

Universidade de Brasília – UNB
Faculdade de Medicina – FM
Pós-Graduação em Patologia Molecular

**Análise da expressão de genes em macrófagos durante uma
cinética de interação com o *Paracoccidioides brasiliensis***

Laura Maria Barbosa Gonçalves

Brasília- DF
2010

Ficha catalográfica

Gonçalves, Laura Maria Barbosa

Análise da expressão de genes em macrófagos durante uma cinética de interação com o *Paracoccidioides brasiliensis*.

Laura Maria Barbosa Gonçalves. – Brasília, 2010.

Orientadora: Anamélia Lorenzetti Bocca

Co-orientadora: Simoneide Souza Silva

63 p; 30 cm.

Dissertação de Mestrado (Patologia Molecular), Faculdade de Medicina,

Universidade de Brasília – UNB.

1. Paracoccidioidomicose, resposta inata, macrófagos alveolares, genes.

Universidade de Brasília – UNB
Faculdade de Medicina – FM
Pós-Graduação em Patologia Molecular

**Análise da expressão de genes em macrófagos durante uma
cinética de interação com o *Paracoccidioides brasiliensis***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, Área Imunologia, Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito Parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular (Imunologia aplicada).

Laura Maria Barbosa Gonçalves

Orientadora: Prof.Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca

Co-orientadora: Prof.Dra. Simoneide Souza Silva

Brasília-DF

2010

Banca examinadora

Titulares:

Prof.Dra. Ildinete Silva Pereira – UNB

Prof.Dr. Aldo Henrique Fonseca Pacheco Tavares – UCB

Orientadora:

Prof.Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca – UNB

Suplente:

Prof.Dra. Alice Melo Ribeiro – UNB

Trabalho desenvolvido no laboratório de Biologia Molecular e
No laboratório de Imunologia, da Universidade de Brasília, sob
orientação da Prof.Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca.

A ciência é incapaz de resolver os mistérios finais da natureza, porque na verdade fazemos parte do mistério que tentamos resolver.

Max Planck (1858-1947)

“Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda a prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar. Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda verificação experimental. Perceber os fenômenos, discernir as relações, comparar as analogias e as dessemelhanças, classificar as realidades, e induzir as leis, eis a ciência”

RUI BARBOSA

Dedico este trabalho com muito carinho;

Aos meus amados pais, que são a base do meu caminho,
obrigado por toda a paciência e incentivo,
À meus irmãos queridos pela amizade e carinho,
Ao meu querido esposo, por todo apoio e compressão ao longo
desta caminhada.
Enfim, a todos que contribuíram para a elaboração deste
trabalho.

Agradecimentos

A Deus, meu supremo Senhor que me fez conquistar um sonho, superar as adversidades e como a bíblia diz, isso nos torna “mais que vencedores”...

A minha querida família, em especial a todos os meus tios, pelo carinho apoio e dedicação em todos os momentos de minha vida.

Aos meus amados pais, Maria e Reinaldo pelos ensinamentos de vida, por toda a compreensão, carinho e paciência em me escutar, aconselhar e dar incentivo em tudo o que fiz desde o jardim da infância. Pela dedicação em todos os momentos da vida e pelo amor, carinho e cuidado sempre dedicado a mim, mesmo a distância...

Aos meus irmãos Rui e Nidia, pelo carinho, amizade e companheirismo.

Ao meu esposo Merivaldo, pelo amor dedicado a mim, pelos cuidados e paciência nesta etapa tão importante de nossas vidas, pela cumplicidade e por absolutamente todos os momentos que vivemos juntos, quando crescemos profissionalmente e amadurecemos sempre juntos, para começarmos uma nova etapa de nossas vidas... Muito melhor...

A minhas primas Adriely e a Adriane, sempre companheiras e amigas.

A Universidade de Brasília por me acolher e contribuir em minha formação junto à pesquisa e a docência, área que escolhi para atuar profissionalmente...

A Anamélia Lorenzetti Bocca, minha orientadora, pela confiança e paciência e pela oportunidade em desenvolver esse trabalho.

A minha co-orientadora, Simoneide Souza Silva, sempre disposta a ajudar, obrigado pelos grandes ensinamentos nos experimentos desenvolvidos nesse trabalho.

Obrigado pela preocupação e atenção, solidariedade e carinho.

Ao laboratório de Biologia Molecular por me acolher no desenvolvimento deste trabalho .

A todos os amigos da BioMol, Adriane, Ana Karine, Zé Carlos, Marilen, Marinez, Marcos, Érika, Calliandra, Patrícia, Izabel, sempre muito prestativos em me ajudar, auxiliar, em especial pelas boas conversas, risadas e pela agradável convivência.

Aos amigos da Patologia Molecular, Ana Camila, Márcio, Izaque, Yanna, Alice, Viviane, Keyla, André e a todos, pelos bons momentos compartilhados.

As funcionárias do laboratório da BioMol, Fátima e Dona Ivanildes, pela presteza e disposição em me ajudar sempre quando precisei!

Em geral agradeço a todos que com grandes e pequenas parcelas de colaboração, em todos os sentidos fizeram parte deste trabalho.

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas	xiii
Resumo	xv
Abstract	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Perfis de Expressão gênica durante o processo infeccioso	1
1.2. Perfis de expressão gênica do fungo <i>P. brasiliensis</i>	5
1.3. Paracoccidiodomicose e Mecanismos imunoregulaórios	8
1. OBJETIVOS	17
2. Metodologia	18
3.1. Cultivo do fungo	18
3.2. Obtenção das frações da parede celular do <i>P. brasiliensis</i>	18
3.3. Cultivo dos Macrófagos e manutenção	19
3.4. Interação dos macrófagos com leveduras de <i>P. brasiliensis</i> ou suas frações: F1, F2	19
3.5. Análise da cinética de internalização de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> por macrófagos	19
3.6. Dosagem da concentração de Óxido Nítrico	20
3.7. Extração do RNA total dos macrófagos	20
3.8. Análise dos RNAs totais	21
3.9. RT-PCR em tempo real (qRT-PCR)	21
3.9.1. Análise estatística	23
4. RESULTADOS	24
4.1. Cinética da taxa de fagocitose de <i>P. brasiliensis</i> durante a interação com macrófagos	24
4.2. Produção de Óxido Nítrico (NO) em sobrenadante de cultura dos	25

macrófagos alveolares após 6, 24 e 48 horas de interação com o *P. brasiliensis* e seus componentes de parede.

4.3. Análise por eletroforese em gel de agarose do RNA total extraído dos 27

macrófagos tratados ou não pelo fungo *P. brasiliensis* e suas frações.

4.4. Análise da expressão gênica dos macrófagos alveolares após tratamento 29

com *P. brasiliensis* e seus componentes de parede, quantificados por RT-PCR em tempo real.

5- DISCUSSÃO 34

6- CONSIDERAÇÕES FINAIS 45

7- PERSPECTIVAS 46

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 47

Índice de figuras e Tabelas

Figuras

- Figura 1.** Resumo da regulação de citocinas associada às três principais formas de PCM, baseadas nas respostas imune à glicoproteína 43kDa (gp43) **11**
- Figura 2.** Microfotografia (1000x) representativa da interação entre leveduras de Pb01 e macrófagos no tempo de 6 (A) e (B) horas de co-cultivo. **24**
- Figura 3.** Níveis de Óxido Nítrico (NO) dos macrófagos não tratados e tratados com *P. brasiliensis* e seus componentes de parede. Frações F1, F2 após 6, 24 e 48 horas de co-cultivo. **26**
- Figura 4A.** Perfil eletroforético do RNA total extraído dos macrófagos. **28**
- Figura 4B .** Perfil eletroforético do RNA total do macrófagos não tratados e tratados *P. brasiliensis* ou sua frações após tratamento com DNase livre de RNAses. **28**
- Figura 5.** Curva de amplificação do experimento de RT-PCR em tempo real representativo para o gene Rps9, constitutivo de macrófago, após interação de 24 horas com *P. brasiliensis*. **29**
- Figura 6.** Picos de desnaturação do Rps9 **30**

Tabelas

Tabela 1. Seqüência dos oligos desenhados para a PCR em tempo real.	23
Tabela 2- Capacidade fagocitária dos macrófagos alveolares nos tempos de 6, 24 e 48 horas de interação com <i>P. brasiliensis</i> .	25
Tabela 3. FOLD - Valor da indução/repressão gênica determinado após a normalização de cada gene pelo Rps9. Tempo de 6h.	31
Tabela 4. FOLD - Valor da indução/repressão gênica determinado após a normalização de cada gene pelo Rps9. Tempo de 24h.	32
Tabela 5. FOLD - Valor da indução/repressão gênica determinado após a normalização de cada gene pelo Rps9. Tempo de 48h.	33

Lista de Abreviaturas e Siglas

°C	Graus Celsius
cDNA	Seqüência de DNA complementar
CSF	Fluido cerebrospinal
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAse	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxinucleotídeos 5'-trifosfato
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EST	Expressed Sequence Tag
g	Grama
H	Hora
IFN- γ	Interferon gamma
gp 43	Glicoproteína de 43.000 daltons
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzida
L	Litro
min	minuto
IFN- γ	Interferon gamma
gp 43	Glicoproteína de 43.000 daltons
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzida
NEED	N-1(1-Naphthyl) Ethyl-Enedinamine
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NO ₂	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
pb	Pares de base
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PCM	Paracoccidioidomicose
RIN	Reativos Intermediários de Nitrogênio
RNA	Ácido ribonucleico
RNAse	Ribonuclease

RT-PCR	Transcrição Reversa- Reação em cadeia da polimerase
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (meio de cultura)
SAGE	Estratégia de análise em série de expressão gênica ^{xiii}
SBF	Soro Bovino fetal
Th1	Subconjunto de células T auxiliares do tipo I
Th2	Subconjunto de células T auxiliares do tipo I
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa (α)
α -1,3-glicana	Alfa 1,3-glicana
β -1,3-glicana	Beta 1,3-glicana
μ g	Microgramas
μ L	Microlitros
μ M	Micromolar
%	Por cento

RESUMO

Paracoccidioides brasiliensis é o agente causador da paracoccidioidomicose (PCM), doença granulomatosa crônica que acomete principalmente os pulmões, pele, mucosas e linfonodos. O fungo *P. brasiliensis* apresenta dimorfismo termo-dependente, desenvolvendo-se na forma de levedura em vida parasitária ou quando cultivado em meios de cultura a 37°C. A adesão e invasão de células são eventos essenciais envolvidos na infecção e disseminação do patógeno. A ativação adequada dos macrófagos alveolares e a expressão de genes que ativam os mecanismos microbicidas dos macrófagos são elementos chaves na erradicação desta doença. Dados previamente descritos na literatura demonstram que a fração F1 isolada do fungo, cujo principal componente é a β -1,3-glicana, é um importante imunomodulador, promovendo o recrutamento de células inflamatórias e estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias incluindo o Tnf- α . Outro componente importante na interação entre o hospedeiro e o fungo é a fração F2, constituída pela α -1,3-glicana que está comumente relacionada à virulência. A mudança na composição da parede celular durante a infecção, como ocorre em *P. brasiliensis*, pode ser considerada como um mecanismo de escape da resposta imune inata. Com o objetivo de compreender melhor os eventos iniciais desse processo infectivo, o RNA total dos macrófagos tratados e não tratados foram analisados por meio do RT-PCR em Tempo Real avaliando a expressão de genes chaves TNF- α e Cxcl4 (pró-inflamatórios), CD14, Clec2 e Itga5 (proteínas de membrana), Stat6 (transdução de sinal), Nfkb e Nfkr (regulação transcricional), Toll2 e Toll4 (receptores de reconhecimento padrão), MyD88 (molécula adaptadora) envolvidos no processo inflamatório utilizando macrófagos alveolares-MHS numa cinética de interação de 6, 24 e 48 horas com *P. brasiliensis* e seus componentes de parede. O estudo revelou a indução de genes responsáveis por processos quimiotáticos que facilitam a adesão célula-célula e genes relacionados à internalização e adesão do patógeno como Clec2, sendo importante no intenso recrutamento de fagócitos para o sítio da infecção. Os genes dos receptores de reconhecimento padrão (Toll2, Toll4) e a molécula adaptadora MyD88, não apresentaram um papel relevante no sentido do estabelecimento da imunidade protetora contra o *P. brasiliensis*. Desta forma este trabalho revelou a indução de genes que codificam para proteínas que irão participar do processo de inflamação tais como migração celular e ativação da capacidade microbicida dos macrófagos, principalmente durante o estágio inicial da cinética de interação.

Palavras chaves: Paracoccidioidomicose, resposta inata, macrófagos alveolares, genes.

ABSTRACT

The *Paracoccidioides brasiliensis* is the agent of paracoccidioidomycosis (PCM), a chronic granulomatous disease that affects mainly the lungs, skin, mucous membranes and lymph nodes. The fungus *P. brasiliensis* shows thermo dependent dimorphism, growing as yeast in parasitic life or when cultured in medium at 37°C. The adhesion and invasion of host cells are essential events involved in infection and dissemination of pathogen. The adequate activation of alveolar macrophages and expression of genes that activate the microbicidal mechanisms of macrophages are key elements in the eradication of this disease. Data previously reported demonstrated that the F1 fraction extracted from the fungus, whose major component is the β -1,3-glucan, is an important immunomodulator by promoting the inflammatory cells recruitment and stimulating the proinflammatory cytokines production, including TNF- α . Another important component in interaction of host and fungus is the fraction F2, consisting of α -1,3-glucan, that is usually associated with virulence. The change in cell wall composition during infection, as occurs in *P. brasiliensis*, can be considered as escape mechanism to innate immune response. In order to better understand the initial events of this infectious process, total RNAs of macrophages treated and non-treated were analyzed by Real-Time RT-PCR and were evaluated the key genes TNF- α and Cxcl4 (proinflammatory), CD14, Itga5 and Clec2 (membrane proteins), STAT6 (signal transduction), NFkB and Nfkr (transcriptional regulation), Toll2 and Toll4 (pattern recognition receptors), MyD88 (adapter molecule) expression involved in inflammatory process. In these experiments were used alveolar macrophages (MHS) incubated with *P. brasiliensis* and its wall components, in the interaction kinetics (6, 24 and 48 hours). The study demonstrated gene induction involved in chemotaxis processes, which facilitate cell-cell adhesion, and gene induction related to pathogen internalization and adherence, as Clec2, that triggers intense phagocytes recruitment to the infection site. The genes of pattern recognition receptors (Toll2, Toll4) and the adapter molecule MyD88, did not show significant role towards establishment of protective immunity against *P. brasiliensis*. Thus this study revealed induction of genes that code for proteins that will participate in the process of inflammation such as cell migration and activation of microbicide activity of macrophage, especially during the initial stage of the kinetic of interaction.

Palavras chaves: Paracoccidioidomycosis, innate response, alveolar macrophages, gene.

I- INTRODUÇÃO

1) INTRODUÇÃO

1.1. Perfis de Expressão gênica durante o processo infeccioso

A capacidade de microrganismos causarem infecção está relacionada com a complexa interação entre patógenos e hospedeiro. O desequilíbrio no balanço entre a resposta do hospedeiro e mecanismos de virulência pode desencadear os processos de instalação, invasão e multiplicação do microrganismo, que caracterizam a infecção. A patogenicidade destes organismos estabelece uma íntima relação com as estratégias que estes utilizam para infectar e sobreviver aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Estas estratégias de infecção são mantidas pela expressão de um repertório de genes requeridos frente às condições encontradas nos diferentes sítios de infecção. Portanto, o estudo da modulação da expressão gênica do hospedeiro por patógenos, com análise do perfil transcricional vem sendo amplamente utilizado na determinação dos mecanismos de sobrevivência/virulência desencadeados pelo patógeno durante o processo infeccioso.

O fungo *Cryptococcus neoformans* possui a habilidade de disseminar-se na corrente sanguínea e então cruzar a barreira sangue-cérebro causando a meningoencefalite. Utilizando-se a estratégia de análise em série de expressão gênica (SAGE) em células de *C. neoformans* isoladas de fluido cerebrospinal (CSF) de coelhos, o perfil de abundância de transcritos foi caracterizado, visando o entendimento das estratégias de sobrevivência/virulência do parasito na infecção *in vivo*. Os dados revelaram que os transcritos mais expressos são aqueles relacionados com a resposta a estresse, sinalização celular, transporte celular, metabolismo de lipídios e carboidratos. O alto nível de expressão de genes destas categorias sugere que estas funções são requeridas para sobrevivência e proliferação de *C. neoformans* na meningoencefalite (Steen *et al.*, 2003).

O padrão de expressão gênica de *Cândida albicans* foi avaliado para conhecimento da natureza da interação parasito-hospedeiro em diferentes estágios da infecção. Ensaios de microarranjos foram realizados utilizando-se populações de cDNA de *C. albicans* isoladas de rins de camundongos em diferentes etapas da infecção. A adaptação de *C. albicans* ao sítio de infecção renal resultou na expressão diferencial de 19% dos 6737 genes presentes nos microarranjos. A maioria dos genes diferencialmente expressos foi reprimida (85%).

Cinquenta por cento dos fatores regulados correspondiam a proteínas de função desconhecida em *C. albicans* e *Sacharomyces cerevisiae*. Após infecção em rins de camundongos, um grande grupo de genes reprimidos em resposta a este ambiente *in vivo* desempenha um papel nas vias de utilização de glicose. Genes associados com regulação transcricional foi o principal grupo funcional induzido durante infecção *in vivo* (Lorenz e Fink., 2001; Fradin *et al.*, 2003).

A interação entre *C. albicans* e macrófagos é considerado um passo essencial no desenvolvimento de uma resposta imune adequada na candidíase sistêmica. Análises integradas de genômica e proteômica foram utilizadas na compreensão das bases moleculares da interação entre *C. albicans*-macrófago. A clara repressão de genes relacionados com o metabolismo de composto de carbono, somado com a indução de genes envolvidos com metabolismo de lipídeos, ácidos graxos e ciclos do glioxalato e do ácido tricarbóxico sugere que este organismo está mudando para o modo de estarvação. Adicionalmente o estudo da rede metabólica geral deste fungo permite sugerir que as células de *C. albicans* possivelmente disparam diferentes vias de morte celular após o contato com macrófagos. Esta técnica integrada levou ao estabelecimento de correlações de vias celulares específicas as quais refletem uma visão global do fenótipo molecular do fungo neste contexto biológico (Fernandez-Arenas *et al.*, 2007).

Estudos com *Mycobacterium tuberculosis* demonstraram que genes relacionados com reparo de DNA, aquisição de nutrientes, metabolismo de parede celular e fatores de virulência previamente conhecidos, apresentaram expressão induzida durante infecção de macrófagos humanos (Graham e Clark-Curtiss., 1999).

Trabalhos com uma linhagem de *Escherichia coli* causadora de infecção de trato urinário mostraram que a expressão do fator de virulência Iha, que desempenha funções de adesina e receptor para sideróforos, foi aumentada na infecção de trato urinário de camundongos (Leveille *et al.*, 2006).

A tuberculose crônica é um dos principais problemas de saúde da atualidade (Cegielski *et al.*, 2002). Uma questão chave relevante para a tuberculose crônica envolve o estado fisiológico da *M. tuberculosis* durante este importante estágio da infecção. Para examinar as bases moleculares da tuberculose crônica e o papel da imunidade no crescimento da micobactéria, análises de perfis transcricionais do patógeno foram determinadas durante as fases crônicas e de reativação da tuberculose em murinos usando microarranjos de DNA *in vivo*. Dentre as vias metabólicas mais enriquecidas estão aquelas envolvidas no metabolismo

de carboidratos, lipídeos e produção de energia. A transcrição ativa de genes representados por estas vias indica que o patógeno está metabolicamente ativo na fase crônica da tuberculose, podendo utilizar carboidratos e lipídeos como fontes na produção da energia necessária para a manutenção dos processos celulares e para adaptação ao microambiente dos tecidos do hospedeiro. Por outro lado o perfil transcricional na etapa de reativação da doença evidenciou a indução de genes relacionados com a transdução de sinais, divisão celular bem como no metabolismo e captação de ferro e enxofre. As análises dos perfis transcricionais durante diferentes etapas da tuberculose crônica forneceram uma visão dinâmica das mudanças adaptativas da bactéria durante os estágios crônicos e de reativação da infecção (Talaat *et al.*, 2007).

