleares são células imunoprotetoras na PCM 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* ⁵². 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 ^{93,94,95}. 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. Além de suas funções primárias como a fagocitose, os macrófagos podem secretar vários produtos, incluindo citocinas que mobilizam outras células residentes no tecido ⁹⁶. Como os neutrófilos, macrófagos ativados são apresentados como células hábeis em matar ou inibir o crescimento de *P. brasiliensis* ¹³⁻⁹⁷. *In vivo*, acredita-se que os macrófagos e linfócitos sejam as principais células efetoras envolvidas no controle da doença ⁹⁸.

Nesse contexto, a participação de leucotrienos no recrutamento de neutrófilos e ativação celular está bem caracterizado ⁶⁹. Burger *et al.* ⁹⁹, demonstraram a importância dos leucócitos PMN na PCM experimental e demonstraram concentração mais elevada de LTB₄ em lavados de bolsa subcutânea de camundongos resistentes quando comparados aos suscetíveis. Esta concentração era concomitante à maior ativação das células PMN. Sabe-se que LTB₄ é potente mediador quimioatraente para neutrófilos e em menor intensidade para eosinófilos e células mononucleares e que o mesmo é liberado após ativação celular por patógenos ou mediadores solúveis ^{62,63,100}. No entanto, LTC₄, LTD₄ e LTE₄ aumentam a permeabilidade vascular e contribuem para o recrutamento de células

mononucleares, porém não são considerados potentes fatores quimiotáticos para neutrófilos ¹⁰⁰. Sendo assim, podemos sugerir que LTB₄ e LTC₄, respectivamente, medeiam o recrutamento de neutrófilos e de células mononucleares, para os pulmões de animais infectados com *P. brasiliensis*. Além disso, muitos autores têm sugerido a participação dos leucotrienos na formação e manutenção de granulomas em diferentes processos infecciosos ^{85,86,101}. Medeiros *et al.* ⁸¹ através de análises de cortes histológicos de pulmões de animais infectados com *Histoplasma capsulatum* e tratados com um inibidor da síntese de leucotrienos (MK 886), mostrou que a ausência deste mediador inibiu a formação de granulomas compactos, resultando na multiplicação e disseminação do *H. capsulatum* para o baço e aumento da mortalidade dos animais. Outro dado importante demonstrado por Coffey *et al.*, ⁸³ e Mancuso *et al.*, ¹⁰² mostra que a ausência de leucotrienos inibe fagocitose e atividade microbida de neutrófilos, desta forma podemos sugerir que a inibição da síntese de leucotrienos, por MK 886, além de diminuir a quimiotaxia de neutrófilos, impediria sua ativação e suas funções microbidas contra o *P. brasiliensis*. Demonstramos em nossos resultados que na ausência de leucotrienos o recrutamento de neutrófilos é acompanhado pelo aumento da recuperação de fungos no pulmão (figura 4), indicando a importância destas células e conseqüentemente de leucotrienos na resolução da infecção. A migração de células mononucleares pareceu não ser alterada pela ausência de leucotrienos, mas seu aumento no 7º período possa ser em conjunto com outros fatores responsável pela diminuição da recuperação fúngica nesse período.

Nosso próximo passo foi determinar as UFC de pulmões de animais 1, 3 e 7 dias após a infecção tratados ou não com MK 886. O maior número de leveduras foi recuperado dos animais AIRmin em todos os grupos, e nos 3 períodos. A linhagem

AIRmax foi mais eficiente na contenção do processo infeccioso, este resultado comparando as linhagens nos diferentes grupos em 1 e 3 dias, pode ser relacionado ao fenótipo da AIR quanto à migração de neutrófilos, sendo as linhagem AIRmax as de maior migração de neutrófilos e de menor recuperação de UFC. Na comparação entre os grupos, observamos um aumento expressivo no número de leveduras no parênquima pulmonar dos animais infectados e tratados com MK 886 quando comparado com animais somente infectados com *P. brasiliensis* (figura 4). A participação de leucotrienos nos mecanismos de defesa do hospedeiro foi demonstrada em animais 5-LO KO em outros processos infecciosos como bactérias e vírus. A ausência de leucotrienos resultou na diminuição da sobrevivência destes animais assim como no aumento de UFC de bactérias e na replicação viral ^{73,90}. O aumento na recuperação de bactérias e na mortalidade destes animais foi demonstrado ser devido à deficiência da fagocitose e da capacidade microbicida das células fagocíticas dos animais 5-LO KO ¹⁰². Alguns autores relataram que pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) apresentam aumento da suscetibilidade às infecções pulmonares devido à deficiência na síntese de leucotrienos ^{82,83}. Nestes indivíduos, a deficiência na produção de leucotrienos está associada com a redução na expressão da FLAP ^{83,84}. MA e PMN obtidos destes indivíduos apresentaram atividade microbicida reduzida para *Cryptococcus neoformans*, sendo que a adição exógena de LTB₄ reverteu esta deficiência ⁸³.

Nossos dados, juntamente com os descritos na literatura nos permitem sugerir que a inibição da síntese de leucotrienos em animais infectados com *P. brasiliensis* pode interferir na ativação celular e síntese de fatores microbicidas resultando no aumento da recuperação de UFC nos animais.