A interação patógeno-hospedeiro pode resultar em diversas alterações na célula hospedeira, incluindo alterações fenotípicas com os rearranjos do citoesqueleto, a ativação de vias de sinalização celular que levam a uma grande reprogramação do transcriptoma (Jenner & Young, 2005). Apesar dos mecanismos pós-transcricionais serem importantes na regulação da resposta celular à infecção, essa regulação ocorre principalmente via modulação dos níveis de RNA (Staudt & Brown, 2000), revelando sua grande importância na resposta do hospedeiro à infecção.

Jenner and Young (2005) analisaram e compararam os dados resultantes de 32 trabalhos originais publicados sobre mudanças do perfil transcricional do hospedeiro em resposta a patógenos. Estes genes envolvidos na resposta comum do hospedeiro foram descritos segundo 5 grupos funcionais como os genes mediadores de inflamação (TNF, IL-1, IL-6 e IL-8, quimiocinas como CCL3, CCL4, CCL20, CXCL1 a 5, enzima cicloxigenase 2 entre outros), genes estimulados por interferon (ISGs) (CCL8, CXCL9 a 11, genes de 11 metaloproteínas, entre outros), genes que ativam a resposta imune (a família do fator de transcrição NF κ B e seu co-receptor BCL3, componentes do fator de transcrição AP1, fatores que mediam o efeito de IFN como o STAT 1, 4 E 5A, fator de transcrição BCL6 (repressor), EGR4, HIF1 α , NFATC1, SMAD7 (inibe a sinalização via TGF β) e XBP1; genes de proteínas adaptadoras de vias de sinalização celular (MyD88, TRADD, TRAF1 e 6), entre outros), genes que limitam a resposta imune (genes que inibem a ação de NF κ B e TANK que inibe o recrutamento de TRAFs para o receptor de TNF; genes de fatores tanto pró-apoptóticos como os anti-apoptóticos e membros da família BCL2) e outros genes da resposta comum ao hospedeiro (genes envolvidos na ativação de linfócitos, na apresentação antígenos, na adesão celular além de metaloproteinases e os genes não relacionados com a resposta).

Silva, SS *et al.*, (2007), empregando a metodologia de microarranjo de cDNA avaliou o perfil transcricional de macrófagos peritoniais murinos em resposta à infecção por *P. brasiliensis in vitro*, durante 6, 24 e 48 horas de interação patógeno-hospedeiro. De forma semelhante ao descrito por Jenner & Young (2005) diversos genes pertencentes à resposta comum do hospedeiro tiveram seus níveis de transcritos alterados, principalmente aqueles relacionados a mecanismos inflamatórios, proteínas de membranas, fatores de transcrição, como também aqueles relacionados a apoptose.

O aumento da expressão de genes relacionados a uma resposta pró-inflamatória também tem sido detectado pela análise de microarranjo a partir de macrófagos infectados com *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Mycobacterium tuberculosis* por meio da técnica de microarranjo (Cortez *et al.*, 2006).

Assim como observado para *P. brasiliensis*, após interagir com os macrófagos o fungo *H. capsulatum* também modula a expressão de genes envolvidos no processo pró-inflamatório, tais como genes relacionados a proteínas de membrana, a fatores de transcrição, a vias de transdução de sinal e apoptose (Silva, SS *et al.*, 2009). Os genes relacionados à transdução de sinal tais como a proteína TXK, cuja função é se ligar à região promotora do gene IFN- γ levando à regulação positiva de sua transcrição (Takeba *et al.*, 2002), são induzidos tanto por *P. brasiliensis* quanto por *H. capsulatum*, sugerindo que esta molécula possui um papel importante na ativação da célula hospedeira, provavelmente regulando positivamente a transcrição de IFN- γ (Silva *et al.*, 2010). Simultaneamente à indução deste gene Silva e colaboradores (comunicação pessoal), observaram também uma intensa modulação positiva induzida por esses fungos de MAP quinases e genes relacionados a transporte de vesículas dos macrófagos. Segundo os autores esses dados observados indicam que provavelmente tanto *P. brasiliensis* quanto *H. capsulatum* induzem uma intensa reorganização celular dos macrófagos no estágio inicial da infecção para responder a invasão pelo patógeno.

A ligação de patógenos com moléculas da matriz extracelular do hospedeiro transduz sinais que irão culminar na ativação de fatores de transcrição responsáveis por ativar genes relacionados à produção de citocinas, quimiocinas, receptores de quimiocinas e moléculas de adesão que poderão auxiliar na fagocitose do microrganismo e ativação dos fagócitos. Neste sentido, Silva e colaboradores (comunicação pessoal), observaram que genes relacionados à ativação transcricional são modulados tanto por macrófagos infectados com *P. brasiliensis* quanto com *H. capsulatum*. A expressão gênica diferencial de NF κ B, por exemplo, foi observada, assim como de outras moléculas que regulam este fator de transcrição, sugerindo dessa forma que um dos mecanismos de ativação de genes relacionados à citocinas pró-

inflamatórias provavelmente é regulado por NFκB. Outra molécula diferentemente regulada nos macrófagos durante a interação com esses fungos foi a que codifica para a proteína CD14, e que é relacionada a uma maior capacidade de invasão do fungo às células hospedeiras. Esta molécula foi induzida em macrófagos durante a interação com *P. brasiliensis* e reprimida durante a interação com *H. capsulatum*, o que sugere que os macrófagos modulam negativamente este gene possivelmente na tentativa de diminuir a invasão por estes patógenos a novas células.

É importante notar que apesar dos genes da resposta comum do hospedeiro ser induzidos em diferentes tipos celulares durante infecção, alguns grupos gênicos são preferencialmente induzidos em um tipo celular quando comparados a outros. Essas diferenças provavelmente refletem os diferentes papéis celulares durante a resposta imune.

1.2. Perfis de expressão gênica do fungo *P. brasiliensis*

Estudos dos perfis de expressão de patógenos têm sido amplamente utilizados para o desvendamento das estratégias de adaptação, sobrevivência e virulência que estes microrganismos utilizam durante o processo infeccioso. Com o objetivo de estudar a biologia de *P. brasiliensis*, suas estratégias de infecção e conseqüentemente aumentar o número de genes descritos para este fungo, diferentes abordagens no estudo de perfis de expressão tem sido aplicadas. Um projeto genoma Funcional de *P. brasiliensis*, desenvolvido por laboratórios da região Centro-Oeste do Brasil (Projeto Genoma Funcional e diferencial de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado *Pb01*), resultou no sequenciamento de 25.511 ESTs obtidas de bibliotecas de cDNA de levedura e micélio, abrangendo aproximadamente 6.022 genes que representam cerca de 80% do número total de genes estimados para o microrganismo (Felipe *et al.*, 2003; Felipe *et al.*, 2005). Tal estratégia possibilitou a detecção de genes diferencialmente expressos nas duas fases de *P. brasiliensis*. Análises comparativas realizadas com outros fungos patogênicos humanos tais como *C. albicans*, *C. neoformans* e *Aspergillus fumigatus* identificaram genes de virulência e possíveis alvos para drogas. Além disso, estudos comparativos entre micélio e levedura identificaram um perfil metabólico diferencial exibido nas fases de *P. brasiliensis*. Além disso, nesse transcriptoma identificou-se 48 transcritos de proteínas de resposta a estresse chamadas de HSPs, sendo que o número destes transcritos foi 38% maior na biblioteca de levedura do que na biblioteca de micélio. Estas proteínas estão envolvidas em processos como transição dimórfica e imunopatogenicidade de organismos patógenos. Este fato é compatível com a maior

temperatura (36°C) de crescimento de células leveduriformes em relação ao micélio (23°C) (Felipe *et al.*, 2005).

Um grupo de pesquisadores do estado de São Paulo realizou outro projeto Genoma Funcional identificando 4.692 genes do isolado *Pb18*. No banco de ESTs gerado foram identificados vários fatores de virulência através de comparações com homólogos de *C. albicans*. Os genes de vias de transdução de sinais têm sido implicados na transição dimórfica e consequentemente na patogenicidade de fungos dimórficos. A identificação de alguns genes de *P. brasiliensis* homólogos à via de transdução relacionados à virulência de *C. albicans*, como CST20 (quinase relacionada com a formação de hifa), CPP1 (fosfatase relacionada com formação de hifa) e CEK1 (proteína quinase ativada por mitose) encontrados neste estudo, sugere que estas vias possam estar atuando em *P. brasiliensis*, provavelmente controlando a mudança morfológica (Goldman *et al.*, 2003).

O perfil transcricional de alguns genes foi avaliado durante a transição dimórfica e foi revelado que transcritos de três proteínas de choque térmico (HSP-70, HSP-82 e HSP-104), de um homólogo da proteína delta-9-desaturase (OLE1) e da oxidase alternativa, possuem picos de expressão durante a transição de micélio para levedura, sugerindo que a estabilização de proteínas e mudanças na organização da membrana são fatores importantes na transição morfológica de micélio para a forma de levedura (Goldman *et al.*, 2003).

A mudança morfológica de *P. brasiliensis* é acompanhada pela mudança na composição da parede celular onde monômeros de glicana passam de β -1,3-glicana para α -1,3-glicana, assim que o fungo adota a forma leveduriforme (San-Blas e Nino-Vega., 2001). De maneira complementar observou-se uma expressão muito maior do gene que codifica a α -1,3-glicana sintase na fase de levedura do que na fase de micélio (Marques *et al.*, 2004).

O perfil transcricional de *P. brasiliensis* durante a transição dimórfica tem sido alvo de estudos de pesquisadores devido sua íntima relação com a patogênese deste fungo. Microarranjos de DNA foram utilizados para análise de expressão de diferentes etapas da diferenciação (Nunes *et al.*, 2005). Nesse estudo foram identificados vários genes diferencialmente expressos durante a transição morfológica. As análises revelaram várias enzimas reguladas que participam do metabolismo de aminoácidos, vias de transdução de sinais, síntese protéica, metabolismo da parede celular, estrutura do genoma, resposta ao estresse oxidativo e controle de crescimento e desenvolvimento celulares. O gene codificante para a enzima 4-hidroxi-fenil-piruvato dioxigenase (4-HPPD), envolvida na degradação de aminoácidos aromáticos, foi superexpresso durante a diferenciação de micélio para levedura,

e o uso de NTBC [2-(2-nitro-4-trifluorometilbenzoil)-ciclohexano-1,3-diona], um inibidor específico da atividade de 4-HPPD, foi capaz de bloquear o crescimento e a diferenciação deste organismo *in vitro* (Nunes *et al.*, 2005).

A estratégia de transcriptoma também foi utilizada para o estudo da resposta do fungo nos estágios iniciais da transição micélio-levedura (Bastos *et al.*, 2007). Este trabalho mostrou que muitos genes estão envolvidos na síntese da membrana e parede celulares após 22 horas do início da diferenciação são superexpressos, sugerindo que o fungo remodela estas estruturas no estágio inicial da mudança morfológicas. Neste estudo, genes envolvidos na via de assimilação do enxofre como a sulfito redutase, mostraram-se superexpressos durante a transição, sugerindo o envolvimento do metabolismo do enxofre durante o processo de diferenciação em *P. brasiliensis*. Durante a transição também foi verificada a presença de enzimas que participam do ciclo do glioxalato, como a isocitrato liase, malato desidrogenase, citrato sintase e aconitase. A presença destes transcritos durante a diferenciação indica que esta via é funcional durante esse processo. Também foram identificados genes envolvidos em vias de transdução de sinais tais como MAPK, serina/treonina quinase e histidina quinase, sugerindo o papel de tais vias no controle e manutenção da transição morfológica em *P. brasiliensis* (Bastos *et al.*, 2007).

Almejando avaliar as estratégias de infecção utilizadas por *P. brasiliensis*, foram desenvolvidos trabalhos nos quais foi possível definir o perfil dos transcritos do fungo isolado Pb01, em leveduras pós-infecção em fígado de animais experimentais. Recentemente, o transcriptoma de *P. brasiliensis*, fase leveduriforme, recuperado de fígado de animais experimentais (camundongos B10A) foi descrito (Costa *et al.*, 2007). Foram sequenciados clones, gerando 4.932, sendo 37,47% relacionadas a novos genes e 23,75% pertencentes a genes superexpressos. Os genes identificados foram categorizados em processos metabólicos, transporte celular e energia, entre outras categorias dentre os transcritos mais expressos estão alguns que foram previamente descritos como mais expressos em células leveduriformes quando comparadas com micélio, tais como os genes da álcool desidrogenase I, descarboxilase de aminoácido ácido e isocitrato liase (Felipe *et al.*, 2005). A interpretação geral dos processos que ocorrem durante a infecção sugere que o fungo utiliza múltiplas fontes de carbono durante a colonização do fígado, incluindo glicose e substratos do ciclo do glioxalato.

O fungo *P. brasiliensis* possui inúmeros processos adaptativos ao hospedeiro em resposta à fagocitose como demonstrado por Tavares *et al.*, (2007). Após a internalização, o patógeno

promove adaptação metabólica induzindo a expressão de genes de biossíntese de aminoácidos, especificamente genes envolvidos na biossíntese de metionina. A cistationa β -liase de *P. brasiliensis* codificada pelo gene metG, associado à produção de metionina, foi induzida após fagocitose de macrófagos murinos. A super regulação do gene metG pode conferir uma importante resposta adaptativa para a sobrevivência de *P. brasiliensis* dentro dos macrófagos onde a concentração de aminoácidos é baixa. Neste estudo, também se observou a superexpressão do gene HSP60 em *P. brasiliensis*. Tem sido observado que células que apresentam altos níveis de HSp60 são mais resistentes a agentes oxidativos como H₂O₂ e menadiona (Cabiscol *et al.*, 2002). A indução do gene da HSP60 em *P. brasiliensis* exposto a radicais oxidativos produzidos por macrófagos, pode ter função protetora similar (Tavares *et al.*, 2007).

1.3. A Paracoccidioidomicose e Mecanismos imunoregulatórios

Paracoccidioides brasiliensis é o agente causador da paracoccidioidomicose (PCM), doença granulomatosa crônica que acomete principalmente os pulmões, pele, mucosas e linfonodos. O *P. brasiliensis* apresenta dimorfismo termo-dependente, desenvolvendo-se na forma de levedura em vida parasitária ou quando cultivado em meios de cultura a 37°C. As culturas mantidas à temperatura ambiente (20-24°C) apresentam-se, na fase miceliar, com colônias de aspecto cotonoso, micélio hialino com hifas finas, septadas, com conídios terminais (Franco *et al.*, 1989; Brummer, Castaneda & Restrepo, 1993). A PCM foi observada pela primeira vez no Brasil por Adolpho Lutz em 1908, que isolou o fungo de lesões nasofaríngeas de paciente (Lacaz, 1991).

A PCM se distribui pelas regiões tropicais e subtropicais da América Latina, desde o norte do México até o Sul da Argentina (Barbosa & Daher, 1991). Os países mais atingidos são o Brasil, Argentina, Venezuela, Colômbia e Equador, onde afeta endemicamente a população rural. O Brasil possui mais de 80% dos registros da doença, sendo que as maiores incidências concentram-se nas regiões sudeste e centro-oeste. Calcula-se que 10 milhões de pessoas estão infectadas pelo fungo, das quais 2% podem desenvolver a doença. Fatores de risco como tabagismo, etilismo e desnutrição são frequentemente associadas à doença (Travassos, 2000).

A PCM é adquirida através da inalação de conídios produzidos pela forma miceliana do fungo, sendo os pulmões os primeiros órgãos a serem atingidos e a partir dos quais a infecção pode ou não se disseminar. A história natural da doença tem sido confirmada por estudos de pacientes com PCM pulmonar utilizando tomografia computadorizada de alta resolução, evidenciando as seguintes etapas: 1) inalação, com focos parenquimatosos exsudativos, que regridem com o tratamento ou evoluem para a forma produtiva ou mais raramente para a escavação. 2) progressão das lesões iniciais para fase produtiva com nódulos densos, insuflação periférica, alargamento fibroso de septos perilobulares, necrose e formação de cavidades, 3) extensão do foco parenquimatoso para as vias linfáticas broncopulmonares (Quagliato *et al.*, 1999).

A defesa imunológica do hospedeiro mamífero contra as micoses sistêmicas é complexa e multifatorial, dependendo de mecanismos inatos e adaptativos (Huffnagle & Deepe, 2000).

O primeiro local de contato entre o fungo *P. brasiliensis* e o hospedeiro é o epitélio respiratório, onde estão os macrófagos alveolares, que provavelmente são as primeiras células do sistema imune a interagirem com o parasito, e as células epiteliais alveolares, as quais contribuem para a sinalização e ativação da resposta imune (Mendes Giannini *et al.*, 2004; Romani, 2004; Filler e Sheppard, 2006; Calich *et al.*, 2008; Mendes Giannini *et al.*, 2008).

Em um experimento realizado por MacLean *et al.* (1996), foram estimados que os macrófagos alveolares eram capazes de lidar com até 10^9 bactérias injetadas intratraquealmente antes do microrganismo ser reconhecido pelas células dendríticas, as quais ativam o sistema imune adaptativo. Fundamentalmente, a ativação da imunidade celular é vital para o controle efetivo e proteção contra a PCM tanto em humanos como em modelos murinos (Singer Vermes *et al.*, 1994), como também contra outros fungos (revisado em Romani, 2004). Nesses mesmos modelos, a resposta imune inata demonstra ter papel fundamental no controle da disseminação do fungo nas fases iniciais da infecção e na determinação do destino da infecção (Calich, Vaz e Burger, 1998; Calich *et al.*, 2008).

Os macrófagos alveolares, como mencionado anteriormente, são provavelmente a primeira célula do sistema imune a interagir com *P. brasiliensis* e exerce um papel crucial para sua restrição inicial pelo hospedeiro (Romani, 2004; Calich *et al.*, 2008), sendo a importância do sistema mononuclear fagocítico evidenciada pelo trabalho de Kashino *et al.* (1995), no qual foi mostrado que o bloqueio deste sistema aumentava a severidade da enfermidade tanto em animais resistentes quanto em suscetíveis. Brummer *et al.* (1989) demonstraram que macrófagos alveolares não ativados são capazes de fagocitar as leveduras,

tanto *in vivo* quanto *in vitro*, mas também podem conferir um ambiente propício para a multiplicação de *P. brasiliensis*. Por outro lado, quando os macrófagos são ativados apresentam ação fungicida por desintegrarem as estruturas citoplasmáticas e romperem a membrana plasmática; permanecendo íntegra somente a parede celular das leveduras (Brummer *et al.*, 1989; Brummer *et al.*, 1990). Essa relação também se evidencia quando os macrófagos alveolares são analisados após uma infecção pulmonar em camundongos, no qual peróxido de hidrogênio encontra-se ausente nos suscetíveis e é produzido através do curso da infecção nos resistentes (Cano *et al.*, 1995). Embora comprovado que a ativação de macrófagos peritoniais de camundongos por $\text{INF}\gamma$ aumente a atividade fungicida independente de explosão oxidativa (Brummer, Hanson e Stevens, 1988), o papel do óxido nítrico demonstrou-se fundamental para a habilidade fungicida destas células, que por mecanismo de restrição de ferro inibem a transformação do conídio ingerido à levedura (Cano *et al.*, 1994; Gonzalez *et al.*, 2000). Além de seu papel no combate a microrganismos aéreos (revisado em Romani, 2004), os macrófagos alveolares desempenham um papel no direcionamento da resposta imune adaptativa, que no caso de *P. brasiliensis* se encontra resumido na figura 2.