Outro parâmetro imunológico por nós estudado foi a produção de óxido nítrico por células pulmonares de animais infectados com *P. brasiliensis* tratados ou não com MK 886. Sabe-se que os mediadores lipídicos contribuem para a produção de óxido nítrico, uma substância fundamental para o controle da replicação de diferentes agentes infecciosos como fungos, bactérias e vírus⁸⁹. Vários trabalhos têm demonstrado que reativos intermediários do nitrogênio produzidos por macrófagos estão entre os primeiros fatores microbicidas envolvidos na inibição do crescimento do *P. brasiliensis*. Brummer *et al.*¹³ demonstraram que a ativação de macrófagos peritoneais pela citocina IFN- γ aumenta a atividade fungicida destas células, mas a capacidade de matar o fungo era independente do *burst* respiratório. Têm-se sugerido que o papel fundamental do óxido nítrico na ativação de macrófagos e indução da atividade fungicida que parece utilizar um mecanismo de restrição ao ferro^{19,103,104}. Nascimento *et al.*¹⁰⁵ confirmaram o papel fundamental do NO na PCM murina, demonstrando que macrófagos peritoneais de camundongos resistentes secretam baixos níveis de NO e altos de TNF- α , enquanto que macrófagos de animais suscetíveis fazem o contrário.

Trabalhos recentes descrevem que a ausência de leucotrienos pode modular a síntese de NO. Chen *et al.*⁹⁰ demonstraram que neurônios isolados de animais deficientes para o gene da enzima 5-LO, quando infectados com o vírus da estomatite vesicular, apresentam menor expressão da enzima NOS-1, resultando no aumento da replicação viral. Imai *et al.*¹⁰⁶ investigaram o papel do metabolismo do ácido araquidônico na regulação da síntese de NO a partir de macrófagos ativados e tratados com inibidores das vias da cicloxigenase e da lipoxigenase. Quando utilizaram inibidor da cicloxigenase não observaram redução significativa, enquanto que os macrófagos tratados com inibidor da lipoxigenase apresentaram uma

acentuada redução da síntese de NO. Talvani *et al.*¹⁰⁷ descreveram que leucotrienos induzem produção de NO por macrófagos peritoneais de animais infectados com *Trypanossoma cruzi* de maneira dose e tempo dependente. Medeiros *et al.*⁸¹ demonstraram que células do LBA de animais infectados com *H. capsulatum*, quando estimuladas com LPS e IFN- γ , produziram níveis elevados de NO, e que a ausência de leucotrienos, resultante do tratamento dos animais infectados com MK 886, inibiu a síntese de NO 7 e 15 dias após a infecção⁸¹. Sforcin *et al.*⁹¹ demonstraram que a produção de NO por macrófagos de animais estressados foi inibida após a incubação destas células com MK 886, um inibidor da síntese de leucotrienos.

Nossos resultados quanto à quantificação de NO em células pulmonares dos animais infectados com *P. brasiliensis*, mostram um aumento deste metabólito (figura 5) quando comparado com seus respectivos controles nos três períodos de análise, o que não ocorreu com animais infectados e tratados com MK 886, estes resultados corroboram com os trabalhos supracitados que mostram que a ausência de leucotrienos pode modular a síntese de NO. A linhagem AIRmax sintetizou mais NO que a linhagem AIRmin em 1 e 7 dias quando somente infectados com *P. brasiliensis*, no grupo de animais infectados e tratados com MK 886 a produção de NO em AIRmax foi de 300% e 250% superior em relação aos AIRmin em 3 e 7 dias respectivamente, esta diferença na produção deste metabólito pode ter “ajudado” a linhagem AIRmax, assim como os animais infectados que não tiveram a síntese de leucotrienos inibida a maior contenção do processo infeccioso observado através da recuperação de fungos viáveis no pulmão. Desta forma, podemos sugerir que um dos mecanismos pelos quais a inibição de leucotrienos poderia estar interferindo na

proteção contra o *P. brasiliensis* seria através da inibição da síntese de NO que sabidamente é um dos principais fatores microbicidas.

Sabe-se que os leucotrienos estão envolvidos na regulação da síntese de citocinas inflamatórias e imunes^{81,87,88}.

As citocinas produzidas na PCM murina durante a infecção aguda são importantes por influenciar o destino da resposta imune que conduz a suscetibilidade ou a resistência ao fungo. O IFN- γ é uma das principais citocinas protetoras que potencializam a resposta microbicida efetuada pelos macrófagos que são as principais células responsáveis pela eliminação do *P. brasiliensis*; esta citocina associada a outras citocinas como GM-CSF e o TNF- α intensificam a resposta eficaz do organismo frente ao *P. brasiliensis*. A liberação de IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ mostrou-se aumentada em pulmões obtidos de animais infectados e não tratados com MK 886, quando comparado com os de animais do grupo controle, com exceção da IL-6 na linhagem AIRmin no 7º dia após a infecção. A IL-6 é fundamental 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 inflamado¹⁰⁸⁻¹⁰⁹. Gonzalez *et al.*⁴⁴, mostraram que camundongos BALB/c respondem com recrutamento de leucócitos para o pulmão e um aumento no nível de 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-6 durante a infecção, a qual tem um importante papel na atividade microbicida de neutrófilos⁴⁹⁻¹¹⁰.