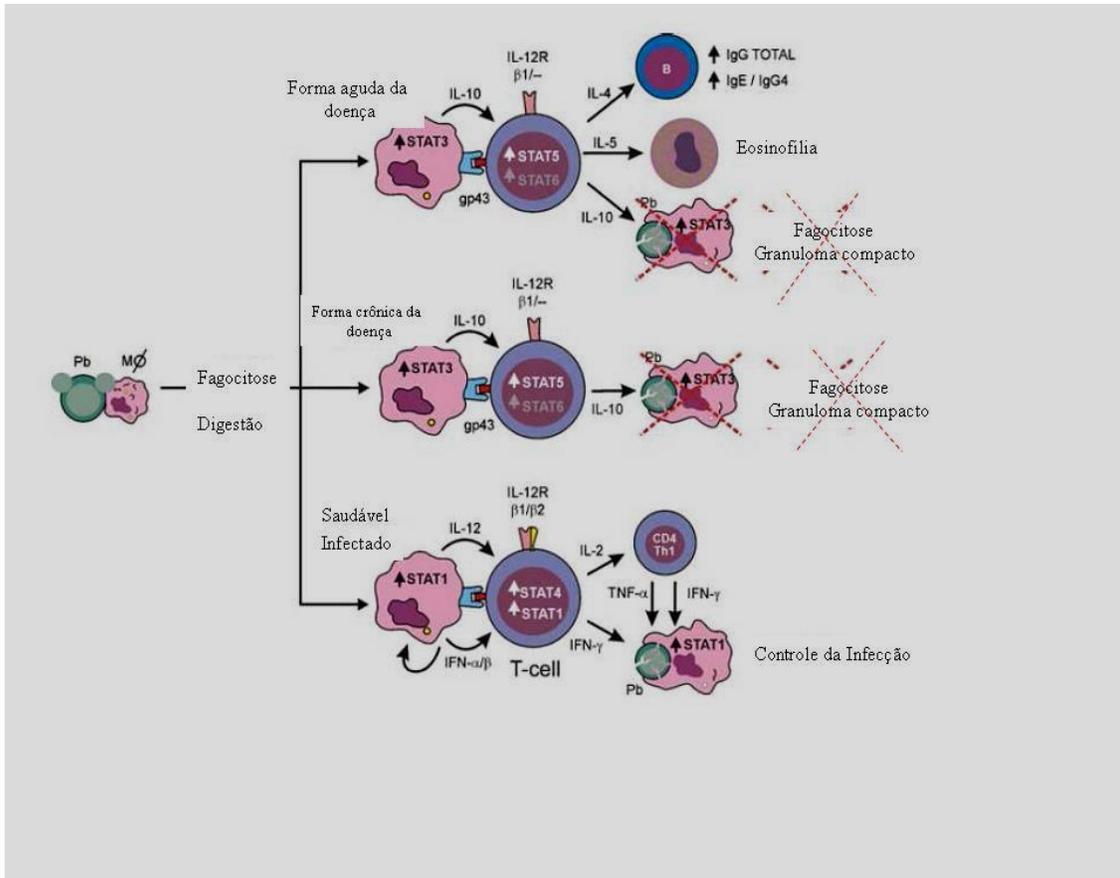


Figura 1. Resumo da regulação de citocinas associada às três principais formas de PCM, baseadas nas respostas imunes à glicoproteína 43kDa (gp43), componente antigênico imunodominante da forma leveduriforme de *P. brasiliensis* (Benard, 2008). Pb, *P. brasiliensis*; MØ, macrófago; IL, interleucina; IL 12R, receptor da IL 12; $\beta 1$ e $\beta 2$, subunidades do IL 12R; IFN, interferon; TNF, fator de necrose tumoral; STAT, tradutores de sinal e ativadores da transcrição.

A glicoproteína de peso molecular 43 kDa (gp43), também denominada antígeno E2 de Yarzabal, é uma proteína que age como receptor de laminina, sendo provavelmente responsável pela adesão de leveduras de *P. brasiliensis* às células do hospedeiro. Popi *et al.* (2002) demonstraram que a gp43 inibe a capacidade de fagocitose de macrófagos de camundongos, bem como sua atividade fungicida. Esse é o mais importante antígeno exocelular do fungo em sua fase leveduriforme e talvez seja o seu principal fator de virulência (Borges-Walmsley *et al.*, 2002; Camargo & Franco., 2000 Hogan *et al.*, 1996; Mendes-Giannini *et al.*, 2000; Travassos *et al.*, 1995).

É sugerido por observações indiretas que a Fração F2, cujo principal componente é polissacarídeo α -1,3-glicana, encontrado externamente na parede celular de leveduras de *P.*

brasiliensis, presente outro fator de virulência. Em modelos animais, demonstrou-se que o cultivo por tempo prolongado de isolados virulentos do fungo leva, inevitavelmente, à redução da concentração de α -1,3-glicana na parede das células, diminuição da espessura da parede celular mensurada por microscopia eletrônica e perda da sua virulência em modelos animais. Essas modificações são revertidas tanto pela sua inoculação sucessiva em animais quanto pelo seu crescimento *in vitro* em meios suplementados com soro fetal bovino. Acredita-se que essa molécula possa proteger o fungo contra o ataque de leucócitos do hospedeiro, formando um invólucro, já que os fagócitos não possuem α -glucanases. Por outro lado, o polissacarídeo β -glicana, cuja concentração na parede celular de *P. brasiliensis* é inversamente proporcional à de α -1,3-glicana, é um potente indutor de resposta inflamatória e, portanto, sua presença em maior proporção torna mais fácil o reconhecimento do fungo pelo sistema imunológico do organismo parasitado e o conseqüente estabelecimento de resposta inflamatória contra o parasita, visando a sua eliminação (Borges-Walmsley *et al.*, 2002; Hogan *et al.*, 1996).

Estudos recentes demonstraram que as células de *P. brasiliensis* produzem melanina na presença de L-DOPA (Gómez *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2006). A melanina é sabidamente um fator de virulência encontrado em diversos patógenos de plantas e animais (Borges-Walmsley *et al.*, 2002; Gómez & Nosanchuk, 2003). A taxa de fagocitose das células de *P. brasiliensis*, quando melanizadas, é significativamente reduzida, independente da origem do macrófago. A normalização da fagocitose é estabelecida após a adição de anticorpos específicos anti-melanina ao meio onde se encontra o fungo. As células fúngicas melanizadas são também menos susceptíveis à fagocitose mediada por complemento e aos efeitos fungicidas e fungistáticos de produtos derivados de oxigênio e nitrogênio, em comparação às células fúngicas não-melanizadas. Além disso, verificou-se maior resistência daquelas células a antifúngicos potentes, como Anfotericina B e azólicos (Silva *et al.*, 2006).

Macrófagos ativados pelo IFN- γ produzem compostos reativos com ação fungicida contra o *P. brasiliensis* como o óxido nítrico e o peróxido de hidrogênio (Nathan *et al.*, 1983; Brummer *et al.*, 1988; Gonzales *et al.*, 2000; Neworal *et al.*, 2003). A administração de IFN- γ recombinante em camundongos infectados potencializa a fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis*, impedindo o progresso da infecção (Cano *et al.*, 1992), enquanto a neutralização dessa citocina induz a exacerbação da infecção pulmonar, a disseminação fúngica precoce para outros órgãos, a diminuição de resposta de HTT e o aumento nos níveis de anticorpos IgG1 e IgG2b (Cano *et al.*, 1998). Karwahi *et al.* (2000) demonstraram que células

mononucleares do sangue periférico de pacientes com paracoccidiodomicose apresentam a produção de IFN- γ diminuída durante a doença ativa, fato que pode ser revertido após o tratamento.

O IFN- γ estimula a produção de IL-12 e outras citocinas inflamatórias como o TNF- α por células fagocíticas, participando de um mecanismo de retroalimentação positivo, amplificando a resposta inflamatória nas infecções, sendo considerado o principal ativador de macrófagos (Nathan *et al.*, 1983; Lake *et al.*, 1994; Kullberg e Anaissie, 1998).

Uma citocina importante é o TNF- α produzida por monócitos/macrófagos ativados pelo estímulo antigênico, por IFN- γ e também por linfócitos Th1, e tem atividade citotóxica para células tumorais. A ação imunorreguladora do TNF- α é exercida através do aumento da expressão de moléculas de adesão, da ativação de polimorfonucleares (PMNs) e macrófagos estimulados por IFN- γ , para os quais atua como um segundo sinal (Ruddle, 1987). A detecção de níveis elevados de TNF- α no soro de pacientes com PCM foi relatada por Silva e Figueiredo, 1991. O TNF- α aumenta a atividade fungicida de monócitos humanos estimulados com antígenos de parede celular do *P. brasiliensis* (Anjos *et al.*, 2002) e de macrófagos de hamsters infectados (Parise-Fortes *et al.*, 2000), limitando a disseminação fúngica.

Os componentes lipídicos do fungo assim como outros componentes de sua membrana podem ser reconhecidos pelos macrófagos através dos Toll-Like Receptors (TLRs). Cada vez mais vem sendo demonstrada a importância dos receptores da família Toll-Like no reconhecimento de diversos patógenos. Eles são responsáveis por conferir certa especificidade à imunidade inata. Esta especificidade reside no fato dos TLRs reconhecerem padrões moleculares de componentes biológicos associados à membrana ou outros compostos biológicos de patógenos (Hoffmann *et al.*, 1999; Aderem & Ulevith, 2000). Hoje se sabe que a importância dos TLRs vai, além disso, pois podem também participar da resposta humoral através da ativação do linfócito B (Medzhitov & Pasare, 2005). Também estão expressos nos linfócitos T, nestas células os TLR-2, TLR-3, TLR-5 e TLR9 atuam como receptores co-estimulatórios e propiciam o aumento da produção de citocinas e/ou proliferação do linfócito T ativado. Dentre estes receptores há o TLR-4 que interage com o receptor CD14 e media a sinalização citoplasmática induzida por LPS microbiano (Chow *et al.*, 1999).

Quando ativados, os TLRs desencadeiam uma sinalização intracelular que geralmente culmina com a ativação do macrófago e síntese de compostos que venham a eliminar o patógeno, ou até mesmo, a ativação macrofágica via TLRs culmina com o aumento da fagocitose do patógeno e possível crescimento e proliferação intracelular (Van Der Graaf *et*

al., 2005); esta ativação ocorre através da ativação do fator de transcrição NFκB que ativa genes a produzirem citocinas que estão ligadas à inflamação como o TNF-α e IL-1, proliferação celular (IL-2) e apoptose. A ativação final do NFκB pode ser desencadeada por um sinal proveniente de um TLR e a via de sinalização pode ser dependente ou independente do Fator 88 de diferenciação mielóide (MyD88). Se a via de ativação for independente de MyD88, o sinal proveniente do TLR ativa o NFκB através da via dependente do fator induzido por IFN-β (TRIF). Se for dependente de MyD88, esta proteína desencadeará uma cascata de ativação de proteínas citosólicas que culminará com a ativação do fator de transcrição NFκB (Akira & Uematsu, 2006; Doyle & O'Neill, 2006).

São poucos os trabalhos até o momento que estudaram os receptores envolvidos no reconhecimento de *P. brasiliensis* por macrófagos. Jimenez *et al.* (2006), realizaram um estudo com macrófagos de medula óssea de camundongos congênicos das linhagens B10R que expressavam o gene *Nramp1*, característico do padrão de susceptibilidade à *M. tuberculosis*, e B10S que não expressavam esse gene, para avaliar a capacidade fagocítica destas células sobre conídios (opsonizados ou não) de *P. brasiliensis*. Foi observada uma alta porcentagem de fagocitose para as duas linhagens de macrófagos (B10R e B10S); no entanto, os macrófagos B10R apresentaram maior porcentagem de células associadas aos conídios e altos números de conídios por macrófagos. Realizaram também experimentos de opsonização com soro inativado e realizaram o tratamento dos macrófagos com o anticorpo anti-CR3. Ocorreu uma diminuição da fagocitose para ambas as linhagens, e mais ainda, o bloqueio de receptores de manose também levou à redução da fagocitose.

Outro aspecto de grande importância para o desenvolvimento de uma resposta imunológica efetiva é a migração das células efetoras para os sítios de infecção. Para que os leucócitos deixem os vasos e migrem para o sítio inflamatório, citocinas e quimiocinas modulam a expressão de moléculas de adesão, envolvidas na marginação, adesão e posterior diapedese das células. A grande maioria das moléculas de adesão pode ser agrupada em duas famílias principais as integrinas e as selectinas (Gonzales-Amaro e Sanchez-Madrid, 1999), expressas tanto na superfície do endotélio vascular como na membrana dos leucócitos. Integrinas do tipo β2, especialmente CD11a/CD18 (LFA-1) e CD54 (ICAM-1) são implicadas na migração de leucócitos, apresentação do antígeno, fagocitose e produção de derivados reativos de oxigênio. Expressão elevada de integrinas β2 foi observada em leucócitos do sangue periférico de pacientes com sarcoidose e tuberculose (Shakoor e Hamblin, 1992; Yassin e Hamblin, 1994). Macrófagos alveolares de pacientes com tuberculose expressam níveis elevados de CD11b/CD18, o que poderia estar relacionado a uma produção aumentada

de produtos reativos de oxigênio (Kuo *et al.*, 1996). A expressão das moléculas de adesão na superfície das células depende da estimulação por citocinas inflamatórias como o TNF- α , IL-1 β e IL-6, e também pode ser induzida por alguns produtos bacterianos como o LPS (Gonzales-Amaro e Sanchez-Madrid, 1999).

Além da participação das moléculas de adesão, o recrutamento das células do sistema imune para o sítio de infecção é controlado por citocinas com propriedades quimiotáticas denominadas quimiocinas. Quimiocinas são citocinas que induzem a migração dirigida de subpopulações de leucócitos para os locais de inflamação. As quimiocinas são proteínas estruturalmente relacionadas ou homólogas e podem ser subdivididas em 4 subfamílias: CXC (ou α) nas quais as duas primeiras cisteínas da molécula são separadas por um aminoácido, CC (ou β) nas quais as duas primeiras cisteínas são adjacentes, CX3C (ou γ) com três aminoácidos entre as duas primeiras cisteínas e C (ou δ) nas quais falta uma das cisteínas (Adams e Lloyd, 1997; Rollins, 1997; Rot e Von Andrian, 2004). As quimiocinas do tipo CXC que contém a seqüência ácido glutâmico-leucina-arginina (denominadas de ERL), precedendo a seqüência CXC, são quimiotáticas para neutrófilos (CXCL8 (IL-8), entre outras) e aquelas que não contém esta seqüência atuam sobre linfócitos (CXCL9 (Mig) e CXCL10 (IP-10), entre outras).

A ação das quimiocinas se dá por meio de sua ligação a receptores específicos, presentes na superfície das células (Luster, 1998). A expressão diferencial desses receptores nas diversas fases da resposta imunológica é que irá controlar a migração dos leucócitos entre os diversos locais de atuação. Recentemente, foram descritos receptores de quimiocinas que são expressos preferencialmente em células Th1 (CXCR3) e Th2 (CCR3, CCR4 e CCR8), demonstrando a importância destas proteínas na migração de células específicas e no controle da resposta imune (Sallusto *et al.*, 1998, Sallusto *et al.*, 1999). Em trabalho recente Souto *et al.* (2003) verificaram que células pulmonares e esplênicas de camundongos produzem diferentes quimiocinas durante a infecção por *P. brasiliensis*, com alta expressão de CXCR3 e CCR5, CCL5 (RANTES), CXCL9 (Mig) e CXCL10 (IP-10), sugerindo uma resposta protetora do tipo Th1. Em um trabalho realizado anteriormente onde foram comparados os níveis de CXCL8 (IL-8) no soro de pacientes com paracoccidiodomicose foi observado uma diminuição desta quimiocina no soro de pacientes com a Forma Juvenil da paracoccidiodomicose (Mamoni *et al.*, 2002).

Se as moléculas de adesão e quimiocinas promovem a migração de células para sítios inflamatórios, a expressão de moléculas do MHC classe II e moléculas co-estimulatórias como B7-1(CD80) e B7-2 (CD86), são essenciais para a apresentação de antígenos para os

linfócitos T. Baixa expressão de moléculas do MHC classe II ou de moléculas co-estimulatórias na superfície das células apresentadoras de antígeno (APCs) pode prejudicar de forma importante o reconhecimento de antígenos e a resposta imunológica como um todo (Cantrell *et al.*, 1996; Matulonis *et al.*, 1996).

As citocinas imunorreguladoras que determinam o desenvolvimento da resposta Th1/Th2 modulam a expressão das moléculas co-estimulatórias B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86). A IL-4 e a IL-10, características da resposta Th2 induzem a diminuição da expressão de B7-2, enquanto que o IFN- γ , citocina Th1, induz o aumento da expressão das moléculas B7-1/B7-2 e do MHC classe II. Por outro lado, o TNF- α suprime a expressão do B7-2, mas parece não alterar a expressão do B7-1 (Creery *et al.*, 1996).

A maneira pela qual ocorre a apresentação de antígeno tem enorme repercussão sobre o tipo de resposta imunológica que será produzida. Alguns estudos indicam que o tipo de célula apresentadora de antígeno também pode ter influência na diferenciação do tipo de resposta imunológica que será desenvolvida. Dessa forma, macrófagos estimulariam clones de células T a secretar citocinas como IL-2 e IFN- γ , enquanto células B ativariam clones Th2, produtores de IL-4 e IL-10 (Fiorentino *et al.*, 1991; Gajawski *et al.*, 1991). Almeida *et al.* (1998) e Almeida e Lopes (2001) observaram que em camundongos resistentes à infecção induzida experimentalmente pelo *P. brasiliensis*, antígenos de *P. brasiliensis* são preferencialmente apresentados por macrófagos e células dendríticas, e através da secreção de IL-12 estimulam a produção de citocinas Th1. Por outro lado, em animais suscetíveis a apresentação do antígeno via células B leva a uma forte ativação da subpopulação Th2.

Todos esses fatores evidenciam que a resposta imunológica desencadeada contra um patógeno é complexa e multifatorial. A melhor compreensão desse processo no desenvolvimento da doença, ou na resistência à ela, pode permitir intervenções terapêuticas mais efetivas, diminuindo custos com internações e reduzindo o tempo necessário para o tratamento.

II-OBJETIVOS

2) OBJETIVOS

2.1) Objetivo geral

Avaliar a expressão de genes chaves no processo inflamatório induzidos pelo fungo dimórfico *P. brasiliensis* ou seus componentes de parede em macrófagos alveolares da linhagem MHS.

2.2) Objetivos específicos

- 1-** Analisar a expressão diferencial temporal dos genes de macrófagos alveolares durante a interação com leveduras do *P. brasiliensis* ou seus componentes de parede por RT-PCR em tempo real (qRT-PCR);
- 2-** Avaliar a produção de Óxido Nítrico pelos macrófagos após a estimulação com o *P. brasiliensis* ou seus componentes de parede;
- 3-** Realizar uma análise comparativa da resposta do hospedeiro frente à infecção com *P. brasiliensis* ou seus componentes de parede em macrófagos alveolares.

III- METODOLOGIA

3) METODOLOGIA

3.1. Cultivo do fungo

Foram utilizadas leveduras de *P. brasiliensis* isolado Pb01 (ATCC-MYA-826) crescidas em meio de cultura semi-sólido Fava-Neto (Fava-Neto., 1961) a 37°C por 7 dias antes da infecção dos macrófagos alveolares.

3.2. Obtenção das frações da parede celular do *P. brasiliensis*.

Extração da fração F1

A fração F1 apresenta como principal componente a β -1,3-glicana. Para a obtenção desta fração, após o cultivo do fungo, as formas leveduriformes foram inativadas com formaldeído a 5%, por um período de 24h e filtradas em papel de filtro, lavada por 3 vezes com água destilada e secas a temperatura ambiente. A seguir o material foi macerado com nitrogênio líquido, ressuspensão em água destilada e centrifugado por 5 vezes a 1968 x g para retirada de resíduos celulares. A etapa seguinte foi a extração lipídica, feita com uma solução de clorofórmio e metanol (proporção 2:1). A extração foi realizada sob agitação magnética, à temperatura ambiente por 4 horas. O material foi então centrifugado a 1968 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente, filtrado em papel de filtro e seco em estufa a 37°C por 48h.

A parede celular bruta obtida da massa do fungo foi pesada e ressuspensa em NaOH 1N na concentração de 10 mg/ml à temperatura ambiente por 1h e centrifugada a 3075 x g a temperatura ambiente por 20 minutos. O sobrenadante obtido contém as frações F2 e F3 e foi reservado para obtenção da fração F2. O precipitado foi submetido ao mesmo tratamento com 75ml de NaOH 1N por 4 vezes, originando um resíduo alcali-insolúvel que foi lavado com água destilada até que o pH do precipitado fosse igual a 7,0. Após a neutralização, o resíduo foi lavado com uma solução de etanol, acetona e éter (na proporção 100mL/100mL/100mL), e foi seco em estufa a 37°C (Alviano *et al.*, 1991; Silva *et al.*, 1985).