Nossos resultados mostram que leucotrienos modulam a síntese de IL-6 na PCM murina (figura 6), animais de ambas linhagens somente infectados com *P.*

brasiliensis, de forma geral, secretam maior quantidade de IL-6 em relação a aqueles submetidos ao tratamento. Observamos também que animais AIRmax do grupo de infectados e não tratados produziram mais IL-6 em relação aos AIRmin nos períodos mais precoces da infecção, o que condiz com o fenótipo diferenciado para migração celular entre as linhagens.

A produção de IL-10, uma citocina de perfil Th2 foi avaliada durante o processo infeccioso, os leucotrienos parecem não exercer papel modulatório na produção desta citocina em células pulmonares, porém foi observada diferença entre as linhagens nos diferentes grupos, sendo a linhagem AIRmin maior produtora desta citocina em relação aos AIRmax nos três períodos de estudo.

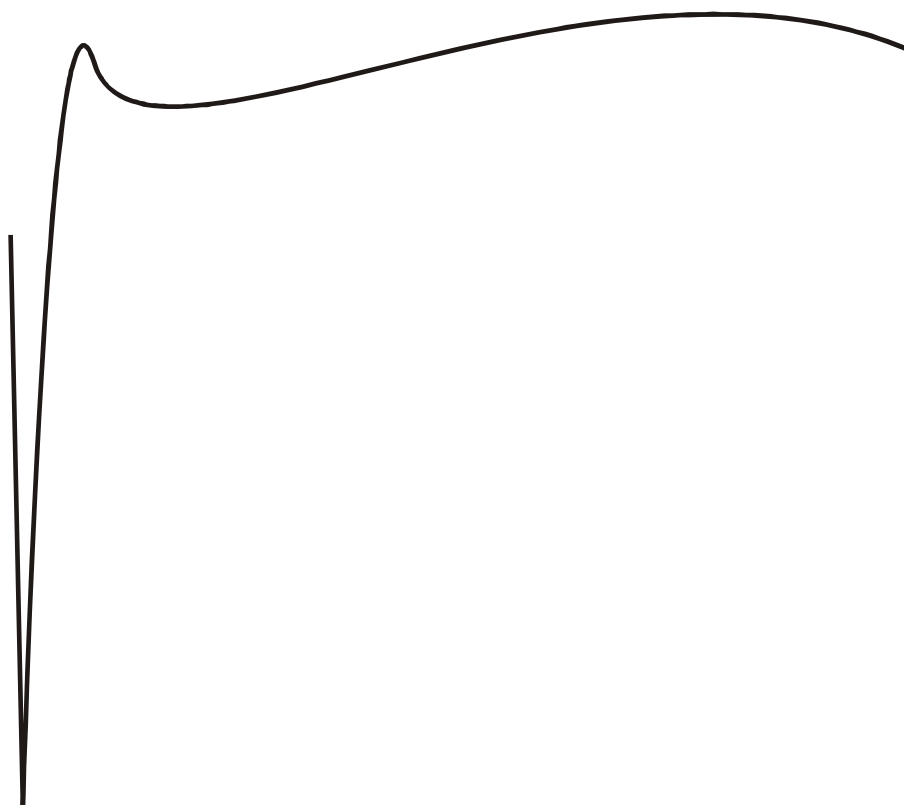
As citocinas anti-inflamatórias como a IL-4 e a IL-10 desempenham atividade desativadora de macrófagos e a sua produção desbalanceada leva a infecções graves, principalmente aquelas produzidas por patógenos intracelulares^{111,112,113}. Kashino *et al.*⁴⁰, observaram altos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10 em homogeneizados de pulmões em camundongos B10.A suscetíveis a PCM. Os dados até agora mostrados nos permite dizer, que a maior produção de IL-10 e a menor de IL-6 podem estar relacionadas a uma maior multiplicação do fungo na linhagem AIRmin desfavorecendo o *clearence* fúngico.

O IFN- γ e o TNF- α , duas citocinas de padrão Th1, também foram avaliadas neste trabalho. A produção de IFN- γ nos homogeneizados de pulmões de animais infectados com *P. brasiliensis* não tratados com MK 886 foi maior a favor dos AIRmax nos três períodos de estudo, este resultado pode ser associado a uma maior ativação celular e conseqüente contenção do processo infeccioso na linhagem AIRmax. Já a diferença de produção de IFN entre os grupos (tratados e não tratados com MK 886) não ficou bem caracterizada. A produção de TNF- α no grupo de

animais infectados e não tratados com o inibidor da síntese de leucotrienos foi maior na linhagem AIRmax em 1 e 3 dias. No grupo de animais tratados com MK 886 a produção de TNF- α diminuiu em relação ao grupo somente infectado, principalmente no primeiro dia de infecção.

Kurita *et al.*⁴⁹, 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^{13,19,114}. Souto *et al.*¹⁷, demonstraram que a PCM 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 PCM a resistência foi associada ao aumento de TNF- α ¹⁰⁵. Considerando as informações acima, a produção de TNF- α e IFN- γ parecem estar relacionadas a um padrão de resistência à PCM.

Outro importante dado observado por nós, principalmente em relação à produção de IFN- γ , que é uma citocinas pró-inflamatória, foi a maior influência do MK886 na linhagem AIRmax. Animais da linhagem AIRmin não alteraram a produção destas citocinas após o tratamento com o MK886 enquanto a linhagem AIRmax diminuiu sua produção, indicando que ação deste inibidor depende do padrão genético apresentado pelo hospedeiro.

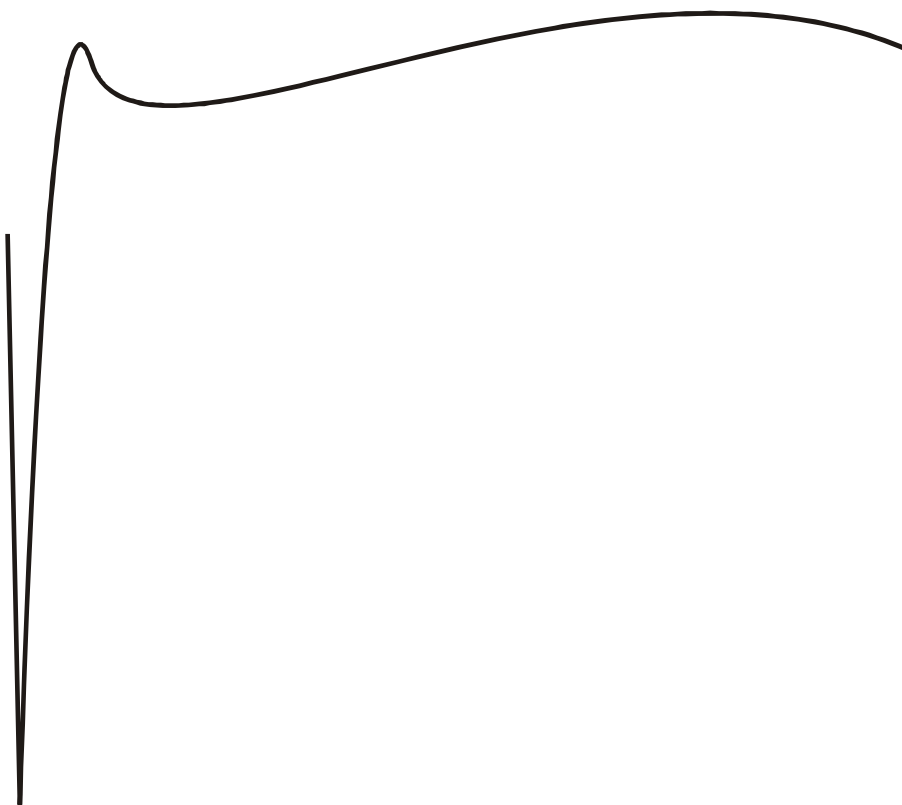


Conclusão



7. CONCLUSÃO

Tomando em conjunto todos os resultados, podemos concluir que um menor influxo leucocitário e menor ativação celular resultantes do tratamento do MK 886 e o background genético fixados nas diferentes linhagens no compartimento pulmonar durante os períodos iniciais da infecção, parecem ser fatores decisivos na determinação do perfil de suscetibilidade na infecção por *P. brasiliensis*.



Referências Bibliográficas



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. San-Blas G, San-Blas F. Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* dimorphism. In: CRC Press Edited by Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, editors. Paracoccidioidomycosis. CRC Press, Boca Raton, Fla; 1994. p. 49-66.
2. Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. Sabouraudia. 1985; 23(5): 323-34.
3. Wanke B, Londero AT. Epidemiology and Paracoccidioidomycosis infection. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Delnegro G, editors. Paracoccidioidomycosis. Florida: CRC Press, Boca Raton, 1994. p.109-20.
4. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. 8.ed. São Paulo: Sarvier, 1991.
5. Restrepo A, Del Negro G. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton, Florida, CRC Press, p.97-102, 1994.
6. Naiff RD, Ferreira LCL, Barret TV. Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no Estado do Pará. Rev Inst Med Trop. 1986; 28: 19-29.
7. 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. 1998; 58: 505-12.
8. Restrepo S, Tóbon A, Trujillo J, Restrepo A. Development of pulmonary fibrosis in mice during infection with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. J Med Vet Mycol. 1992; 30: 173-84.

9. McEwen JG, Bedoya V, Patiño M, Salazar M, Restrepo A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol.* 1987; 25: 165–75.
10. Carbonell LM, Rodrigues J. Transformation of mycelial and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis* in cultures and experimental inoculations. *J Bacteriol.* 1965; 90: 504-10.
11. San-Blas G. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall glucans, pathogenicity, and dimorphism. *Curr Top Med Mycol.* 1985; 1:235-57.
12. Camargo ZP, de Franco MF. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol.* 2000 17(2): 41-8.
13. Brummer E, Hanson LH, Stevens DA. Gamma interferon activation of macrophage for killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and evidence for nonoxidative mechanisms. *Int J Immunopharmacol.* 1988; 10: 945-52.
14. Peraçoli MT, Soares AM, Mendes RP, Marques SA, Pereira PC, Rezkallah-Iwasso MT. Studies of natural killer cells in patients with paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol.* 1991; 29(6): 373-80.
15. Clemons KV, Calich VLG, Burger E, Filler SG, Graziutti M, Murphy J, Roilides E, Campa A, Dias MR, Edwards JE Jr, Fu Y, Fernandes-Bordignon G, Ibrahim A, Katsifa H, Lampaignere CG, Meloni-Bruneri LH, Rex J, Savary CA, Xidieh C. Pathogenesis I: interactions of host cells and fungi. *Med Mycol.* 2000;38 Suppl 1:99-111.
16. Cano LE, Kashino SS, Arruda C, André D, Xidieh CF, Singer-Vermes LM, et al. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect Immun.* 1998; 66: 800-6.