Extração da fração F2

O principal componente da fração F2 é a α -1,3-glicana. Para isolamento e purificação desta fração, o sobrenadante reservado na extração da fração F1 foi acidificado com HCL 1M. O precipitado contendo o pigmento foi centrifugado a 3075g por 10 minutos a 4°C, e lavado

três vezes com água destilada. O pigmento insolúvel foi ressuspensão em HCL 0,1M e centrifugado a 12298 x g, para retirada de resíduos celulares por várias vezes até que o sobrenadante formado ficasse incolor. O precipitado foi dialisado em água destilada, por 2 dias e com 5 trocas no total (Alviano *et al.*, 1991).

3.3. Cultivo dos Macrófagos e manutenção

Macrófagos alveolares-MHS: A linhagem de macrófagos alveolares MHS (ATCC: CRL-2191) foi utilizada nos experimentos de infecção com *P. brasiliensis* e suas frações. As células MHS foram mantidas em nitrogênio líquido em meio de congelamento sendo feitas passagens periódicas em meio de cultura RPMI para manutenção de sua viabilidade. Para os experimentos as células foram previamente descongeladas e mantidas em cultura por 48 horas em meio RPMI contendo soro fetal bovino (SBF) 10%.

3.4. Interação dos macrófagos com leveduras de *P. brasiliensis* ou suas frações: F1, F2.

Células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram suspensas em 1mL de meio RPMI contendo 20% de soro fresco de camundongo. A opsonização foi realizada incubando suspensões das células a 37°C, por 30 minutos. As culturas de macrófagos presentes na microplaca foram infectadas com 1×10^5 leveduras e as monocamadas de macrófagos nos frascos de cultura foram infectadas com $0,4 \times 10^6$ células de leveduras na proporção levedura-macrófagos de 1:5. O tratamento das culturas dos macrófagos com a fração F1 e a fração F2, que estão numa concentração de 300µg/mL foram diluídos em 1:10 em solução salina tamponada, e aplicado 500µL das frações nos frascos de culturas dos macrófagos. As culturas foram incubadas a 37°C sob uma atmosfera de 5% de CO₂ por 6, 24 e 48 horas para análise da expressão de genes durante uma cinética de interação dos macrófagos com *P. brasiliensis*, F1, F2. Para dosagem do óxido nítrico após 6, 24 e 48 horas após infecção, o sobrenadante foi coletado e estocado a -20°C.

3.5. Análise da cinética de internalização de leveduras de *P. brasiliensis* por macrófagos

Após 6, 24 e 48 horas de infecção, descartou-se o meio RPMI da placa e as lamínulas foram coradas com corante Panótico[®] (Laborclin). Utilizando microscopia óptica, foram analisadas 100 células de cada preparação com objetiva de imersão (100x). Os experimentos foram realizados em triplicata.

A capacidade fagocitária foi expressa pelo percentual de fagócitos envolvidos na fagocitose, pelo número médio de leveduras fagocitadas por macrófagos e pelo índice fagocitário, produto destas duas determinações (Shaw & Griffin., 1981).

IF= % fagócitos envolvidos na fagocitose x média de leveduras fagocitadas.

3.6. Dosagem da concentração de Óxido Nítrico

O Óxido Nítrico (NO) decompõem-se espontaneamente em nitritos (NO^-_2) e Nitratos (NO^-_3) no meio de cultura e a produção de NO^-_2 pelos macrófagos pode ser dosado por ensaio colorimétrico baseado na reação de Griess (Green *et al.*, 1981). Para esta dosagem foi adicionado aos sobrenadantes o mesmo volume do reagente de Griess, que continha NEED 0,1% [N-(1-Naphthyl) ethylenediamine – Sigma, USA] e sulfanilamida 1% (Vetec, Brasil). As amostras foram lidas em leitor de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay – Enzimaimunoensaio) com filtro de 450nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$ de NO^-_2 por 3×10^6 células após 24h de incubação, comparando-se a D.O. (Densidade Ótica) do experimento com a D.O. da curva padrão de NO^-_2 feita junto com o experimento e que variou de 3,125 a 200,0 $\mu\text{mol/L}$ (Green *et al.*, 1981).

3.7. Extração do RNA total dos macrófagos

Após cada tempo de infecção, os fungos não aderidos foram removidos por três lavagens com RPMI pré-aquecido a 37°C. Os sobrenadantes das garrafas de cultura de células de 25cm² foram transferidos para tubos falcons de 15mL e guardados no freezer à -20°C para posterior dosagem do óxido nítrico. O RNA total dos macrófagos tratados e controles foram extraídos com 1mL do reagente Trizol (Invitrogen, USA) e os mesmos foram submetidas à agitação para promover um melhor rompimento das células. O meio contendo o lisado celular foi transferido para eppendorfs de 2mL. Para promover a completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos, as amostras homogeneizadas foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Seguiu-se com a adição de 200 μL de clorofórmio e agitação vigorosa dos tubos, os quais foram submetidos à centrifugação a 12000xg por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, a solução foi separada em uma fase inferior fenol-clorofórmio, vermelha, uma interfase, e uma fase aquosa superior. A fase aquosa contendo o RNA celular foi transferida para um novo eppendorf ao qual foi adicionado 500 μL de isopropanol para precipitação do RNA. Este foi incubado por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugado a 12000xg por 15 min a 4°C e descartado o sobrenadante. Em seguida foi adicionado 1mL de etanol a 75% e centrifugado a 7500xg por 5 min a 4°C e descartado o sobrenadante. O material precipitado

foi deixado à temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos para secar e o RNA foi ressuscitado em 20µL de água Milli-Q.

Os experimentos foram realizados em triplicata para cada tempo de infecção, o RNA dos macrófagos foi extraído em cada experimento individualmente e posteriormente reunidos para ser utilizado nos experimentos de RT-PCR em tempo real (qRT-PCR), constituindo um “pool” de RNA de 3 experimentos independentes.

3.8. Análise dos RNAs totais

A quantidade e qualidade dos RNAs extraídos foram avaliadas através da observação da razão das leituras espectrofotométricas nas densidades ópticas de 260 e 280 e a análise da integridade foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL). O RNA extraído foi armazenado a -20°C para posteriormente ser utilizado na análise do RT-PCR em tempo real (qRT-PCR).

3.9. RT-PCR em tempo real (qRT-PCR)

As amostras de RNAs foram previamente tratadas com DNase I na presença de um inibidor de RNase (Promega, cat# M6101; Lote# 262753) a fim de se eliminar qualquer traço residual de contaminação por DNA genômico, conforme protocolo.

Quantidades iguais de RNA (0,4µg) foram submetidas à transcrição reversa (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Applied Biosystems). Preparo do mix: 2µL (10x RT Buffer); 0,8µL (25X dNTP Mix (100mM)); 2,0µL (10X RT Random Primer); 1.0 µL (Reverse Transcriptase); 1.0 µL (RNase Inhibitor); 3.2 µL (Nuclease-free H₂O), para um volume total de 10µL. Diluiu-se o RNA tratado com DNase com H₂O RNase-free para a quantidade de 0,4µg do RNA tratado, para um volume de 10µl. Em eppendorfs pipetou-se 10µL do RNA tratado diluído + 10µL do Mix, totalizando um volume final de 20µL para a reação de síntese de cDNA.

A RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) foi realizada empregando o equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System da (Applied Biosystem). As amplificações das sequências de cDNA foram realizadas utilizando o Kit PCR Master Mix (Applied Biosystem) contendo o agente intercalante SYBR Green, uma molécula fluorescente que se intercala à dupla fita de DNA. Em cada tubo de PC foram adicionados 2µL de cDNA, 0,4 µM de cada primer, 5µL do SYBR Green PCR 2 x Master mix e 2,6 µL de H₂O para um volume final de 10µL. Após a desnaturação inicial a 95°C por 10 min, as amplificações foram realizadas com 40 ciclos

constituindo das seguintes etapas: 95°C por 15 segundos, seguidos por 60°C por 1 minuto. A utilização do SYBR Green demanda cuidadosa padronização, pois este fluoróforo se intercala a qualquer dupla fita de DNA presente na reação. Dessa maneira, a quantificação do produto de PCR específico pode ser afetada pela formação de dímeros de oligonucleotídeos ou pela formação de produtos de PCR inespecíficos. A fim de confirmar a especificidade da amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à análise da curva de desnaturação ou *melting curve*. Nesta curva analisa-se a fluorescência das amostras em relação ao aumento contínuo da temperatura, o que possibilita determinar a temperatura de dissociação ou *melting temperature* (T_m) de cada fragmento de DNA presente na reação de amplificação. Cada fragmento de DNA amplificado possui um T_m específico, o que permite a diferenciação entre os produtos resultantes (específicos ou não).

O método de comparação do ciclo limiar (CT) ou *crossing threshold* (Livak *et al.*, 2001), utilizando o gene constitutivo de macrófago ribossomal Rps9 para normalização, foi empregado para a avaliação da variação de expressão (*fold-change*) de cada gene de interesse do macrófago tratado pelo fungo ou seus componentes de parede em comparação com o controle. O CT é o número de ciclos no qual a quantidade de alvo amplificado atinge o limiar de fluorescência emitida ou *threshold* definido pelo pesquisador. O limiar deve estar obrigatoriamente na faixa onde a quantidade de fluorescência gerada pela amplificação das amostras é significativamente maior que a fluorescência de base ou *background*.

O método de comparação do CT tem como base de cálculo a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ onde $\Delta\Delta CT = (\Delta CT \text{ experimento} - \Delta CT \text{ controle})$, sendo que $\Delta CT \text{ experimento} = CT \text{ do gene de interesse no experimento} - CT \text{ do gene constitutivo no experimento}$ e $\Delta CT \text{ controle} = CT \text{ gene de interesse no controle} - CT \text{ gene constitutivo no controle}$. A equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ é baseada na amplificação exponencial da PCR e sua derivação e validação foram anteriormente descritas (Boletim do usuário Applied Biosystems N.º.2 P/N 4303859 e Livak *et al.*, 2001). Para a análise da expressão gênica foi considerado modulado positivamente valores iguais ou acima de 2,0 e modulados negativamente valores iguais ou abaixo de 0,5 e entre esses valores, considerou-se que não houve alteração.

As reações foram feitas em triplicata, para todos os genes analisados. Todos os pares de oligonucleotídeos foram desenhados baseando-se nas seqüências obtidas da base de dados do transcriptoma de camundongo (<http://www.informatics.jax.org>) utilizando o primer Express software (Applied Biosystems) e estão listados na **tabela 1**.

Tabela 1. Sequência dos oligos desenhados para a PCR em tempo real.

Genes	Oligos
RPS	5' rps9 CGCCAGAAGCTGGGTTTGT 3' 5' rps9 CGAGACGCGACTTCTCGAA 3'
ITGA 5	5' itga5 CCGAGTGCCTGAAGTTTGATA 3' 5' itga5 GGGCTTTTTCTTCAAAGGGATA 3'
MyD88	5' myd88 ACTGGCCTGAGCAACTAGGA 3' 3' myd88 CGTGCCACTACCTGTAGCAA 3'
Toll2	5' toll2 AAGAGGAAGCCCAAGAAAGC 3' 5' toll2 CGATGGAATCGATGATGTTG 3'
Toll4	5' toll4 GAACAAAACCTCTGGGGCCTAA 3' 5' toll4 CATGGGCTCTCGGTCCATAG 3'
CD14	5' cd14 CGCAGCCTGGAATACCTTCTA 3' 5' cd14 CCGCTTTAAGGACAGAGACTT 3'
Tnf- α	5' tnf GTACCTTDTCTACTCCCAGGTTCTCT 3' 5' tnf AGGGTTTCGGTTCCTAGTTTCC 3'
Clec2	5' clec2 CTCTTCTTGGTGGCGTGTGA 3' 5' clec2 AACAACCAGCCCCATGGA 3'
Nfkb	5' nfkb AGCCAGCTTCCGTGTTTGTT 3' 5' nfkb AGGGTTTCGGTTCCTAGTTTCC 3'
Stat6	5' stat6 GCCCCTGGTTCTGTAAAGGATT 3' 5' stat6 TCCTCAAAGGGTGTGCCATT 3'
Cxcl4	5' cxcl4 AGCGCTGGTCCCGAAGA 3' 5' cxcl4 ATGGATCCCAGAGGAGATGGT 3'
Nfkr	5' nfkr ACCTTTCAACCTACGATGGTCAGA 3' 5' nfkr GAGCTCTCACATGGAATTTGGAA 3'

3.9.1. Análise Estatística

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 4.0 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA). As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram determinadas através da Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo método pós-teste (Bonferroni, ou Student t Test). Foram consideradas diferenças estatisticamente significante quando $p < 0,05$.

IV- RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Cinética da taxa de fagocitose de *P. brasiliensis* durante a interação com macrófagos

Com o objetivo de verificar a presença de leveduras aderidas e/ou internalizadas de *P. brasiliensis* pelos macrófagos alveolares foi realizado ensaio de fagocitose durante o co-cultivo nos tempos de 6, 24 e 48 horas e também se fez a análise do tempo de 6h por microscopia ótica (figura 2). Observou-se que conforme aumenta o tempo de interação do fungo com o macrófago há uma diminuição da quantidade de leveduras aderidas e/ou internalizadas.

A capacidade fagocitária foi expressa pelo percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose, pelo número médio de leveduras fagocitadas e pelo índice fagocitário, produto destas duas determinações conforme demonstrado na tabela 2.

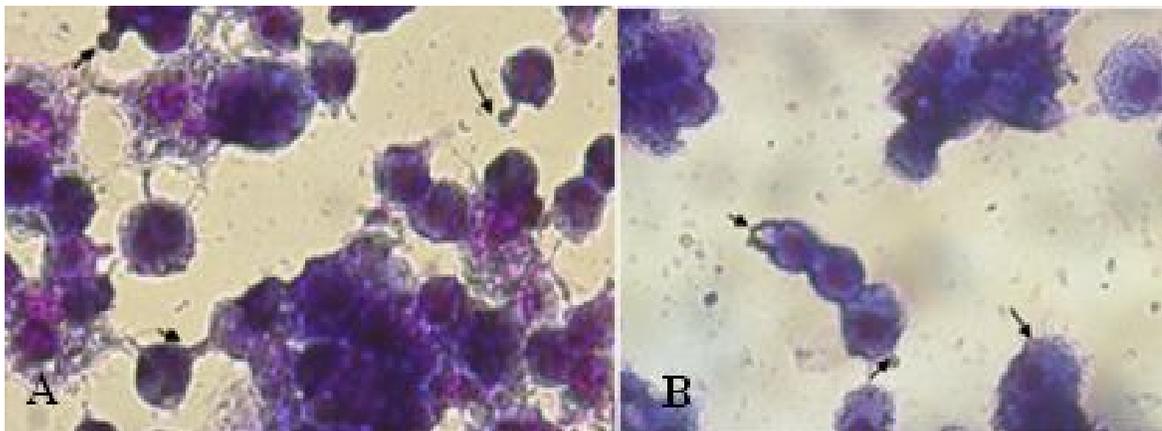


Figura 2. Microfotografia (1000x) representativa da interação entre leveduras de Pb01 e macrófagos no tempo de 6 (A) e (B) horas de co-cultivo. Setas indicam leveduras aderidas/internalizadas. As células foram incubadas obedecendo à razão de macrófago/levedura de 5:1 a 37 °C em atmosfera de 5% CO₂.

Tabela 2- Capacidade fagocitária dos macrófagos alveolares nos tempos de 6, 24 e 48 horas de interação com *P. brasiliensis*.

Grupo	Macrófagos Alveolares- MHS		
<i>Estímulos</i>	<i>Fagócitos envolvidos na fagocitose(%)</i>	<i>N ° leveduras fagocitadas por fagócito</i>	<i>Índice de fagocitose</i>
Pb01 6h	68 (±4,00)	10 (±3,87)	680 (± 16,1)
Pb01 24h	58 (±4,58)	7 (±1,58)	406 (±17,23)
Pb01 48h	38 (±5,57)	7 (±2,00)	266 (±19,16)

4.2. Produção de Óxido Nítrico (NO) em sobrenadante de cultura dos macrófagos alveolares após 6, 24 e 48 horas de interação com o *P. brasiliensis* e seus componentes de parede.

O óxido nítrico (NO) decompõe-se espontaneamente em nitritos (NO^-_2) e nitratos (NO^-_3). O NO pode ser produzido através da ativação dos fagócitos por IFN- γ e LPS a partir da indução da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) e é determinado através da presença de nitrito no sobrenadante de cultura de neutrófilos e macrófagos.

Os níveis de NO encontrados para os macrófagos tratados durante a cinética está representado na figura 3. Após a interação por 6 horas com a F2 foi observada uma concentração de NO (14,07 μM). No tempo de 24 horas após interação com *P. brasiliensis* e seus componentes de parede os macrófagos tratados com a F1 teve uma produção maior que os demais grupos, sendo observada uma concentração de NO de 20,19 μM . Por outro lado os macrófagos tratados com Pb01 tiveram uma produção aumentada em relação ao tempo de infecção de 6 horas e os macrófagos tratados com a F2 teve uma pequena diminuição para uma concentração de 12,48 μM . No tempo de 48 horas após tratamento observou-se para todas as condições analisadas uma produção aumentada da concentração de óxido nítrico e os macrófagos tratados com a F1 manteve-se com a maior produção de NO com concentração de 39 μM , como observado no tempo de 24 horas.

Quando se analisa o grupo controle, nota-se que durante a cinética houve uma diminuição da produção de óxido nítrico, enquanto para os grupos tratados observou-se um aumento na produção de óxido nítrico.

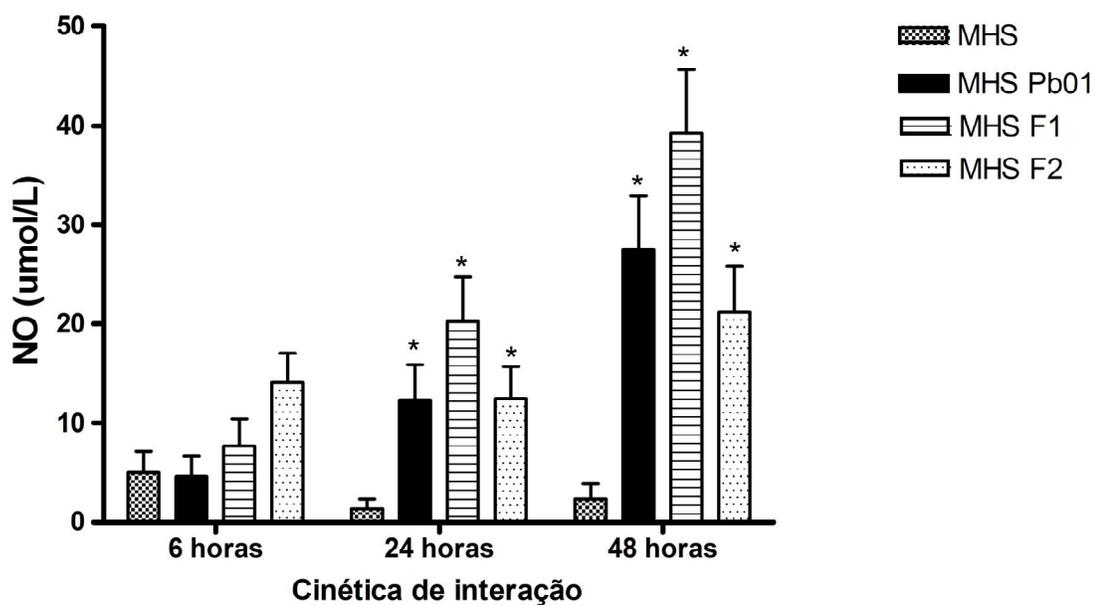


Figura 3. Níveis de Óxido Nítrico (NO) dos macrófagos não tratados e tratados com *P. brasiliensis* e seus componentes de parede. Frações F1, F2 após 6, 24 e 48 horas de co-cultivo.

As concentrações de NO foram mensuradas através da reação de Griess. Os ensaios foram realizados em duplicata para cada condição. Os dados foram expressos em média e desvio padrão (Média ± SEM). Resultados são representativos de dois experimentos independentes. *p<0,05 representa diferença estatística comparado com grupo sem tratamento.