17. Souto JT, Figueiredo F, Furlanetto A, Pfeffer K, Rossi MA, Silva JS. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. Am J Pathol. 2000; 156: 1811-20.
18. Xidieh CF, Lenzi HL, Calich VLG, Burger E. Influence of the genetic background on the pattern of lesions developed by resistant and susceptible mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. Med Microbiol Immunol. 1999;188(1):41-9.
19. Cano LE, Arango R, Salazar, ME, Brummer E, Stevens D, Restrepo A. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. J Med Vet Mycol. 1992; 30: 161-6.
20. Calich VLG, Singer-Vermes LM, Siqueira AM, Burger E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. BR J Exp Pathol. 1985; 66: 585-94.
21. Calich VLG, Russo M, Vaz CAC, Burger E, Singer-Vermes LM. Resistance mechanism to experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Cienc Cult. 1994; 46: 455-61.
22. Murphy JW, Bistoni F, Deepe GS, Blackstock RA, Buchanan K, Ashman RB, Romani L, Mencacci A, Cenci E, Fè d'Ostiani C, Del Sero G, Calich VLG, Kashino SS. Type 1 and type 2 cytokines: from basic science to fungal infections. Med Mycol. 1998; 36 Suppl 1:109-18.
23. Gow NA, Brown AJ, Odds FC. Fungal morphogenesis and host invasion. Curr Opin Microbiol. 2002; 5(4):366-71.
24. Franco M, Mendes RP, Moscardi-Bacchi M, Rezkallah-Iwasso MT, Montenegro MR. Paracoccidioidomycosis: a recent proposed classification of its forms. Rev Soc Med Trop. 1987; 20: 129-32.

25. Montenegro MRG, Franco M. Pathology. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. editors. Paracoccidioidomycosis. CRC Press, Boca Raton, Fla; 1994. p. 131-147.
26. Mendes RP, Scheinberg MA, Rezkallah-Iwasso MT, Marcondes-Machado J, Milano SIM, Pereira PCM, et al. Evolution of IgE in sera of patients with paracoccidioidomycosis. In: Resúmenes Del 4th Encuentro Internacional sobre Paracoccidioidomycosis, Caracas 1989; 124.
27. Franco M, Mendes RP, Moscardi-Bacchi M, Rezkallah-Iwasso My, Montenegro MR. Paracoccidioidomycosis. *Baillière's Clin Trop Med Commun Dis.* 1989; 4: 185-220.
28. Franco M, Peraçoli MTS, Soares AMVC, Montenegro MR, Mendes RP, Meira DA. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Méd Mycol.* 1993; 5: 115-49.
29. Mendes RP, The gamut of clinical manifestations. In: Franco MF, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G. Paracoccidiomycosis. Boca Raton: CRC Press 1994; 233-58
30. Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium – to – yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun.* 1984; 46: 436-53.
31. Arango M, Yarzabal L. T-cell dysfunction and hyperimmunoglobulinemia-E in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 1982; 79: 115-23.
32. Munk ME, Fazioli RA, Calich VLG, Kaufmann SH. *Paracoccidioides brasiliensis*-stimulated human gamma/delta T cells support antibody production by B cells. *Infect Immun.* 1995; 63(4):1608-10.

33. Biagioni L, Souza MJ, Chamma LG, Mendes RP, Marques AS, Mota NGS, et al. Sorology of paracoccidioidomycosis. II Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1984; 78: 617-21.
34. Cano LE, Singer -Vermes L, Vaz CAC, Russo M, Calich VLG. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response and specific isotype patterns. *Infect Immun.* 1995; 63: 1777-83.
35. Baida H, Siselli PJ, Juvenale M, Del Negro GM, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ, et al. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect.* 1999; 1: 273-80.
36. Mamoni RL, Nouér AS, Oliveira SJ, Mussatti CC, Rossi CL, Camargo ZP, Blota MHSL. Enhanced production of specific IgA₄, IgE, IgA and TNF- β in sera from patients with juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.* 2002; 40: 153-9.
37. Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaioordanou PMO, Blota MHSL. Cytokine and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect.* 2002; 4: 139-144.
38. Karhawi AS, Colombo AL, Salomão R. Production of IFN-gamma is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. *Med Mycol.* 2000; 38(3):225-9.
39. Kimata H, Yoshida A, Ishioka C, Lindley I, Mikawa H. Interleukin-8 selectively inhibits immunoglobulin E production in human B cells. *J Exp Med.* 1992; 76: 1227-31.