4.3. Análise por eletroforese em gel de agarose do RNA total extraído dos macrófagos tratados ou não pelo fungo *P. brasiliensis* e suas frações.

A integridade dos RNAs dos macrófagos infectados ou não por *P. brasiliensis* e suas frações foram avaliados pela técnica de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo em condições livres de RNAses, sendo observado um perfil eletroforético compatível ao de uma preparação de RNAs intactos (figura 4A).

Após tratamento com DNaseI livre de RNase para eliminar possível contaminação com DNA genômico, o RNA total foi precipitado com etanol, e novamente quantificado e analisado por eletroforese em gel de agarose 1% mostrando-se intacto (Figura 4B).

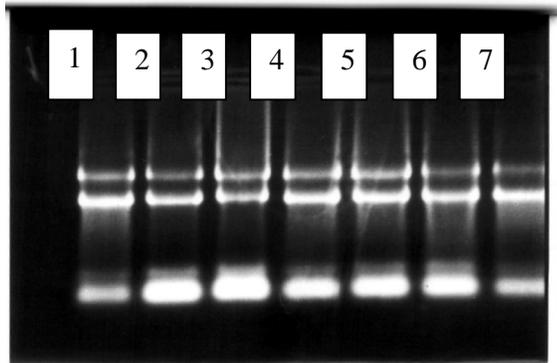


Figura 4A. Perfil eletroforético do RNA total extraído dos macrófagos.

Uma alíquota correspondente a aproximadamente 2µg de RNA total foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, em condições livres de RNase. Poços 1 e 2: RNA dos macrófagos não tratados após 6, 24 e 48 horas de cultura. Poços 3, 4 e 5: RNA dos macrófagos tratados com *P. brasiliensis* por 6, 24 e 48 horas. Poços 5 e 6 RNA dos macrófagos tratados com F1, F2 após 6 horas, respectivamente.

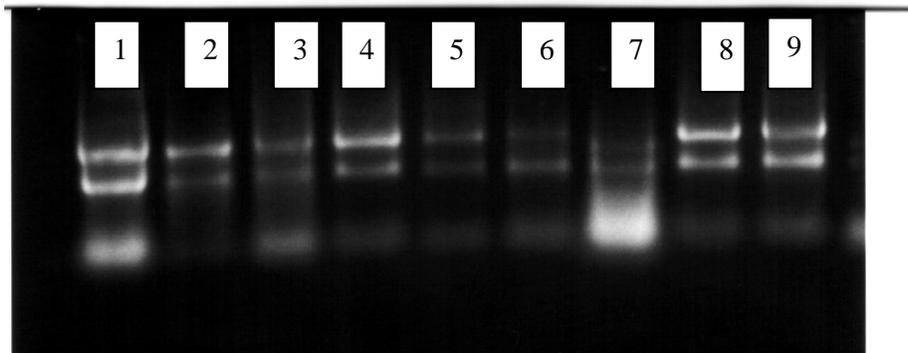


Figura 4B. Perfil eletroforético do RNA total dos macrófagos não tratados e tratados com *P. brasiliensis* e suas frações após tratamento com DNase livre de RNases.

Uma alíquota correspondente a aproximadamente a 4µg de RNA total tratado com DNase I foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, em condições livres de RNase. Poços 1, 2 e 3: RNA total dos macrófagos não tratados após 6, 24 e 48 horas de cultura, respectivamente. Poços 4 e 5: RNA total dos macrófagos tratados com *P. brasiliensis* após 6 e 24 horas. Poços 6 e 7: RNA total dos macrófagos tratados com F1 após 6 e 24 horas. Poços 8 e 9: RNA total dos macrófagos tratados com F2 após 6 e 24 horas.

4.4. Análise da expressão gênica dos macrófagos alveolares após tratamento com *P. brasiliensis* e seus componentes de parede, quantificados por PCR em tempo real.

A figura 5 mostra a curva de amplificação do experimento de qRT-PCR em tempo real representativo para o gene Rps9, constitutivo de macrófago, após interação de 24 horas com *P. brasiliensis*. Os valores de CT obtidos pela análise das curvas de amplificação foram utilizados na avaliação da variação de expressão (*fold-change*) de cada gene de interesse por meio do método de comparação do CT, utilizando o gene constitutivo Rps9 de macrófago para normalização, conforme descrito na metodologia.

A alta especificidade dessa reação pode ser avaliada pelos picos de desnaturação (gerada a partir da derivada da intensidade de fluorescência da curva de desnaturação) representada na figura 6, onde se encontra um único pico de *TM*, denotando um único produto.

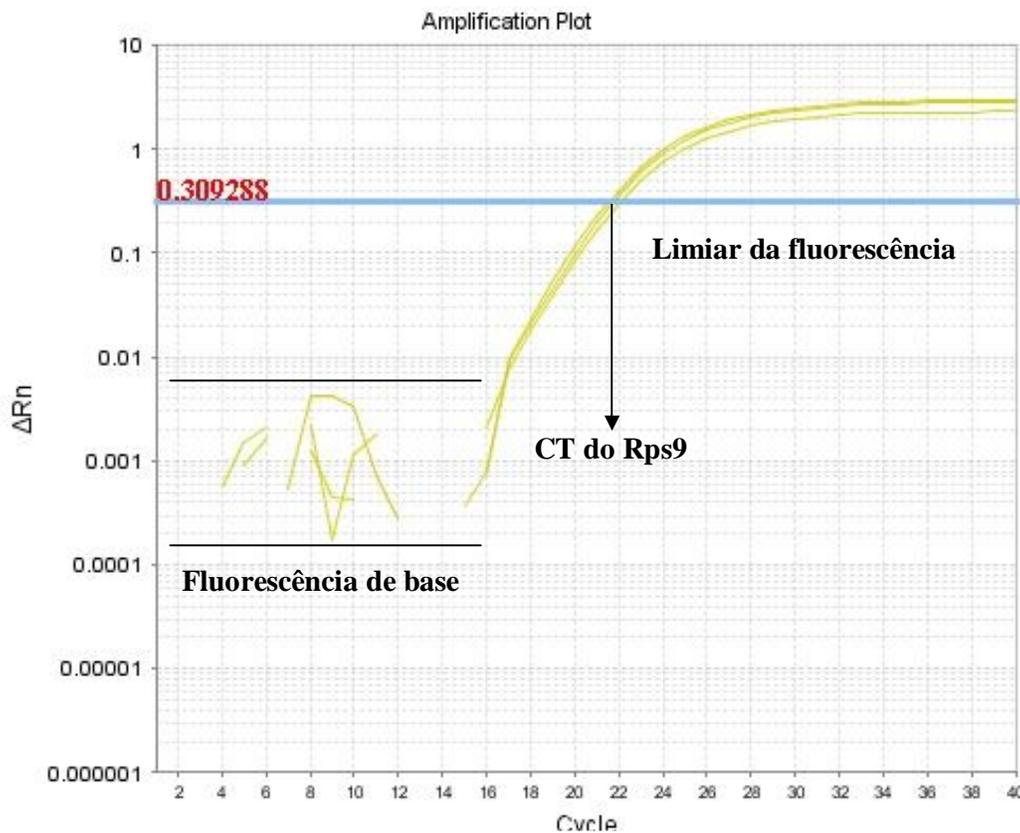


Figura 5. Curva de amplificação do experimento de qRT-PCR em tempo real representativo para o gene Rps9, constitutivo de macrófago, após interação de 24 horas com *P. brasiliensis*.

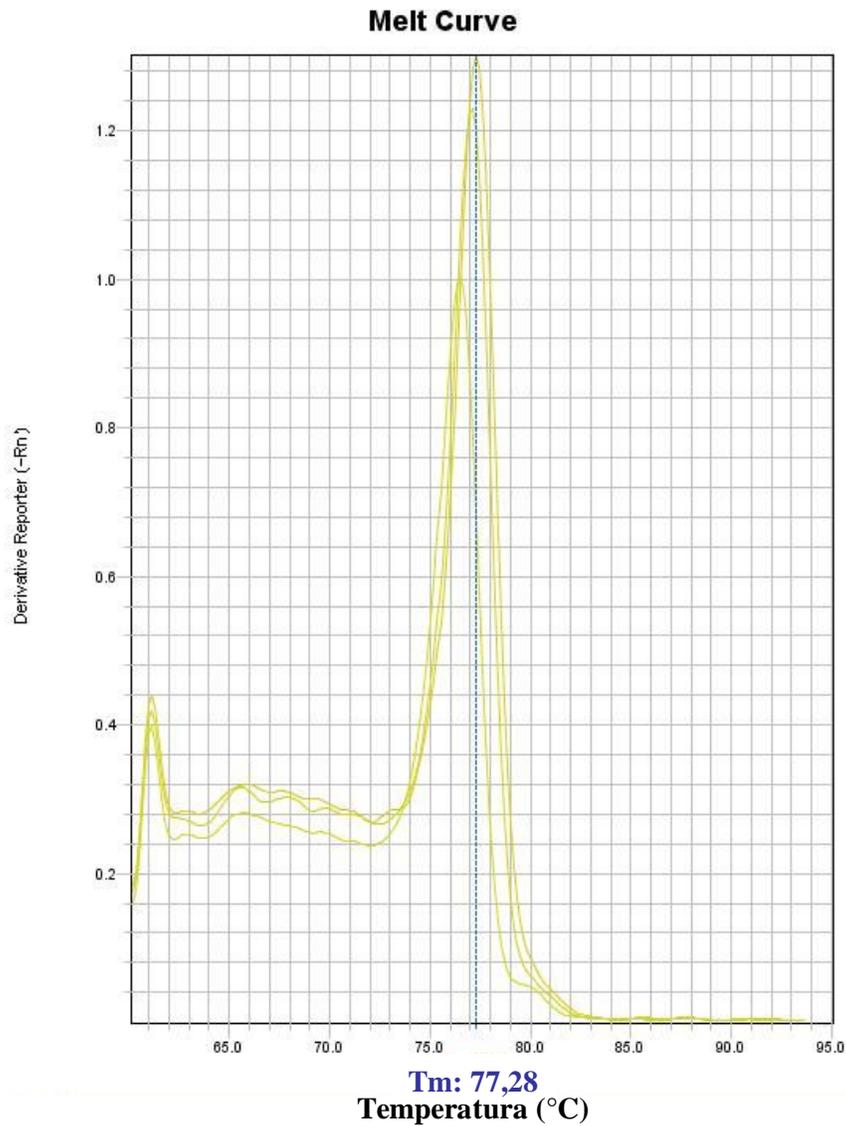


Figura 6. Picos de desnaturação do Rps9. Após o término da reação, uma etapa de dissociação é realizada para visualizar a cinética de dissociação dos produtos amplificados. Aumenta-se a temperatura de forma linear e a fluorescência de cada amostra é representada graficamente. O eixo da ordenada mostra a derivada da intensidade da fluorescência e o da abscissa, a temperatura.

No Tempo 6h após infecção dos macrófagos com Pb01 e a fração F1, os genes CD14, TNF- α e Cxcl4 (genes pró-inflamatórios) apresentaram modulação positiva. Os demais genes analisados foram reprimidos ou não apresentaram alteração como mostrado na tabela 3.

Tabela 3. RT - PCR em tempo real
FOLD - Valor da indução/repressão gênica
determinado após a normalização de cada gene pelo
Rps9.

GENES	^a PB 01	^a Fração F1	^a Fração F2
	6 h	6 h	6 h
Itga5	0,08±0,32	0,17±0,11	0,000058±0,41
MyD88	0,26±0,45	0,60±0,1	0,000037±1,79
Toll2	0,09±0,30	0,09±0,09	0,000053±0,55
Toll4	0,05±0,29	0,08±0,1	0,012±0,42
CD14	6,20±0,46	5,75±0,08	0,0010±0,28
TNF- α	2 ±0,30	6,88±0,09	0,15±0,08
Clec2	1,50±0,32	0,12±0,08	0,09±0,87
Nfkb	0,55±0,30	0,27±0,11	0,0060±0,09
Stat6	0,05±0,28	0,0033±0,092	0,0006±0,48
Cxcl4	51,16±0,28	12,20±0,14	0,25±0,82
Nfkr	0,05±0,30	0,03±0,09	0,005±0,29

^aMédia \pm erro padrão de resultados de dois experimentos de RT-PCR em tempo real feitos em triplicata em 6 horas, após tratamento com Pb01, F1 e F2. Os valores em vermelho representam os genes reprimidos (gene \leq 0,5). Valores em azul representam os genes modulados positivamente (gene \geq 2,0). Valores em verde representam genes que não apresentaram alteração (2,0 < gene < 0,5).

No tempo de interação do macrófago com o Pb01, após 24 horas, observou-se uma modulação positiva dos genes relacionados à migração celular de macrófagos como Itga5, genes envolvidos no processo de inflamação e proteínas de membrana (CD14, TNF- α , Clec2 e Cxcl4), genes relacionados à regulação transcricional (Nfkr) e transdução de sinal (Stat6), receptor Toll4 e a molécula adaptadora MyD88. Dados mostrados na tabela 4.

Na interação do macrófago com a fração F2 os genes modulados positivamente foi o gene pro-inflamatórios (Cxcl4), gene relacionado à inflamação e associado à membrana Clec2 e o gene Nfkr (envolvido na regulação transcricional). Na interação dos macrófagos com a fração F1, os genes foram modulados negativamente ou não apresentaram alteração, como apresentado na tabela 4.

Tabela 4. RT - PCR em tempo real
FOLD - Valor da indução/repressão gênica
determinado após a normalização de cada gene pelo
Rps9.

GENES	^a PB 01	^a Fração F1	^a Fração F2
	24h	24h	24h
Itga5	2,11±0,18	0,72±0,1	0,010±0,47
MyD88	1,94±0,32	1,19±0,14	0,006±1,44
Toll2	0,32±0,40	0,79±0,09	0,14±0,88
Toll4	23,91±0,34	0,93±0,14	0,33±0,45
CD14	25,83±0,18	0,93±0,10	0,04±0,38
TNF- α	9,53±0,39	0,98±0,10	1,03±0,50
Clec2	18,80±0,07	0,26±0,10	2,80±0,50
Nfkb	0,8±0,35	0,38±0,03	0,76±0,46
Stat6	4,30±0,11	0,03±0,15	0,018±0,52
Cxcl4	1,14±0,18	1,09±0,14	3,56±0,47
Nfkr	66,10±0,14	0,47±0,12	5,33±0,36

^aMédia \pm erro padrão de resultados de dois experimentos de RT-PCR em tempo real feitos em triplicata em 24 horas, após tratamento com Pb01, F1 e F2. Os valores em vermelho representam os genes reprimidos (gene \leq 0,5). Valores em azul representam os genes modulados positivamente (gene \geq 2,0). Valores em verde representam genes que não apresentaram alteração ($2,0 <$ gene $<$ 0,5).

Após 48 horas de interação dos macrófagos com Pb01, F1 e F2, com exceção do gene Toll2 na F2, todos os genes analisados apresentaram modulação negativa. Dados mostrados na tabela 5.

**Tabela 5. RT - PCR em tempo real
FOLD - Valor da indução/repressão gênica
determinado após a normalização de cada gene pelo
Rps9.**

GENES	PB 01 48h	Fração F1 48h	Fração F2 48h
Itga5	0,41±0,20	0,024±0,45	0,054±0,28
MyD88	0,01±0,17	0,000066±0,29	0,005±0,37
Toll2	0,47±0,18	0,21±0,23	6,24±0,30
Toll4	0,0025±0,19	0,00020±0,68	0,0016±0,30
CD14	0,48±0,18	0,021±0,23	0,17±0,25
TNF- α	0,36±0,17	0,017±0,24	0,018±0,34
Clec2	0,29±0,19	0,0031±0,38	0,015±0,06
Nfkb	0,06±0,19	0,0050±0,62	0,025±0,45
Stat6	0,25±0,20	0,0016±0,26	0,0044±0,33
Cxcl4	0,26±0,076	0,021±0,29	0,12±0,23
Nfkr	0,01±0,20	0,0016±0,47	0,017±0,56

^aMédia \pm erro padrão de resultados de dois experimentos de RT-PCR em tempo real feitos em triplicata em 48 horas, após tratamento com Pb01, F1 e F2. Os valores em vermelho representam os genes reprimidos (gene \leq 0,5). Valores em azul representam os genes modulados positivamente (gene \geq 2,0).

V- DISCUSSÃO

5) Discussão

A ativação do macrófago é essencial para o início da resposta imune inata; uma vez ativado, haverá produção de vários compostos que podem eliminar o parasita. Esta ativação também leva à produção de citocinas que modulam a resposta imune inata, recrutando outras células, ativando-as, assim como, regula a resposta imune adaptativa. Alguns estudos recentes realizados com modelos *in vitro* sustentam o conceito de que para a ativação de macrófagos e conseqüente produção de compostos microbicidas, dentre eles o óxido nítrico (NO), são necessários dois diferentes sinais (Green, *et al.*, 1990; Amber, *et al.*, 1991). Estes sinais incluem o IFN- γ , o TNF- α e o LPS. Estudos posteriores sugerem que outros compostos biológicos ancorados à membrana celular dos organismos patogênicos podem funcionar como um dos dois sinais necessários para a ativação dos macrófagos.

Visando, entender esta relação o presente trabalho avaliou a cinética de interação do patógeno *P. brasiliensis* ou seus componentes de parede com os macrófagos alveolares da linhagem-MHS, através da análise de genes chaves envolvidos na resposta inflamatória pelo método do RT-PCR em tempo real (qRT-PCR).

O processo de transição da forma filamentosa para a de levedura resulta em uma série de alterações celulares, entre as quais a da estrutura da parede é mais conhecida. A parede celular do fungo *P. brasiliensis* é composta predominantemente de polissacarídeos do tipo quitinas e glicanas, que ocupam aproximadamente 80% do seu peso seco.

Os componentes das paredes celulares de *P. brasiliensis* foram fracionados de acordo com a sua solubilidade em álcali. Três frações foram caracterizadas: Fração F1 álcali insolúvel, contendo β -glicana; Fração F2 álcali solúvel e ácido insolúvel, constituída de α -glicanas; Fração F3 álcali solúvel e precipitável com ácido, contendo galactomananas (San-Blas e San-Blas., 1977).

A virulência do *P. brasiliensis* tem sido associada à α -glicanas contida na parede da célula leveduriforme do fungo (Moraes e Schaffer., 2002).

A parede celular de fungos apresenta tanto função de proteção como de agressão. Em sua ação de proteção atua como uma barreira inicial que está em contato com o ambiente hostil encontrado pelos fungos. Se removida ou comprometida, o fungo não sobrevive, a menos que esteja osmoticamente protegido. A ação agressiva deve-se ao fato de que a parede celular pode apresentar moléculas hidrolíticas e tóxicas, que podem ser requeridas para a invasão em

determinados ambientes. Além disso, sua estrutura rígida é proveitosa para a penetração em substratos que são colonizados ou invadidos (Latgé., 2007).

Dados previamente descritos na literatura demonstram que a fração F1 isolada do fungo *P. brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*, cujo principal componente é a β -1,3-glicana, é um importante imunomodulador, promovendo o recrutamento de células inflamatórias e estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias incluindo o Tnf- α . (Rappleye & Goldman, 2006). Outro componente importante na interação entre o hospedeiro e o fungo é a fração F2, constituída pela α -1,3-glicana que está comumente relacionada à virulência. A mudança na composição da parede celular durante a infecção, como ocorre em *P. brasiliensis*, pode ser considerada como um mecanismo de escape da resposta imune inata. Dessa forma, a α -1,3-glicana localizada mais externamente na parede celular (Kanetsuma *et al*, 1972), deve atuar como um protetor de β -1,3-glicana contra os mecanismos de defesa do hospedeiro, uma vez que a β -1,3-glicana é capaz de induzir um aumento da liberação do Tnf- α com conseqüente morte do fungo (Anjos *et al*, 2002).

Analisando a cinética de fagocitose *in vitro* de leveduras de *P. brasiliensis* em 6, 24 e 48 horas de interação com os macrófagos alveolares, nossos resultados demonstraram que conforme aumentou o tempo de interação dos macrófagos com o fungo, houve uma diminuição do índice de fagocitose, ou seja, aumentou a capacidade do macrófago de ingerir e/ou aderir ao fungo. Estudos demonstram que após a inalação, as primeiras células de defesa as quais conídeos de *P. brasiliensis* encontram são os macrófagos alveolares residentes e células dendríticas (DC) presentes no parênquima pulmonar. Esses conídeos ou são fagocitados e convertem-se para a forma de levedura ou essa transição ocorre primeiro seguido pela fagocitose dessas leveduras (Cano *et al.*, 1994; Gonzalez *et al.*, 2004).

Os macrófagos residentes estão em maior número em relação às DCs, o que os tornam mais provável de interagir inicialmente com o fungo após uma infecção primária. Apesar dos macrófagos possuírem a maquinaria requerida para a apresentação antigênica, sua maior contribuição para a defesa antifúngica é a fagocitose seguida da destruição desses organismos (Romani., 2004). O reconhecimento do *P. brasiliensis*, seja na sua forma de conídeo ou levedura, parece ser mediado por mecanismos dependentes e independentes de opsonização (Flávia-Popi *et al.*, 2002; Jimenez *et al.*, 2006). Após o reconhecimento, os microrganismos são engolfados pela membrana plasmática do macrófago e internalizados ocorrendo a formação do fagossomo ou vacúolo fagocítico, onde o fagossomo se transforma em fagolisossomo e apresenta características próprias. O contato entre as células leveduriformes

de *P. brasiliensis* e fagócitos é facilitado pela ativação da via alternativa do sistema complemento, que leva à opsonização das leveduras (shikanai-Yasuda *et al.*, 1997).

Outro componente importante na defesa contra *P. brasiliensis* é o óxido nítrico (NO), um radical livre, altamente reativo e extremamente lábil. Em nossos estudos verificamos que o *P. brasiliensis* e suas frações lipídicas foram capazes de desencadear a síntese de NO por macrófagos alveolares-MHS. No entanto, entre as condições de tratamento não houve diferença estatística, essa diferença é observada quando se compara com a condição sem tratamento nos tempos de 24 e 48 horas.

A produção de óxido nítrico (NO) realizada pela enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em macrófagos é considerada como principal mecanismo microbicida, já que os reativos intermediários de oxigênio, também produzidos por macrófagos ativados, não são capazes de destruir o fungo (Hibbs *et al.*, 1998). iNOS é expresso em resposta a citocinas pró-inflamatórias (Tipo 1) por meio de regulação transcricional principalmente por IFN- γ , TNF- α e IL-1 β e/ou produtos microbicidas como constituintes polissacarídeos da parede celular (Bogdan, 1997).

Em modelos experimentais murinos de PCM, a atividade fungicida de macrófagos contra *P. brasiliensis*, decorrente da ativação com IFN- γ foi atribuída à produção de óxido nítrico, induzida pela enzima iNO sintase. A indução dessa enzima depende do sinergismo de ação de citocinas de perfil Th1, como TNF- α e IFN- γ e, de produtos liberados pelo próprio agente patogênico (Bocca *et al.*, 1998). No decorrer da infecção experimental por *P. brasiliensis*, há intensa produção de TNF- α , IFN- γ e NO, que se correlaciona com a capacidade fungicida dos macrófagos (Nascimento *et al.*, 2002).

Estudos empregando modelos experimentais de células de macrófagos de mamíferos, demonstram que a atividade microbicida dos macrófagos relaciona-se com a produção de NO e seus metabólitos, chamados coletivamente de reativos intermediários de nitrogênio (RIN). Os RINs são gerados a partir da interação de NO com outras moléculas, como o íon superóxido (O_2^-), que resulta na produção de um composto altamente reativo, o peroxionitrito ($ONOO^-$) que, subsequentemente, decompõe-se em moléculas adicionais também altamente reativas. Os RINs causam uma variedade de alterações no DNA incluindo quebras de fitas e desaminação, enquanto que em proteínas causam modificações que envolvem nitrosilação de resíduos de cisteína e tirosina além de inativação de enzimas com núcleo ferro- enxofre (Kerwin *et al.*, 1995). Essas modificações podem afetar enzimas metabólicas vitais, proteínas de cadeia respiratória da mitocôndria e síntese de DNA, causando efeitos citostáticos e

citotóxicos *in vitro* e *in vitro*, contra uma grande variedade de microrganismos, incluindo *Shistosoma mansoni* (James *et al.*, 1989), amastigotas de *Leishmania major* (Liew *et al.*, 1990), *Cryptococcus neoformans* (Lee *et al.*, 1994), *Histoplasma capsulatum* (Lane *et al.*, 1994, entre outros. Gonzáles e colaboradores (2000) avaliaram a ação de NO produzidos por macrófagos peritonias murinos ativados por INF- γ em conídios de *P. brasiliensis* e relataram que NO inibem o processo de transição de conídio para levedura de maneira dose-dependente.

Os dados mostrados neste trabalho indicaram que os macrófagos que interagiram com o *P. brasiliensis* aumentaram a síntese de NO durante a cinética de interação (figura 5). Essa produção aumentada, pode indicar maior eficiência na destruição dos fungos, como mostrado no índice de fagocitose (Tabela 2). O aumento da síntese de NO pelas frações lipídicas pode indicar um potencial ativador da atividade fungicida dos macrófagos.

A inflamação caracteriza-se pela ativação seletiva de elementos celulares, que migram de forma massiva para o sítio da infecção. As células inflamatórias são dirigidas por meio de estímulos quimiotáticos que possibilitam seu direcionamento ao sítio de inflamação (Oppenheim *et al.*, 1991). Neste sentido, para que este processo seja realizado, as moléculas de citocinas e quimiocinas devem facilitar a adesão das células em circulação à superfície endotelial proporcionando a migração seletiva até o local da inflamação (Springer *et al.*, 1994). O desenvolvimento deste processo leva a interações célula a célula que são mediadas por moléculas de adesão, as quais são formadas por um grupo de receptores heterogêneos presentes na superfície da célula (Dunon *et al.*, 1996).

Ao lado das moléculas de adesão e das citocinas inflamatórias, as quimiocinas desempenham papel fundamental no desenvolvimento de uma resposta imunológica efetiva. Quimiocinas são citocinas cuja principal função é o recrutamento e ativação de leucócitos durante o processo inflamatório, podendo modular a ativação de linfócitos T (Charo e Ransohoff, 2006).

Os resultados presentes neste trabalho mostra que no tempo inicial de interação (6 horas) dos macrófagos com o Pb01 e a F1, houve aumento dos transcritos dos RNAm dos genes relacionados à inflamação e proteínas de membrana (Tnf- α , Cxcl4 e CD14). No tempo de 24 horas, verificou-se a modulação positiva dos macrófagos tratados com Pb01, F1 e F2 de genes envolvidos na inflamação e proteínas de membrana (Tnf- α , Cxcl4, Cd14, Clec2, Itga5), regulação transcricional (Nfkr), transdução de sinal (Stat6), receptor Toll4 e molécula adaptadora MyD88.

O gene Cxcl4 que apresentou modulação positiva nos tempos iniciais (6 e 24h), está associado à migração de células de defesa para o sítio da infecção, sendo importante no estabelecimento de uma resposta inflamatória eficiente.

O Tnf- α é um potente indutor da síntese de quimionas em um grande número de tipos celulares, incluindo neutrófilos, fibroblastos, células endoteliais e epiteliais (Hornung *et al.*, 2000). No presente trabalho verificou-se a indução deste gene nos tempos de 6 e 24 horas de infecção com *P. brasiliensis*, tempo de 6 horas com a fração F1. O TNF- α tem importante função na resposta inflamatória e atua juntamente com IFN- γ na ativação da resposta imune celular, principalmente no que diz respeito à ativação de macrófagos (Xing *et al.*, 2000). Alguns estudos têm demonstrado a participação do TNF- α na resposta ao *P. brasiliensis* (Figueiredo *et al.*, 1993, Neworal *et al.*, 2003, Silva e Figueiredo, 1991), associando-o à resistência à infecção. Macrófagos de camundongos suscetíveis estimulados com antígenos de *P. brasiliensis* produzem somente pequenas quantidades de TNF- α enquanto que as células de camundongos resistentes produzem grandes quantidades dessa citocina (Calich e Kashino, 1998). Outra evidência da importância dessa citocina na PCM é o fato de camundongos deficientes para o receptor do TNF- α serem mais suscetíveis à infecção, quando comparados aos camundongos selvagens (Souto *et al.*, 2000). Além disso, o TNF- α parece ser indispensável para a formação de granulomas, estruturas formadas por reação inflamatória tipicamente Th1, que representam uma tentativa do sistema imunológico em conter a infecção, impedindo a sua disseminação. Portanto, a ativação deste gene observado neste trabalho está proporcionando prevenção contra a infecção causada pelo fungo no sentido de induzir uma eficiente resposta pró-inflamatória para eliminação do patógeno do local da infecção.

No trabalho de Silva, S.S *et al.*, 2007, foi demonstrado que os genes que codificam para quimionas Ccl21, Ccl22, Cxcl4 e Cxcl1, todas as quais são associados com a resposta pró-inflamatória, tiveram sua expressão significativamente aumentadas em macrófagos peritoniais em resposta ao *P. brasiliensis*-Pb01, no estágio inicial da infecção. É importante mencionar que diferentes padrões de expressões de genes de citocinas como IL-6, IL-10, IL-8 e TNF- α também têm sido relatados pelas diferentes linhagens de *P. brasiliensis* como Pb18 e PB265. Cxcl1 e Ccl2 são quimioatraentes para neutrófilos e monócitos, respectivamente. A indução de genes que codificam outros neutrófilos (KC e CCL3) e monócitos (CCL5, CCL2, CXCL10 e CXCL9) atraentes foram relatados em experimento realizado com pulmão de camundongos

infectados com *P. brasiliensis*, esta observação foi correlacionada com um intenso recrutamento de fagócitos para o sítio da infecção (Souto *et al.*, 2003).

Outra importante classe de moléculas da inflamação é a relacionada a alterações da superfície celular que permitem uma fagocitose mais efetiva. Alterações na superfície de moléculas de adesão provavelmente induzem modificações na membrana celular que podem ser responsáveis por facilitar a internalização de patógenos pelos macrófagos (Tsuiji *et al.*, 2002).

Adesão e invasão das células do hospedeiro são passos essenciais que envolvem a infecção e a disseminação de patógenos e neste trabalho observou-se que genes que codificam proteínas de membrana envolvidas em adesão e fagocitose foram diferencialmente expressos por macrófagos sendo mais expressivo no tempo de 24h durante a interação com *P. brasiliensis* e a fração F2 tais como CD14 e Clec2. CD14 é uma glicoproteína glicosilfosfatidilinositol-ancorada expressa em leucócitos e é o maior receptor responsável pelos efeitos de LPS e vários produtos bacterianos, tais como, peptidoglicanos e lipoarabinomanana sobre macrófagos, monócitos e neutrófilos. Além disso, estudos prévios demonstram o envolvimento da proteína CD14 no reconhecimento de fungos pelos macrófagos. Weiss *et al.*, (2004) observaram a indução do gene CD14 em macrófagos durante a fagocitose de diferentes isolados de *M. avium* em 6 e 24 horas. Desta forma, pode-se postular que a indução deste gene resultaria em uma invasão mais efetiva e/ou ativação da célula hospedeira.

O gene Clec2, um receptor de superfície da IL-1 β , moléculas importantes no estabelecimento inicial de um processo inflamatório, foi modulado positivamente sendo que a expressão deste gene foi expressivamente aumentada no tempo de 24 horas de interação com *P. brasiliensis* e foi induzido também pela fração F2 no tempo de 24 horas de interação do macrófago com o fungo. A proteína de membrana CLEC, é capaz de reconhecer resíduos de manose presentes sobre a superfície de um amplo espectro de microrganismos, incluindo *P. brasiliensis* e *H. capsulatum* (Linehan *et al.*, 2000; Azuma *et al.*, 1974). Recentemente, evidências adicionais de sua importância para a fagocitose de *P. brasiliensis* foi obtida pelo tratamento de macrófagos com um análogo metil-manosídeo que reduz a frequência da fagocitose deste fungo (Jiménez *et al.*, 2006). Em experimentos realizados para verificar o perfil cinético de expressão de genes de macrófagos infectados pela *Brucella abortus* em um período de 4h foi possível observar a indução da expressão de C-type lectin, o que foi correlacionado com uma fagocitose mais efetiva (Eskra *et al.*, 2003). Dessa forma, os

resultados encontrados neste trabalho corroboram esses dados, visto que a indução de Clec2 é importante para *P. brasiliensis*, como este gene que codifica proteínas de membrana foi induzido pelo fungo e pelo seu componente de parede a fração F2 que representa um fator de virulência, provavelmente pode-se sugerir que a indução de Clec2 represente uma internalização mais efetiva do fungo. Dessa forma, pode-se postular que o aumento da expressão de moléculas relacionadas à adesão e/ou fagocitose, observado no presente trabalho, provavelmente é um mecanismo induzido pelo fungo para facilitar sua invasão às células hospedeiras.

Nos macrófagos, após a internalização do fungo, alguns genes codificadores de proteínas de membrana envolvidas na adesão e fagocitose foram também alterados pelo *P. brasiliensis*. Neste contexto foi observada uma significativa indução de CD14 e Clec1b. O Clec1b foi induzido em todos de infecção dos macrófagos com *P. brasiliensis-Pb01*, ao qual foi confirmado por RT-PCR em tempo real nos tempos de 6 e 48h (Silva, S.S *et al.*, 2007).

O gene *Itga5* (integrina alfa 5) está relacionado a uma proteína de membrana. O produto deste gene pertence à família das integrinas de cadeia α . As integrinas são proteínas heterodiméricas compostas por uma cadeia α e uma cadeia β . Este gene teve sua expressão ligeiramente induzida em macrófagos durante a interação com *P. brasiliensis*, somente no tempo de 24 horas. Nas demais condições de infecções analisadas este gene não foi ativado.

A proteína *Itga5* tem sido correlacionada com migração celular de macrófagos (Seftor *et al.*, 1992). Embora, a indução deste gene no presente trabalho foi pequena pode-se sugerir provavelmente que este é um mecanismo induzido pelo fungo para evadir outras células ou reflete uma resposta do hospedeiro na tentativa de eliminação do patógeno do sítio inicial da infecção.

A expressão de genes que codificam moléculas importantes no processo inflamatório é regulada por muitos fatores de transcrição. Um desses fatores que apresenta importante papel na regulação da resposta inflamatória é o *Nfkb*, um heterodímero constituído de duas subunidades p65 e p50 (Baeuerle & Baltimore., 1996; Siebenlist, 1997). Este fator de transcrição é conservado na evolução e possui ação restrita em diversas células que compõe os organismos complexos apresentando uma gama de ação superior a todos os fatores de transcrição até então caracterizados. Essa superioridade deve-se aos vários estímulos que o ativam, bem como aos inúmeros genes e fenômenos que o *Nfkb* regula. Entre esses estímulos estão citocinas (IL-1, TNF- α , IL-8 e IL-6), produtos provenientes de vírus e bactérias,

produtos de reações de enzimas como a óxido nítrico sintase induzível e a cicloxigenase tipo2, neurotransmissores, neurotrofinas, glicocorticóides, ésteres de forbol, ceramidas e irradiação ultravioleta (O'Neill & Kaltschmidt., 1997). Independente do estímulo parece haver participação de espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo) e o aumento de cálcio intracelular para a ativação do Nfkb. Durante a cinética de infecção de monócitos humanos infectados por *E. chaffeensis*, foi observado um aumento da expressão de Nfkb em todos os tempos analisados (1, 7, 11 e 24 horas). O aumento da expressão desta molécula, neste caso foi correlacionado com a inibição de apoptose, o que seria favorável para a manutenção do parasita no interior do fagócito no estágio inicial da infecção (Zhang *et al.*, 2004).

Quando não estimulado o fator Nfkb encontra-se no citoplasma ligado ao Nfkr (proteína inibitória de Nfkb). Esse complexo impede a translocação do Nfkb para o núcleo. Dessa forma, a fosforilação e a degradação do Nfkr são necessárias para que ocorra a translocação (Baeuerle & Baltimore., 1996; Baldwin., 1996). Vários estímulos levam a fosforilação deste repressor. Uma vez fosforilado ele recebe a adição de ubiquitina, por meio da ubiquitina ligase sendo em seguida degradado pelo complexo proteasoma 26 S, o que resulta na liberação e translocação do Nfkb para o núcleo. Dessa forma, a modulação da expressão de genes importantes na resposta imune, induzidos pelo patógeno e/ou pelo hospedeiro é impedida. Neste caso, se o aumento da expressão de Nfkb estiver sendo induzido pelo patógeno para inibir apoptose, a indução da expressão de Nfkr poderá favorecer a célula hospedeira a entrar em apoptose. No trabalho de Silva, S.S *et al.*, 2007, ocorreu modulação do gene Nfkb, após 24h de interação dos macrófagos com *P. brasiliensis*- 01 que provavelmente funcionará como fator de transcrição que irá orquestrar a modulação geral de genes para induzir a resposta pró-inflamatória. No entanto foi observado neste trabalho que em nenhum dos tempos de infecção houve expressão do Nfkb, mas pelo contrário foi verificado uma repressão deste gene. Somente o seu inibidor Nfkr foi ativado no tempo de 24 horas de infecção do macrófago com *P. brasiliensis* e a fração F2, sugerindo neste caso, que a modulação negativa do gene Nfkb esteja indicando uma ativação da apoptose, o que provavelmente tornaria mais eficaz a eliminação do fungo neste estágio inicial da infecção. Sendo o Nfkb uma molécula chave na indução de genes que codificam para várias citocinas envolvidas na indução de migração e ativação celular, a sua repressão pode indicar inibição deste processo.

Proteínas STAT são fatores de transcrição críticos em mediar a sinalização dirigida por citocinas (Darnell Jr., 1994). Neste estudo o gene Stat6 teve sua expressão induzida somente

em 24 horas de infecção com o *P. brasiliensis*. Nas outras condições de infecção não houve modulação do gene Stat6. A proteína STAT6 atua tanto na transdução de sinal quanto na ativação da transcrição e está envolvida na sinalização de interleucina 4 (IL-4).

A diferenciação de linfócitos TH é regulada, em particular, pela STAT 4 e STAT 6. A STAT 6 é um dos sete membros da família de fatores de transcrição Janus Kinase STAT (*signal transducers and activators of transcription*) que é ativado pela IL-4. Estudos comparando linfócitos precursores (*naives*) com linfócitos deficientes em STAT 4, deficientes em STAT 6 e linfócitos deficientes em ambos (STAT 4 e STAT 6) apóiam um modelo de diferenciação de células TH na qual a geração de células TH2 requer STAT 6, enquanto que uma via STAT 4 existe para desenvolvimento de células TH1 (Schaefer *et al.*, 2001). Ratos STAT 6 knockout não apresentam resposta a IL-4, não desenvolvem células TH2 em resposta a IL-4, não produzem IgE ou hiper-responsividade brônquica. A STAT 6 é importante na sinalização IL-4 e na diferenciação celular TH2. Por outro lado, a IL-4 também parece sinalizar por IRS-2 (*insulin receptor-substrate-2*) assim como STAT 6. Estudos em ratos deficientes em IRS-2 e STAT 6, demonstram que ambos (STAT 6 e IRS-2) são importantes na proliferação celular de células T pela IL-4 e na diferenciação de células TH2 (Tomkinson *et al.*, 1999).

Estudo realizado por Shinji Oki *et al.*, 2000, demonstrou que o recrutamento de Stat6 por CD28 e a subsequente ativação de STAT6 pode representar uma importante função na diferenciação de células T naive, produzindo IL-4.

Dessa forma, embora, este gene apareça induzido no tempo de 24h de interação do macrófago com o *P. brasiliensis*, pode-se sugerir que a expressão diferencial de Stat6 não tenha sido observada no tempo inicial de 6h, porque, sua regulação provavelmente pode ocorrer pós-transcricional, então, os RNAs já estariam prontos sem haver necessidade de aumentar o número de transcritos e por isso não tenha sido observado a indução de expressão dos mesmos. Outro ponto a ser considerado, a regulação negativa deste gene observado nas condições de tratamento com Pb01 48h, fração F1 e F2 em todos os tempos analisados, pode ser bom pelo fato que este fator de transcrição estar envolvido na diferenciação dos linfócitos para uma linhagem do tipo Th2, no qual causa susceptibilidade à infecção por *P. brasiliensis*.