40. Kashino SS, Fazioli RA, Cafalli-Favati C, Meloni-Bruneri LH, Vaz CAC, Burger E, Calich VLG. 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.* 2000; 20: 89-97.
41. Kerr IB, Araripe JR, Oliveira PC, Lenzi HL. Paracoccidioidomycosis: a sequential histopathologic study of lesions in experimentally infected rats. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1988; 30: 336-50.
42. Conlan JW. Critical roles of neutrophils in host defense against experimental systemic infections of mice by *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun.* 1977; 65: 630–5.
43. Fulurija A, Ashman RB, Papadimitriou JM. Neutrophil depletion increases susceptibility to systemic and vaginal candidiasis in mice, and reveals differences between brain and kidney in mechanisms of host resistance. *Microbiology.* 1966; 142: 3487–96.
44. Gonzalez A, Sahaza JH, Ortiz BL, Restrepo A, Cano LE. Production of pro-inflammatory cytokines during the early stages of experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Med Mycol.* 2003; 41: 391-9.
45. Meloni-Bruneri LH, Campa A, Abdalla DS, Calich VLG, Lenzi HL, Burger E. Neutrophil oxidative metabolism and killing of *Paracoccidioides brasiliensis* after air pouch infection of susceptible and resistant mice. *J Leukoc Biol.* 1996; 59: 526-33.
46. Cock AM, Cano LE, Vélez D, Aristizabal BH, Trujillo J, Restrepo A. 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.* 2000; 42: 59-66.
47. Bava AJ, Mistchenko AS, Palacios MF, Estevez ME, Tiraboschi NI, Sen L, Negroni R, Diez RA. Lymphocyte subpopulations and cytokine production in paracoccidioidomycosis patients. *Microbiol Immunol.* 1991; 35: 167-74.

48. Benard G, Mendes-Giannini MJ, Juvenale M, Miranda ET, Duarte AJ. Immunossuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. J Infect Dis. 1997; 175: 1263-7.
49. Kurita M, Oarada M, Miyagi M, Ito E. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorfonuclear leukocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. Med Mycol. 2000; 38: 177-82.
50. Cassatela MA. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. Immunol Today. 1995; 16: 21-7.
51. McEwen JG, Brummer E, Stevens DA, Restrepo A. Effect of murine polymorphonuclear leukocytes on the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. Am J Trop Med Hyg. 1987; 36: 603-8.
52. Pina A, Saldiva PHN, Restrepo LEC, Calich VLG. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. J Leukoc Biol. 2006; 79: 1202-13.
53. Falconer DS. Introducion a la genetica cuantitativa, México: Editorial Continental, 1970.
54. Biozzi G, Mouton D, Sant'anna OA, Passos HC, Gennari M, Reis MH, Ferreira VCA, Heumann AM, Bouthillier Y, Ibañez OM, Stiffel C, Siquiera M. Genetics of immunoresponsiveness to natural antigens in the mouse. Curr Top Microbiol. Immunol. 1979; 85: 31-98.
55. Stiffel C, Ibañez OM, Ribeiro OG, Decreusefond C, Mouton D, Siqueira M, Biozzi G. Genetics of acute inflammation: inflammatory reactions inbred lines of mice and in their interline crosses. Expl Clin Immunogenet. 1990; 7: 221-33.

56. Fauve RM, Jusforgues H, Hevin B. Maintenance of granuloma macrophages in serum-free medium. *J Immunol Meth.* 1983; 64: 345-51.
57. Biozzi G, Ribeiro OG, Saran A, Araujo LM, Maria DA, De Franco M, Cabrera WK, Sant'anna OA, Massa S, Covelli V, Mouton D, Neveu T, Siqueira M, Ibañez OM. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. *Carcinogenesis.* 1998; 19: 337-46.
58. Ribeiro OG. Controle genético da inflamação. [dissertação]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1994.
59. Vasquez-Bravo YLA. Aspectos da resposta inflamatória aguda em linhagens de camundongos com reatividade máxima e mínima obtidas por seleção genética bidirecional. [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 1996.
60. Carneiro AS, Ribeiro OG, De Franco M, Cabrera WHK, Vorraro F, Siqueira M, Ibañez OM, Starobinas N. Local inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* venom differs in mice selected for acute inflammatory response. *Toxin.* 2002; 40: 1571-79.
61. Araújo LMM, Ribeiro OG, Siqueira M, De Franco M, Starobinas N, Massa S, Cabrera WHK, Mouton D, Seman M, Ibañez O. Innate resistance to infection by intracellular bacterial pathogens differs in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory response. *Eur J Immunol.* 1998; 28: 2913-20.
- .
62. Shak S, Perez HD, Goldstein IM. A novel dioxygenation product of arachidonic acid possesses potent chemotactic activity for human polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem.* 1983; 258: 14948-53.
63. Faccioli LH, Nourahargh S, Moqbel R, Williams FM, Sehmi R, Kay AB, Williams TJ. The accumulation of ¹¹¹In-eosinophils induced by inflammatory mediators, *in vivo*. *Immunology.* 1991; 73: 222-7.