Netea *et al.*, (2002), foram os primeiros a descrever o uso dos TLRs pelo fungo patógeno *Cândida. albicans*. Após o reconhecimento de estruturas microbianas pelos TLRs, estes receptores sofrem mudanças conformacionais, permitindo o recrutamento de moléculas adaptadoras como MyD88, TIRAP (TIR-domínio contendo o adaptador de molécula),

também conhecida com MAL (MyD88- adaptador like), TRAM (TRIF- adaptador de molécula relacionada (O'Neill *et al.*, 2007).

No presente estudo verificou-se que o gene Toll4 foi ativado no tempo de 24 horas após infecção do macrófago com *P. brasiliensis*, e o gene Toll2 foi induzido no tempo de 48h de interação do macrófago com a fração F2. O TLR2 conduz uma sinalização prevalente para produção de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF) e IL-1 β , embora a IL-10 é ocasionalmente produzida (Mambula *et al.*, 2002). A sinalização através do TLR2 pelo zimosan ocorre junto com β -glicana, receptor da dectina 1, ao qual indica um reconhecimento colaborativo de componentes distintos dos microrganismos pelas diferentes classes de receptores da resposta imune inata (Gantner *et al.*, 2003).

Viriyakosol *et al.* (2004) relataram que a ativação de macrófagos peritoneais por *Coccidioides posadasii* é dependente do TLR-2 e independente do TLR-4. Ao desafiar macrófagos de camundongos TLR-2 KO com o fungo, observaram níveis menores de TNF- α e MIP-2 em comparação àqueles produzidos por macrófagos de animais que apresentam o receptor funcional. Contudo, o mesmo desafio não resultou em diferenças na produção destas citocinas quando macrófagos de animais TLR-4 KO foram comparados a macrófagos de animais que apresentam o TLR-4 funcional.

Trabalhando com hifas e leveduras de *Cândida. albicans* Gozalbo *et al.*, 2006 demonstraram que TLR-4 e TLR-2 participam da defesa do hospedeiro frente a este fungo. Ambas as formas dos fungos foram capazes de ativar os receptores que são responsáveis pela ativação de macrófagos e produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α . Esta interpretação contrasta com os achados *in vivo* de Bellocchio *et al.* (2004), que demonstraram que a presença de TLR-4 leva a candidíase mais grave.

Gonzalez *et al.*, 2008, mostraram que a resposta ao *P. brasiliensis* independe de TLR4, TLR2, Dectina 1 e MyD88. O papel de receptores Toll-like em micose sistêmicas, porém, é controverso (Calich *et al.*, 2007). Embora (Netea *et al.*, 2002) relatem que a não expressão de TLR4 aumenta a suscetibilidade à candidíase disseminada, por exemplo, os experimentos conduzidos por Murciano *et al.*, (2006) mostram o estabelecimento de respostas Th1, relacionadas ao perfil de resistência, em camundongos TLR4-deficientes infectados por *Cândida*. Na criptococose, relata-se que as moléculas MyD88 e TLR2, mas não TLR4, são necessárias à indução da proteção (Yauch *et al.*, 2004 e Biondo *et al.*, 2005); uma publicação mais recente, sugere que TLR2 e TLR4 não contribuem, ou atuam de forma apenas marginal no desenvolvimento da resposta imunológica ao patógeno (Nakamura *et al.*, 2006).

Desta forma, embora os resultados aqui apresentados, bem como os obtidos por Gonzalez *et al.*, (2008), indiquem a ausência de um papel relevante de TLR4, TLR2 e MyD88 no estabelecimento da imunidade protetora contra o *P. brasiliensis*, Loures (2007) sugere, que o fungo utiliza o receptor para infectar macrófagos e, assim, garantir sua multiplicação. Outra possibilidade que pode ser sugerida é que a repressão dos receptores Tolls observada nos outros tempos e condições de tratamento provavelmente deve fazer parte de um mecanismo utilizado pela célula hospedeira para controlar a fagocitose e a resposta inflamatória já que uma produção exacerbada de citocinas no local da infecção, embora aumente a eficiência de destruição do patógeno, pode causar sérios danos para o hospedeiro.

Neste trabalho notou-se que dos genes tanto envolvidos no processo pró-inflamatório, como na regulação transcricional, transdução de sinal, receptores Tolls, molécula adaptadora MyD88 e proteínas de membrana como o Cd14, neste último caso, este resultado corrobora com os encontrados por Lin & Kikihisa (2004) que verificaram a repressão deste gene em monócitos humanos infectados pelo parasita obrigatório *E. chaffensis*. Cortez *et al.*, 2006, também mostraram que monócitos humanos infectados por *Aspergillus. fumigatus* em uma cinética de 8 horas tem este gene reprimido principalmente no intervalo de 4 a 6 horas de infecção. A repressão de Cd14 também foi verificada empregando-se a tecnologia dos microarranjos para monócitos humanos infectados por *C. albicans* no intervalo de 18 horas de infecção (Kim *et al.*, 2005). Esses autores sugerem que a repressão deste gene possibilita a sobrevivência do parasita na célula hospedeira. Desta forma, a repressão de Cd14 em resposta a infecção por *P. brasiliensis* que ocorreu após 48 horas e seus componentes de parede que ocorreu principalmente ente 24 e 48 horas, também pode representar um mecanismo de sobrevivência desenvolvido por este patógeno.

VI- CONSIDERAÇÕES FINAIS

6) CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A interação entre *P. brasiliensis* e macrófagos é bastante complexa, sendo um determinante primário no desenvolvimento da infecção. Desta forma, este trabalho teve como ponto de partida avaliar o comportamento dessa interação durante uma cinética de interação, utilizando macrófagos alveolares da linhagem-MHS, no sentido de desenvolver um ambiente semelhante ao local onde a infecção primeiramente se instala.
- O estudo revelou a indução de genes responsáveis por processos quimiotáticos que facilitam a adesão célula-célula e genes relacionados à internalização e adesão do patógeno como Clec2, descrito como importante no intenso recrutamento de fagócitos para o sítio da infecção.
- Os genes dos receptores de reconhecimento padrão (Toll2, Toll4) e a molécula adaptadora MyD88, não apresentaram um papel relevante no sentido do estabelecimento da imunidade protetora contra o *P. brasiliensis*.
- Desta forma este trabalho revelou a indução de genes que codificam para proteínas que irão participar do processo de inflamação tais como migração celular e ativação da capacidade microbicida dos macrófagos, principalmente durante o estágio inicial da cinética de interação.

PERSPECTIVAS

- Analisar a quantificação das citocinas secretadas pelos macrófagos após a estimulação com o *P. brasiliensis* ou seus componentes de parede por ELISA;
- Analisar a expressão diferencial temporal dos genes de macrófagos peritoneais de camundongos das linhagens C57Bl/6 e C3H/HePas (selvagens), nocautes para TLR-2, TLR-4 e CR3, durante a interação com leveduras de *P. brasiliensis* e suas frações lipídicas por RT-PCR em tempo real (qRT-PCR).
- Avaliar o envolvimento dos TLRs na interação macrófago-*P. brasiliensis* para esclarecer se o receptor em questão está envolvido no reconhecimento deste fungo e se contribui também para a eliminação do *P. brasiliensis*, conferindo assim um caráter protetor na PCM.

VII- REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, D.O., Hamilton, T. A. 1997. Macrophages as destructive cells in host defense. In Gallin, J.I., Goldsten, J.M., Skyderman, R.S., editors. Inflammation: basic principles and correlates. New York: Raven Press.

Aderem, A.; Ulevith, R. J. Toll-Like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, v. 406, p. 782, 2000. Aderem, A.; Ulevith, R. J. Toll-Like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, v. 406, p. 782, 2000.

Akira, S.; Uematsu, S. Toll-like receptors and innate immunity. *J. Mol. Med.*, v.84, p. 712-725, 2006.

Almeida SR, Unterkircher CS Camargo ZP. Involvement of the major glycoprotein (gp43) of *Paracoccidioides brasiliensis* in attachment to macrophages. *Méd Mycol* 1998; 36: 405-11.

Almeida, S.R., Lopes, J.D. 2001. The low efficiency of dendritic cells and macrophages from mice susceptible to *Paracoccidioides brasiliensis* in inducing a Th1 response. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34: 529-537.

Alviano C.S., farbiarz, S.R., Souza, W., Angluster J., Travassos L.R. Characterization of *Fonsecae pedrosoi* melanin. *Journal of General microbiology*, 137 (4), 837-844, Apr, 1991.

Amber, L. J.; Hibbs, J. B.; Taintor, R. R.; Parker, C. J.; Johnson, B. B.; Varin, Z. Activated macrophage conditioned medium: identification of the soluble factors inducing cytotoxicity and the L-arginine dependent effector mechanism. *J. Leukoc. Biol.*, v. 49, p. 610-617, 1991.

Anjos AR, Calvi AS, Ferracini R, Peraçoli MT, Silva CL, Soares AM. 2002. Role of *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall fraction containing beta-glucan in tumor necrosis factor-alpha production by human monocytes: correlation with fungicidal activity. *Med Mycol* 40: 377-82.

Azuma I, Kanetsuma F, Tanaka Y, Yamamura Y, Carbonell LM. 1974. Chemical and immunological properties of galactomannans obtained from *Histoplasma duboisii*,

Histoplasma capsulatum, *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatidis*.
Mycopathol Mycol Appl. 54(1): 111-25.

Baeuerle PA, Baltimore D. NF- κ B: Ten years after. Cell 1996;87:13-20.

Baldwin ASJ. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. Annu Rev Immunol 1996; 14:649-83.

Bastos K.P, Bailão A. M, Borges C.L, Faria F.P, Felipe M. S. S, Silva M. G, Martins W. S, Fiúza R. B, Pereira M, Soares C. M. A. 2007. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals up regulated and novel genes potentially associated to the dimorphic process. BCM Microbiol, 10; 7:29.

Barbosa, W. & Daher, R.R. - Blastomicose Sul-Americana (paracoccidioidomicose). In: Veroneze, R. Doenças Parasitárias e Infecciosas. 8^o edição. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1991. Pp. 634-646.

Bellocchio, S.; Montagnoli, C.; Bozza, S.; Gaziano, R.; Rossi, G.; Mambula, S. S.; Vecchi, A.; Mantovani, A.; Levitz, S. M.; Romani, L. The Contribution of the Toll-Like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. J. Immunol., v. 172, p. 3059-3069, 2004.

Benard, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. Mycopathologia, v. 165, n. 4-5, p. 209-21, Apr-May 2008.

Biondo, C., Mideri, A., Messina, L., Tamasello, F., Garuffi, G., Catania, M.R., Bombaci, M., Beninati, C, Teti, G., Mancuso, G. MyD88 and TLR2, but not TLR4, are required for host defense against *Cryptococcus neoformans*. Eur J Immunol. 2005; 35(3):870-78.

Bocca, A.L., hayashi, E.E., Pinheiro, A.G., Furlanetto, A.B., Campanelli, A.P., Cunha, F.Q. et al Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*- infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. J Immunol., 161:3056-3063, 1998.

Bogdan, C., Thuring, H., Dlaska, M., Rollinghoff, M., Weiss, G. Mechanism of suppression of macrophage nitric oxide release by IL-13: influence of the macrophage population. *J. Immunol.* 1997; 159 (9): 4506-13.

Borges-Walmsley, M.I.; CHEN, D.; SHU, X. *et al.*. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol.*, v. 10, n. 2, p. 80-87. 2002.

Brummer E, Hanson LH, Restrepo A, Steven DA. In vivo and in vitro activation of pulmonary macrophages by IFN- γ for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. *J Immunol* 1988;140: 2786-9.

Brummer, E.; Hanson, L. H.; Stevens, D. A. Gamma-interferon activation of macrophages for killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and evidence for nonoxidative mechanisms. *Int J Immunopharmacol*, v. 10, n. 8, p. 945-52, 1988.

Brummer, E. et al. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infect Immun*, v. 57, n. 8, p. 2289-94, Aug 1989.

Brummer, E. et al. Ultrastructure of phagocytosed *Paracoccidioides brasiliensis* in nonactivated or activated macrophages. *Infect Immun*, v.58, n. 8, p. 2628-36, Aug 1990.

Brummer, C.; Castaneda, E.; Restrepo, A. - Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin. Microbiol. Rev.* 6(2): 89-117, 1993.

Cabiscol, E., G. belli, J. Tamarit, P. Echave, E. Herrero, J. Ros, Mitochondrial Hsp 60, resistance to oxidative stress, and the labile iron pool are closely connected in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 44531-44538.

Calich, V. L.; Vaz, C. A.; Burger, E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Res Immunol*, v. 149, n. 4-5, p. 407-17; discussion 499-500, May-Jun 1998.

Calich, V.L.G., Pina, A., Felonato, M., Bernardino, S., Costa, T.A., Loures, F. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007; 53(1): 1-7.

Calich, V. L. et al. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia*, v. 165, n. 4-5, p. 223-36, Apr-May 2008.

Camargo, Z.P.; Franco, M.F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev. Iberoam. Micol.*, v. 17, n. 2, p.41-48. 2000.

Cano, L. E. et al. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. *J Med Vet Mycol*, v. 30, n. 2, p. 161-8, 1992.

Cano, L. E. et al. Inhibitory effect of deferoxamine on macrophage activation on transformation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia ingested by macrophages: reversal by holotransferrin. *Infect Immun*, v. 62, n. 4, p.1494-6, Apr 1994.

Cano, L.E.; Singer-Verme, L.M.; Vaz, C.A.C.; Russo, M.; Calich, V.L.G. - Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response and specific isotype patterns. *Infect. Immun.* 63: 1777-1783, 1995.

Cano LE, Kashino SS, Arruda C, Andre D, Xidieh CF, Singer-Vermes LM, et al. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* 1998;66:800-6.

Cantrell, D. T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Ann Ver Immunol*, 14:259-74, 1996.

Cegielski, J.P., Chin, D.P., Espinal, M.A., Frieden, T.R., Rodriguez cruz, R., Talbot, E.A., Weill, D.E., Zaleskis, R. and Raviglione, M.C. (2002). The global tuberculosis situation. Progress and problems in the 20th century, prospects for the 21st century. *Infect Dis Clin North Am* 16(1):1-58.

Creery, W. D.; Diaz-Mitoma, F.; Filion, L.; Kumar, A. Differential modulation of B7-1 and B7-2 isoform expression on human monocytes by cytokines which influence the development of T helper cell phenotype. *Eur J Immunol*, 26(6): 1273-7, 1996.

Cortez K, Lyman C, Kottlilil S, Kim H, Roilides E, Yang J, Fullmer B, Lempicki R & Walsh T (2006) Functional genomics of innate host defense molecules in normal human monocytes in response to *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun*, 74, 2353-65.

Costa, M., Borges, C.L., Bailão, A.M., Meirelles, G.V., Mendonça, Y.A., Dantas, S.F., de Faria, F.P., Felipe, M.S., Molinari-Madlum, E.E., Mendes-Giannini, M.J., Fiuza, R.B., Martins, W.S., Pereira, M. and Soares, C.M. (2007). Transcriptome profiling of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon host interaction. *Microbiology* 153 (Pt 12): 4194-207.

Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006; 354:610-21.

Chow, J. C.; Young, D. W.; Golenbock, D. T.; Christ, W. J.; Gusovsky, . Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J. Biol. Chem.*, v. 274, p. 10689, 1999.

Darnell, Jr., Kerr, I.M., Stark, G.R. 1994. Jak-Stat pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*. 264: 1445-1424.

Deepe, G.S., Jr. Romani, L., Calich, V.L.G., Huffanagle, G., Arruda, C., Molinari-Madlum, E.E., Perfect, E.E.Jr. (2000) knockout mice as experimental models of virulence. *Méd. Mycol.* 38, 87-98.

Doyle, S. L.; O'Neill, L. A. J. Toll-like receptors: From the discovery of NFkB to new insights into transcriptional regulation in innate immunity. *Biochem. Pharmacol.*, v. 72, p. 1102-1113, 2006.

Eskra, L., Mathison, A., Splitter, G. 2003. Microarray analysis of mRNA levels from RAW264.7 macrophages infected with *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 71(3): 1125-1133.

Fava Neto C. Contribuição para o estudo imunológica da Blastomicose de Lutz (Blastomicose Sul-Americana). *Ver.Inst.Adof Lutz* 21 (1961). 122-132.

Fradin C, Kretschmar Nichterlein T, Gaillardin C, d'Enfert C, Hube B. Stage-specific gene expression of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol* 2003; 47: 1523-43.

Felipe M.S., Andrade R.V., Petrofeza S.S., Maranhão A.Q., Torres F.A., Albuquerque P., Arraes F.B., Arruda M., Azevedo M.O., Baptista A.J., Bataus L.A., Borges C.L., Campos E.G., Cruz M.R., Daher B.S., Dantas A., Ferreira M.A., Ghil G.V., Jesuino R.S., Kyaw C.M., Leitão L., Martins C.R., Moraes L.M., Neves E.O., Nicola A.M., Alves E.S., Parente J.A., Pereira M., Poças-Fonseca M.J., Resende R., Ribeiro B.M., Saldanha R.R., Santos S.C., Silva-Pereira I., Silva M.A., Silveira E., Simões I.C., Soares R.B., Souza D.P., De-Souza M.T., Andrade E.V., Xavier M.A., Veiga H.P., Venancio E.J., Carvalho M.J., Carvalho M.J., Oliveira A.G., Inoue M.K., Almeida N.F., Walter M.E., Soares C.M.A., Brigido M.M. 2003. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast* 20: 263-271.

Felipe M.S., Andrade R.V., Arraes F.B., Nicola A.M., Maranhão A.Q., Torres F.A., Silva-Pereira I., Poças-Fonseca M.J., Campos E.G., Moraes L.M., Andrade P.A., Tavares A.H., Silva S.S., Kyaw C.M., Souza D.P., Pereira M., Jesuino R.S., Andrade E.V., Parente J.A., Oliveira G.S., Barbosa M.S., Martins N.F., Fachin A.L., Cardoso R.S., Passos G.A., Almeida N.F., Walter M.E., Soares C.M.A., Carvalho M.J., Brigido M.M. PbGenome Network. 2005. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cell. *J Biol Chem* 280: 24706-24714.

Fernandez-Arenas, E., Cabezon, V., Bermejo, C., Arroyo, J., Nombela, C., Diez-orejas, R. and Gil, C. (2007). Integrated proteomics and genomics strategies bring new insight into *Candida albicans* response upon macrophage interaction. *Mol Cell proteomics* 6(3): 460-78.

Filler, S. G.; Sheppard, D. C. Fungal invasion of normally nonphagocytic host cells. *PLoS Pathog*, v. 2, n. 12, p. e129, Dec 2006.

Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T.R., Howard, M., Moore, K.W., O'Garra, A., 1991. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J. Immunol.* 146, 3444-3451.

Figueiredo F, Alves LM, Silva CL. Tumour necrosis factor production in vivo and in vitro in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. Clin Exp Immunol 1993; 93:189-94.

Franco, M.; Mendes, R.P.; Moscardi-Bachhi, M.; Rezkallah-Iwasso, M.; Montenegro, M.R. - Paracoccidioidomycosis. Bailliére's Clin. Trop. Med. Commun. Dis. 4:185-220, 1989.

Gajewski T F; Pinnas M; Wong T; Fitch F W Murine Th1 and Th2 clones proliferate optimally in response to distinct antigen-presenting cell populations. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) 1991;146(6):1750-8.

Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S & Underhill DM (2003) Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. J Exp Med 197: 1107–1117.

Grahan, J.E. and Clark-Curtiss, J.E. (1999). Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). Proc Natl Acad Sci USA 96(20): 11554-9.

Goldman G.H., dos Reis Marques E., Duarte Ribeiro D.C., de Souza Bernardes L.A., Quiapin A.C., Vitorelli P.M., Savaoldi M., Semighini C.P., de Oliveira R.C., Nunes L.R., Travassos L.R., Puccia R., Batista W.L., Ferreira L.E., Moreira J.C., Bogossian A.P., Tekaia F., Nobrega M.P., Nobrega F.G., Goldman M.H. 2003. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. Eukaryot Cell 2: 34-48.