64. Miller DK, Gillard JW, Vickers PJ, Sadowski S, Leveille C, Mancini JA, Charleson P, Dixon RA, Ford-Hutchinson AW, Fortin R. Identification and isolation of a membrane protein necessary for leukotriene production. *Nature*. 1990; 343: 278-81.
65. Goldman DW, Gifford LA, Marotti T, Koo CH, Goetzl EJ. Molecular and cellular properties of human polymorphonuclear leukocyte receptors for leukotriene B₄. *Fed Proc*. 1987; 46: 200-3.
66. Crooks SW & Stokley RA. Leukotriene B₄. *Int J Biochem & Cell Biol* 1998; 30: 173-8.
67. Yokomizo T, Kato K, Terawaki K, Izumi T, Shimizu T. A second leukotriene B₄ receptor, BTL₂: a new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. *J Exp Med*. 2000; 192: 421-31.
68. Samuelsson B. Leukotrienes: a new class of mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*. 1983; 11: 1-13.
69. Lewis RA, Austen KF. The biologically active leukotrienes. Biosynthesis, metabolism, receptors, functions, and pharmacology. *J Clin Invest*. 1984; 73: 889-997.
70. Lohmann-Matthes ML, Steinmuller C, Franke-Ullmann G. Pulmonary macrophages. *Eur Respir J*. 1994; 7: 1678-89.
71. O'byrne PM, Israel E, Drazen JM. Antileukotrienes in the treatment of asthma. *Ann Intern Med*. 1997; 127: 472-8.
72. Buret A, Cripps AW. The immunoevasive activities of *Pseudomonas aeruginosa*. Relevance for cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis*. 1993; 148: 793-805.
73. Bailie MB, Standiford TJ, Laichalk LL, Coffey MJ, Strieter R, Peters-Golden M. Leukotriene-deficient mice manifest enhanced lethality from *Klebsiella pneumoniae* in

association with decreased alveolar macrophage phagocytic and bactericidal activities. J Immunol. 1996; 157: 5221-4.

74. Peters-Golden M, Coffey M. Role of leukotrienes in antimicrobial defense of the lung. J Lab Clin Med. 1998; 132: 251-7.

75. Medeiros AI, Silva CL, Malheiro A, Maffei CM, Faccioli LH. Leukotrienes are involved in leukocyte recruitment induced by live *Histoplasma capsulatum* or by the beta-glucan present in their cell wall. Br J Pharmacol. 1999; 128: 1529-37.

76. Hopkins H, Stull T, Von Essen SG, Robbins RA, Rennard SI. Neutrophil chemotactic factors in bacterial pneumonia. Chest. 1989; 95: 1021-7.

77. Hennet T, Ziltener HJ, Frei K, Peterhans EA. Kinetic study of immune mediators in the lungs of mice infected with influenza A virus. J Immunol. 1992; 149: 932-9.

78. Kasirga E, Coker I, Aydogdu S, Yagci RV, Taneli B, Gousseinov A. Blood levels of leukotrienes (LTC₄, D₄, E₄, B₄) and synthesis of leukotriene B₄ by peripheral leukocytes in children with acute A and B hepatitis. Turk J Pediatr. 1999; 41: 457-65.

79. Gosselin J, Savard M, Tardif M, Flamand L, Borgeat P. Epstein-Barr virus primes human polymorphonuclear leucocytes for the biosynthesis of leukotriene B₄. Clin Exp Immunol. 2001; 126: 494-502.

80. Tafalla C, Figueras A, Novoa B. Possible role of LTB₄ in the antiviral activity of turbot (*Scophthalmus maximus*) leukocyte-derived supernatants against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). Dev Comp Immunol 2002; 26: 283-93.

81. Medeiros AI, Sá-Nunes A, Soares EG, Peres CM, Silva CL, Faccioli LH. Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. Infect Immun. 2004 72: 1637-44.

82. Krarup E, Vestbo J, Benfield TL, Lundgren JD. Interleukin-8 and leukotriene B₄ in bronchoalveolar lavage fluid from HIV-infected patients with bacterial pneumonia. *Respir Med.* 1997; 91:317-21.
83. Coffey MJ, Phare SM, George S, Peters-Golden M, Kazanjian PH. Granulocyte colony-stimulating factor administration to HIV-infected subjects augments reduced leukotriene synthesis and anticryptococcal activity in neutrophils. *J Clin Invest.* 1998; 102: 663-70.
84. Coffey, M.J, Phare SM, Kazanjian PH, Peters-Golden M. 5-Lipoxygenase metabolism in alveolar macrophages from subjects infected with the human immunodeficiency virus. *J Immunol.* 1996; 157: 393-9.
85. Yoshino S. Patterns of prostaglandin E₂ and leukotriene B₄ production in inflammation induced by peptidoglycan-polysaccharide polymers of bacterial cell wall. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 1995; 18: 137-44.
86. De Rose V, Trentin L, Crivellari MT, Cipriani A, Gialdroni GG, Pozzi E, Folco G, Semenzato G. Release of prostaglandin E₂ and leukotriene B₄ by alveolar macrophages from patients with sarcoidosis. *Thorax.* 1997; 52: 76-83.
87. Morita H, Takeda K, Yagita H, Okumura K. Immunosuppressive effect of leukotriene B₄ receptor antagonist *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 264: 321-6.
88. Vellenga E, Tuyt L, Wierenga BJ, Muller M, Dokter W. Interleukin-6 production by activated human monocytic cells is enhanced by MK-571, a specific inhibitor of the multi-drug resistance protein-1. *Br J Pharmacol.* 1999; 127: 441-8.
89. Drew B, Leeuwenburgh C. Aging and the role of reactive nitrogen species. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 959: 66-8.
90. Chen N, Restivo A, Reiss CS. Leukotrienes play protective roles early during experimental VSV encephalitis. *J Neuroimmunol.* 2001; 120(1-2): 94-102.

91. Sforcin JM, Nunes GA, Missima F, Sá-Nunes A, Faccioli LH. Effect of a leukotriene inhibitor (MK886) on nitric oxide and hydrogen peroxide production by macrophages of acutely and chronically stressed mice. *J Pharm Pharmacol*. 2007; 59(9):1249-54.
92. Rouzer CA, Ford-Hutchinson AW, Morton HE, Gillard JW. MK886, a potent and specific leukotriene biosynthesis inhibitor blocks and reverses the membrane association of 5-lipoxygenase in ionophore-challenged leukocytes. *J Biol Chem*. 1990; 256(3): 1436-42.
93. Kurita N, Biswas SK, Oarada M, Sano A, Nishmura K, Miyaji M. Fungistatic and fungicidal activities of murine polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*. 1999; 37: 19-24.
94. Kurita N, Oasada M, Ito E, Miyaji M. Antifungal activity of human polymorfonuclear leukocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*. 1999; 37: 261-67.
95. Rodrigues DR. Efeito de citocinas sobre a atividade fungicida e fungistática de neutrófilos humanos contra o *Paracoccidioides brasiliensis*. [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2003.
96. Gordon S. The role the macrophage in immune regulation. *Res Immunol*. 1998; 149: 685-8.
97. Jimenez BE, Murphy JW. In vitro effects of natural killer cells against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase. *Infect Immun*. 1984; 46: 552-558.
98. Burger E, Vaz CCA, Sano A, Calich VLG, Singer-Vermes LM., Xidieh CF, Kashino SS, 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*. 1996; 55: 391-8.

99. Burger E, Fernandes-Bordignon G. F. Concentration of chemotactic and attractant factors to polymorphonuclear neutrophils in air pouch of susceptible and resistant mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. In: International Union of Mycological Societies, 1999, Australian. Proceedings of IX International Congress of Mycology. Sydney, August 12-20, MP 3. 41.
100. Lee TH, Arm J. Leukotrienes. Allergy Proc. 1991; 12: 139-42.
101. Kunkel SL, Chensue SW, Mouton C, Higashi GI. Role of lipoxigenase products in murine pulmonary granuloma formation. J Clin Invest. 1984; 74(2):514-24.
102. Mancuso P, Nana-Sinkam P, Perters-Golden M. Leukotriene B₄ augments neutrophils phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun. 2001 69: 2011-16.
103. Bocca AL, Hayashi EE, Pinheiro AG, Furlanetto AB, Campanelli AP, Cunha FQ, Figueiredo F. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. J. Immunol. 1998; 161: 3056-62.
104. Gonzalez AW, de Gregori D, Velez A, Restrepo A, Cano LE. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. Infect Immun. 2000; 68: 2546-52.
105. Nascimento FRF, Calich VLG, Rodrigues D, Russo M. Dual role of nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance but overproduction associated with susceptibility. J Immunol. 2002; 168: 4593-600.
106. Imai Y, Kolb H, Burkart V. Nitric oxide production from macrophages is regulated by arachidonic acid metabolites. Biochem Biophys Res Commun. 1993; 197(1): 105-9.

107. Talvani A, Machado FS, Santana GC, Klein A, Barcelos L, Silva JS, Teixeira MM. Leukotriene B(4) induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected murine macrophages and mediates resistance to infection. *Infect Immun*. 2002; 70(8):4247-53.
108. 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*. 1989 83: 444-55.
109. Issekutz AC & Issekutz TB. Quantitation and kinetics of blood monocyte migration to acute inflammatory reactions, and IL-1 alpha, tumor necrosis factor-alpha and IFN-gamma. *J Immunol*. 1993; 151: 2105-15.
110. Schelenz S, Smith DA, Bancroft GJ. Cytokine and chemokine responses following pulmonary challenge with *Aspergillus fumigatus*: obligatory role of TNF-alpha and GM-CSF in neutrophil recruitment. *Med Mycol*. 1999; 37: 183-94.
111. Mosmann TR, Schumaker JH, Street NF, Bud R, O'Garra A, Bond MW, Moore KW M, Sher A, Fiorentino DF. Diversity of cytokine synthesis and function of mouse CD4⁺T cells. *Immunol Ver*. 1991; 123: 209-29.
112. Scott P, Farrel JP. Experimental cutaneous leishmaniasis, induction and regulation of T cells following infection of mice with *Leishmania major*. *Chem Immunol*. 1998; 70: 60-80.
113. Hoft DF, Schnapp AR, Eickhoff CS, Roodman ST. Involvement of CD4⁺ Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 2000; 68: 197-204.
114. Brummer E. Interaction of *Paracoccidioides brasiliensis* with host defense cells. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G, editors. *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Raton, Fla; 1994. p. 213-23.