Gómes, B.L.; Nosanchuk, J.D.; Díez, S. *et al.* Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro and during infection. Infect. Immun., v. 69, n. 9, p. 5760-5767. 2001.

Gómez, B.L.; Nosanchuk, J.D. Melanin and fungi. Curr. Opin. Infect. Dis., v. 16, n. 2, p. 91-96. 2003.

Gonzalez-Amaro R, Sanchez-Madrid F (1999). Cell adhesion molecules: selectins and integrins. Crit Rev Immunol. 19(5-6): 389-429. Review.

Gonzalez, A., W. de Gregori, D. Velez, A. Restrepo, and L. E. Cano. 2000. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Infect Immun* 68:2546-52.

Gonzalez A, Aristizabal BH, Gómez EC, Restrepo A, Cano LE. Inhibition by tumor necrosis factor-alpha-activated macrophages of the transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells through a mechanism independent of nitric oxide. *Am J Trop Med Hyg* 2004;71:828-30.

Gozalbo, D.; Gil, M. L. TLR-2, but not TLR-4, triggers cytokine production by murine cells in response of *Candida albicans* yeast and hyphae. *Microb. Infec.*, v. 8, p. 2299-2304, 2006

González, A., Yáñez, A., Gozalbo, D., Gil, M.L. MyD88 is dispensable for resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in a murine model of blood-borne disseminated infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008;54(3): 365-74.

Green, L.C., Wagner, D.A., Ruiz de Luzureaga, K., Istfan, N., Young, V.R., Tannenbaum, S.R. Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 78 (12), 7764-8, Dec, 1981.

Green, S. J.; Crawford, R. M.; Hockmeyer, J. T.; Meltzer, M. S.; Nacy, C. A. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-g-stimulated macrophages by induction of TNF- α . *J. Immunol.*, v. 145, p. 4290, 1990.

Hibbs, J.B.Jr., Taintor, R.R, Vavrin, Z., Rachlin, E.M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 157(1):87-94.

Hoffmann, J. A.; Kafatos, F.C.; Janeway, C. A.; Ezekowitz, R. A. Phylogenetic perspective in innate immunity. *Science*, v. 284, p. 1313. 1999.

Hogan, L.H.; Klein, B.S.; Levitz, S.M. Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microb Rev*, v. 9, n. 4, p. 469-488. 1996.

Hornung F; Scala G; Lenardo M J. TNF-alpha-induced secretion of C-C chemokines modulates C-C chemokine receptor 5 expression on peripheral blood lymphocytes. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 2000;164(12):6180-7.

James, S.L., Glaven, J. macrophage cytotoxicity against Shistosomula of *Shistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. *J Immunol.* 1989; 143 (12):4208-12.

Jenner, R. & R. Young (2005) Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. *Nat Rev Microbiol*, 3, 281-94.

Jimenez MP, Restrepo A, Radzioch D, Cano LE, Garcia LF. Importance of complement 3 and mannose receptors in phagocytosis of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by Nramp1 congenic macrophages lines. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 47: 56-66.

Kanetsuma F., Carbonell L.M., Azuma I., Yamamura Y. 1972. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* 110: 208-18.

Karhawi, A. S., A. L. Colombo, and R. Salomao. 2000. Production of IFN-gamma is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. *Med Mycol* 38:225-9.

Kashino, S. S. et al. Effect of macrophage blockade on the resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia*, v.130, n. 3, p. 131-40, Jun 1995.

Kerwin, J.R.jr., Lancaster, J.R.Jr., Feldman, P.L. Nitric Oxide: a new paradigm for second messengers. *J.med Chem.* 1995 27; 38(22):4443-62.

Kim, H.S., Choi, E.H., Khan, J., Roilides, E., francesconi, A., Kasai, M., Sein, T., Schaufele, R.L., Sakurai, K., Son, C.G., Greer, B.T., Chanock, S., Syman, C.A., walsh, T.J. 2005. Expression of genes encoding innate host defense molecules in normal human monocytes in response to *Candida albicans*. *Infect Immun*; 73(6):3714-3724.

Kullberg, B. J.; Anaissie, E. J. Cytokines as therapy for opportunistic fungal infections. *Res Immunol*, 149 (4-5): 478-88, 1998.

Kuo, H.P.; HO, T.C.; WANG, C.H.; YU, C.T.; Lin, H.C. - Increased production of hydrogen peroxidase and expression of CD11b/CD18 on alveolar macrophages in patients with active pulmonary tuberculosis. *Tub. Lung Dis.* 77: 468-475, 1996.

Lacaz, C.S. - Paracoccidioidomicose. *Micologia Médica*. Editora Savier, 8° edição. Capítulo 10:248-297, 1991.

Lake, F.R.; Noble, P.W.; Henson, P.M.; Riches, D.W.H. – Functional switching of macrophage responses to tumor necrosis factor- α (TNF- α) by interferons: implications for the pleiotropic activities of TNF- α .*J. Clin. Invest.* 83: 1661-1669, 1994.

Lane, T.E., Wu-Hsieh, B.A., Howard, D.H. Anthistoplasma effect of activated mouse splenic macrophages involves production of reactive nitrogen intermediates. *Infect Immun.* 1994; 62(5): 1940-5.

Latgé JP. 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol.* 66(2): 279-90.

Lee, S.C., Dickson, D.W., Brosnan, C.F., Casadevall, A. Human astrocytes inhibit *Cryptococcus neoformans* growth by a nitric oxide-mediated mechanism. *J Exp Med.* 1994; 180(1): 365-9.

Leveille, S., Caza, M., Johnson, J.R., Clabots, C., Sabri, M. and Dozois, C.M. (2006). Iha from an *Escherichia coli* urinary tract and functions as a catecholate siderophore receptor. *Infect Immun* 74(6): 3427-36.

Liew, F.Y., Li, Y., Millot, S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with INF-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol.* 1990; 145(12): 4306-10.

Linehan SA, Martinez-Pomares L, Gordon S. 2000. Mannose receptor and scavenger receptor: two macrophage pattern recognition receptors with diverse functions in tissue homeostasis and host defense. *Adv Exp Med Biol.*; 479:1-14.

Lin, M., Rkihisa, Y. 2004. *Ehrlichia chaffeensis* downregulates surface Tol-like receptors 2/4, CD14 and transcription factors Pu.1 and inhibits lipopolysaccharide activation of NF-kappa B, Erk1/2 and p38 MAPK in host monocytes. *Cell Microbiol.* 6:175-186.

Livak K.J, T.D Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(- $\Delta\Delta$ CT) Method. *Methods*. 25: 402-408.

Loures, F.V. Caracterização da função dos lipídeos do *Paracoccidioides brasiliensis* e do receptor TLR-4 na interação fungo-hospedeiro. [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo: 2007.

Lorenz, M.C. and Fink, G.R. (2001) The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature* 412 (6842): 83-6.

Luster, A. D. - Chemokines chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* 338(7): 436-444, 1998.

Mamoni, R.L.; Nouer, S.A.; Oliveira, S.J.; Musatti, C.C.; Rossi, C.L.; Camargo, Z.P.; Blotta, M.H.S.L. - Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med. Mycol.* 40(2):153-159, 2002.

Mambula, S.S., Sau, K., Henneke, P., Golenbock, D.T., Levitz, S.M. Toll-like receptor (TLR) signaling in response to *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem.* 2002; 277(42): 39320-6.

Marques, E.R., Ferreira, M.E., Drummond, R.D., Felix, J.M., Menossi, M., Salvoldi, M., Travassos, L.R., Puccia, R., Batista, W.L., Carvalho, K.C., Goldman, M.H. and Goldman, G.H. (2004). Identification of genes preferentially expressed in the pathogenic yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*, using suppression subtraction hybridization and differential macroarray analysis. *Mol Genet genomics* 271(6):667-77.

Matulonis, V.; Dosiou, C.; Freeman, G.; Lamont, C.; Mauch, P.; Nadler, L. M.; Griffin, J. D. B7-1 is superior to B7-2 costimulation in the induction and maintenance of T cell-mediated antileukemia immunity. Further evidence that B7-1 and B7-2 are functionally distinct. *J. Immunol*, 156(3): 1126-31, 1996.

Mendes-Giannini, M.J.S.; Taylor, M.L.; Bouchara, J.B. *et al.* Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. *Med. Mycol*, v. 38, suppl. 1, p. 113-123. 2000.

Mendes-Gianinni, M. J. et al. Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. *Microbes Infect*, v. 6, n. 10, p. 882-91, Aug 2004.

Mendes-Gianinni, M. J. et al. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. *Mycopathologia*, v. 165, n. 4-5, p. 237-48, Apr-May 2008.

Medzhitov, R.; Pasare, C. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature*, v. 438, p. 364-368, 2005.

Moraes C.B, Schaffer G.M.V. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and an attempt to induce the dimorphic process with fetal calf serum. *Mycoses*, v.45, p.174-179, 2002.

Murciano, C., Villamon, E., Gonzalbo, D., Roig, P., O'Connor, J.E., Gil, M.L. Toll-like receptor 4 defective mice carrying point or null mutations do not show increased susceptibility to *Candida albicans* in a model of hematogenously disseminated infection. *Med Mycol*. 2006; 44(2): 149-157.

Nakamura, K., Miyagik, K., Koguchi, Y., Kinjo, Y., Uezu, K., Kinjo, T., Akamine, M., Feijito, J., Kawamura, I., Mitsuyama, M., Adach, Y., Ohno, N., Takeda, F., Akira, S., Miyazato, A., Kaku, M., Kawakami, F. Limited contribution of Toll-like receptor 2 and 4 to the host response to a fungal infectious pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006; 47(1):148-54.

Nascimento, F.R.F., Calich, V.L.G., Rodrigues, D., Russo, M. Dual Role for Nitric oxide in *Paracoccidioidomycosis*: Essential for Resistance, but overproduction Associated with Susceptibility. *The Journal of Immunology*, 168: 4593-4600.2002.

Nathan, C.F., Murray, H.W., Wiebe, M.E., Rubin, B.Y. 1983. Identification of Interferon gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med*. 158(3):670-89.

Netea, M.G., Van Der Graff, C.A., Vonk, A.G., Verschueren, I., Van Der Meer, J.W., Kullberg, B.J. The role of Toll-like receptor TLR2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis*. 2002; 165(10): 1483-9.

Neworal, E. P., A. Altemani, R. L. Mamoni, I. L. Noronha, and M. H. Blotta. 2003. Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral mucosa and lymph nodes of patients with paracoccidioidomycosis. *Cytokine* 21:234-41.

Nunes L.R, Costa de Oliveira R, Leite D.B, da Silva V.S, dos Reis Marques E, Da Silva Ferreira M.E, Ribeiro D.C, de Souza Bernardes L.A, Goldman M.H, Puccia R, Travassos L.R, Batista W,L, Nóbrega M.P, Nóbrega F.G, Yang D.Y, de Bragança Pereira C.A and Goldman G.H. 2005. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukariot Cell* 4(12): 2115-28.

O'Neill LAJ, Kaltschmidt C. NF- κ B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *TINS* 1997;20:252-8.

O'Neill, L.A., Bowie, A.G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol.* 2007 May; 7(5):353-64.

Oppenheim, J.J., Zachariae, C.O., Mukaida, N & Matusushima, K. properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol.* V.9, p. 1748, 1991.

Parise-Fortes, M.R., Da Silva, M.F., Sugizaki, M.F., Defaveri, J., Montenegro, M.R., Soares A. M. *et al.* 2000. Experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster: fungicidal activity and production of inflammatory cytokines by macrophages. *Med. Mycol.* 38: 51-60.

Popi, A.F.; Lopes, J.D.; Mariano, M. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cell. Immunol.*, v. 218, p. 87-94. 2002.

Quagliato, R.; Rezende, S.M.; Zambom, L.; Zanardi, V.; Menezes, J.R. - Tomografia computadorizada de tórax de alta resolução em paracoccidioidomicose (blastomicose sul-americana). *Rev. Bras. Med.* 56: 239- 246, 1999.

Rappleye C.A., Goldman W.E. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. *Annu. Rev. Microbiol.*, 60, 281-303, 2006.

- Rollins, B. J. Chemokines. *Blood*, 90(3): 909-28, 1997.
- Romani, L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*, v. 4, n. 1, p. 1-23, Jan 2004
- Rot Antal; von Andrian Ulrich H. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Annual review of immunology* 2004;22():891-928.
- Ruddle, N. H. - Tumor necrosis factor and related cytotoxins. *Immunol. Today*. 8: 129-130, 1987.
- Sallusto, F.; Lanzavecchia, A.; Mackay, C. R. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today*, 19(12): 568-74, 1998.
- Sallusto, F.; Palermo, B.; Hoy, A.; Lanzavecchia, A. The role of chemokine receptors in directing traffic of naive, type 1 and type 2 T cells. *Curr Top Microbiol Immunol*, 246:123-9, 1999.
- San-Blas, G, San-Blas, F. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. A review. *Mycopathologia*, v.62, p.77-86, 1977.
- San-Blas G and Nino-Vega G. 2001. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. *Fungal pathogenesis: principles and clinical applications*. R.L. Cihlar and R.A. Calderone. New York, Marcel Dekker: 205-242.
- Schaefer G, Venkataraman C, Schindler U. – STAT6. In: Hansel TT, Barnes PJ (eds). *New Drugs for Asthma and COPD*. Basel:Karger; 2001:346-349.
- Seftor RE, Seftor EA, Gehlsen KR, Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Ruoslahti E, Hendrix MJ. 1992. Role of the alpha v beta 3 integrin in human melanoma cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89(5):1557-61. signaling pathway in yeast. *PLoS Biol*. 2: E128.
- Shakoor, Z. & Hamblin, A.S. - Increased CD11/CD18 expression on leukocytes of patients with sarcoidosis. *Clin. Exp. Immunol*. 90: 95-105, 1992.

Shaw, D.R., Griffin, F.M. Antibody-independent phagocytosis. In Adams D.O., Elson, P.J., Koren H (eds). *Methods for studying mononuclear phagocytes*. London: Academic press, 1981.

Shikanai-yasuda, M.A., Assis C.M., Takeda, K.M., Tamashiro, N., Bueno, J.P. Monocyte adherence to *Paracoccidioides brasiliensis*, zymosan-C3b and erythrocyte-hemolysin in patients with paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*, 138 (2): 65-9, 1997.

Shinji, O., Noriko, O., Takao, K and Miyuki, A. Stat6 activation and Th2 cell proliferation driven by CD28 signals. *Eur. J. Immunol.* 2000. 30: 1416–1424.

Siebenlist U. NF- κ B/I κ B proteins. Their role in cell growth, differentiation and development. *Biochim Biophys Acta* 1997;1332:7-13.

Silva C.L., Fazioli, R.A. Role of the fungal cell wall in the granulomatous response of mice to the agents of chromomycosis. *Journal med. Microbial.*, 20(3), 229-305, Dec, 1985.

Silva, C.L. & Figueiredo, F. – Tumor necrosis factor in paracoccidioidomycosis patients. *J. Infect. Dis.* 164: 1033-1034, 1991.

Silva SS, T. A., Passos-Silva DG, Fachin AL, T. SM, S. CM, C. MJ, B. AL, S.-P. I, P. GA & F. MS. (2007) Transcriptional response of murine macrophages upon infection with opsonized *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. 10(1), 12-20.

Silva, M.B.; Marques, A.F.; Nosanchuk, J.D. *et al.* Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes Infect.*, v. 8, n. 1, p. 197-205. 2006.

Singer-Vermes, L. M. *et al.* Pathogenicity and immunogenicity of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in the human disease and in an experimental murine model. *Clin Exp Immunol*, v. 97, n. 1, p. 113-9, Jul 1994.

Souto JT, Figueiredo F, Furlanetto A, Pfeiffer K, Rossi MA, Silva JS. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am J Pathol* 2000; 156:1811-20.

Souto, J. T., J. C. Aliberti, A. P. Campanelli, M. C. Livonesi, C. M. Maffei, B. R. Ferreira, L. R. Travassos, R. Martinez, M. A. Rossi, and J. S. Silva. 2003. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon-gamma. *Am J Pathol* 163:583-90.

Springer, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. v. 76. n.2, p.301-14. 1994.

Steen, B.R., Zuyderduyn, S., Toffaletti, D.L., Marra, M., Jonas, S.J., Perfect, J.R. and Kronstad, J. (2003). *Cryptococcus neoformans* gene expression during experimental cryptococcal meningitis. *Eukaryot Cell* 2(6): 1336-49.

Staudt LM & Brown PO (2000) Genomic views of the immune system. *Annu Rev Immunol*, 18, 829-59.

Takeba, Y., Nagafuchi, H., Takeno, M., Kashiwakura, J., Suzuki, N. 2002. Txk, a member of nonreceptor tyrosine kinase of Tec family, acts as a Th1 cell-specific transcription factor and regulates IFN-gamma gene transcription. *J Immunol*. 168(5):2365-70.

Talaat, A.M., Ward, S.K., Wu, C.W., Rondon, E., Tavano, C., bannantine, J.P., Lyons, R. and Johnston, S.A. (2007). Mycobacterial bacilli are metabolically active during chronic tuberculosis in murine lungs: insights from genome-wide transcriptional profiling. *J. Bacteriol* 189(11):4265-74.

Travassos, L.R., Puccia, R.; Cisalpino, P. *et al.*. Biochemistry and molecular biology of the main diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch. Med. Res.*, v. 26, n. 3, p. 297-304. 1995.

Travassos, L.R.R.G. - *Imunologia: In: Uma vitória contra os fungos*. Rev. FAPESP 50:22-24, 2000.

Tavares A.H.F.P., Silva S.S., Dantas A.C., Campos E.G., Andrade R.V., Maranhão A.P., Brígido M.M., Passos-Silva D.G., Fachin A.L., Teixeira S.M.R., Passos G.A.S., Soares C.M.A., Bocca A.L., Carvalho M.J.A., Silva-Pereira I., Felipe M.S.S. 2007. Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. *Microbes Infect* 9: 583-590.

Tomkinson A, Kanehiro A, Rabinovitch N et al. The failure of STAT6-deficient mice to develop airway eosinophilia and airway hyperresponsiveness is overcome by interleukin-5. *Am J Respir Care Med* 1999; 160:1283.

Tsuiji Makoto., Fujimori Mayuko., Ohashi Yoshimi., Higashi Nobuaki., Onami Thandi M; Hedrick Stephen M., Irimura Tatsuro. Molecular cloning and characterization of a novel mouse macrophage C-type lectin, mMGL2, which has a distinct carbohydrate specificity from mMGL1. *The Journal of biological chemistry* 2002;277(32):28892-901.

Van Der Graaf, C. A. A.; Netea, M. G.; Vershueren, I.; Van Der Meer J. W. M.; Kuulberg, B. J. differential cytokine production and toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae. *Infect. Immun.*, v.73, p. 7458-7464, 2005.

Viriyakosol, S.; Fierer, J.; Brown, G. D.; Kirkland, T. N. Innate immunity to the pathogenic fungus *Coccidioides posadasii* is dependent on Toll-Like Receptor 2 and Dectin-1. *Infect. Immun.*, v. 73, p. 1553-1560, 2004.

Weiss, D.J., Evanson, O.A., Mingqui, D., Abrahamsen, M.S. 2004. Sequential patterns of gene expression by bovine monocyte-derived macrophages associated with ingestion of mycobacterial organism. *Microbial pathogenesis*. 37:215-224.

Yassin, R.J. & Hamblin, A.S. - Altered expression of CD11/CD18 on the peripheral blood phagocytes of patients with tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 97: 120-125, 1994.

Yauch, L.E., Mansour, M.K., Shoham, S., Rottman, J.B., Levitz, S.M. Involvement of CD14, Toll-like receptors 2 and 4 and MyD88 in activation of human monocytes by *Aspergillus fumigatus* hyphae. *Infect Immunol.* 2004; 72(9): 5373-82.

Xing Z, Zganiacz A, Santosuosso M. Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF-alpha and nitric oxide from macrophages via IFN-gamma induction. *J Leukoc Biol* 2000; 68:897-902.

Zhang, J., Sinha, M., Luxon, B.A., Yu, X. 2004. Survival strategy of obligately intracellular *Ehrlichia chaffeensis*: novel modulation of immune response and host cell cycles. *Infect. Immun.* 72(1):498-507.