

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR**

**Participação da Proteína Beta-2 integrina no Curso da**  
**Infecção Experimental Induzida**  
**pelo *Paracoccidioides brasiliensis***

**Janayna Nunes dos Reis**

**Brasília – DF**

**2009**

Ficha catalográfica

Reis, Janayna Nunes dos

Participação da Proteína Beta-2 integrina no curso da infecção experimental induzida pelo *Paracoccidioides brasiliensis*.

Janayna Nunes dos Reis.- Brasília, 2009.

Orientadora: Anamélia Lorenzetti Bocca

71 p.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado (Patologia Molecular), Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília – UnB.

1. *Paracoccidioides brasiliensis* – 2. Paracoccidioidomicose experimental – 3.  $\beta_2$  integrina 4. Macrófagos – 5. Fagocitose – 6. Camundongos  $\beta_2^{-/-}$

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR**

**Participação da Proteína Beta-2 integrina no Curso da**  
**Infecção Experimental Induzida**  
**pelo *Paracoccidioides brasiliensis***

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

**Janayna Nunes dos Reis**

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Anamélia Lorenzetti Bocca

**Brasília – DF**

**2009**

## **Banca examinadora**

Titulares:

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Ildinete Silva Pereira - UnB

Dr<sup>a</sup>. Simoneide Souza Silva - UnB

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Anamélia Lorenzetti Bocca - UnB

Suplente:

Dr<sup>a</sup> Alice Melo Ribeiro - UnB

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Imunologia, Área de Patologia,  
Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB.

Apoio Financeiro CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e  
Tecnológico) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
Superior).

***Dedico este trabalho com muito carinho:***

*Ao meu amor, meu companheiro, meu marido Alex Sandro, por tudo que você é e representa na minha vida.*

*À minha mãe querida, pelo apoio e compreensão em todos os momentos.*

*À minha irmã Suzane e minha sobrinha Ana Heloísa, a alegria contagiante da casa.*

*Ao meu pai José Eusterno (in memoriam) pelas lições de vida.*

*A todos que contribuíram, em pequenas ou grandes parcelas para a realização deste trabalho.*

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, esse ser tão maravilhoso e sublime sempre presente em todos os dias na minha vida.

A professora Anamélia Lorenzitti Bocca pela oportunidade de desenvolver esse trabalho.

Ao meu sempre amigo André Amaral, meu “dindo” e “irmão mais velho”, o qual foi o responsável pelo pontapé inicial para tudo. Obrigada pelo seu carinho, amizade, paciência, conselhos, ensinamentos, palpites nos momentos de bancada e em outros também. O meu muito obrigada por tudo.

Aqueles que colaboraram e me incentivaram desde o início deste projeto. Muito obrigada a Viviane Furlan, às dicas do Aldo Henrique e a Rosane Mansan. Rosane você esteve presente sempre, no início e também na finalização do trabalho. Obrigada pelo seu carinho e conselhos, nos experimentos e também em outros momentos.

Agradeço imensamente a Eleuza pelas correções, paciência e todo o acompanhamento e atenção dispensados durante a escrita da dissertação. Muito obrigada Eleuza, você contribuiu muito para a finalização deste trabalho.

A minha companheira pioneira Elisa, que esteve sempre presente, auxiliando-me nos experimentos, nos finais de semana e nas altas horas. Você foi muito importante em todos os momentos, e creio que aprendemos muito juntas.

Obrigada aos outros colegas do laboratório que agora também são mestrandos: Isaque, Ana Camila e Márcio. Sempre pude contar com vocês e sempre vou me lembrar disso. Obrigada ao Isaque pelo seu carinho e bom humor, sempre animando a todos ao seu redor. Obrigada a Ana Camila pelas agradáveis conversas que sempre tivemos. Márcio, muito obrigada por me ajudar na caracterização das lâminas do histopatológico e na imensa ajuda na análise morfométrica.

Especial agradecimento a Yanna Nóbrega por tudo: pelos momentos de lazer na Paraíba, mas principalmente pelo auxílio nos ensaios de ELISA. Muito obrigada mesmo! Sua ajuda foi fundamental nesta etapa final.

Obrigada a Alice pela colaboração e esclarecimentos para o desenvolvimento do projeto.

A professora Maria Sueli Felipe pela colaboração e parceria. Obrigada também pela oportunidade de aprender e participar dos seminários do grupo Pb, de palestras de workshops. A todos os alunos do laboratório de Biologia Molecular, em especial a Simoneide, Kaliandra, Larissa e Túlio, que sempre mostraram-se prestativos e solícitos sempre que eu precisava.

Ao técnico do Biotério Sr. Dedé e a Dona Maria, por cuidarem dos animais. Obrigada ao Seu Dedé pela atenção e dedicação em todos os momentos. Ao veterinário responsável pelo biotério Rafael, por ser sempre tão atencioso e bacana comigo.

O meu muito obrigada ao técnico do Laboratório de Medicina Tropical Nelson, por me receber tão bem sempre que ia realizar ensaios para leitura de proliferação. Obrigada pelo carinho, gentileza e atenção que sempre teve comigo.

Obrigada também ao pesquisador da Embrapa Alexandre Caetano por disponibilizar o aparelho de  $\beta$ -cintilação e permitir as leituras das amostras.

A professora Lúcia Helena Faccioli da Universidade de Ribeirão Preto – USP, pelo apoio e colaboração com o fornecimento dos animais de experimentação knockout da beta 2 integrina, permitindo com isso a realização deste projeto.

A professora Magda do UNICEUB pela doação de alguns animais para os experimentos.

Ao professor Dr. Florêncio Figueiredo e a técnica Viviane do laboratório LIB pelas lâminas histopatológicas.

A professora Fabiana Pirani pela orientação na descrição das lâminas do histopatológico. Obrigada pelas belas fotos dos ensaios histopatológicos.

Ao CNPq e CAPES pelos apoio financeiro para a realização do projeto.

Muito obrigada também a Patrícia Cunha por me ajudar sempre que eu precisei, principalmente por ceder seu laboratório para a análise morfométrica.

Obrigada a Suelaine, minha ex-coordenadora, que embora esteja muito longe agora, ajudou muito com sua compreensão pelos meus atrasos na escola em decorrência dos experimentos.

Obrigada a Keyla Caroline, sempre disposta a ajudar, sempre amiga, sempre tão meiga! Obrigada pela preocupação e atenção, solidariedade e carinho.

A minha amiga Bruna Alessandra, pela amizade maravilhosa que mantemos até hoje apesar de estarmos longe.

Agradecimento mais do que especial a minha querida amiga Cecília Livia, que tem sido meu verdadeiro anjo da guarda nesta etapa final, ajudando-me em absolutamente tudo. Mas não posso deixar de lembrar que você esteve sempre presente em todos os momentos, na realização dos experimentos e também na minha vida pessoal. Não tenho palavras para agradecer pela sua amizade, seus conselhos, carinho, preocupação e dedicação para comigo sempre! MUITÍSSIMO obrigada!

A minha família pela compreensão sempre, e por me apoiarem em todos os momentos. Mãe, você é uma jóia rara em minha vida. Muito obrigada pelo seu amor incondicional! Obrigada a minha querida irmã Suzane, tão companheira e tão compreensiva, além de muito generosa.

Ao meu Alex Sandro, por sua companhia, seu carinho, sua amizade e seu amor.

<b>Sumário</b>	<b>Página</b>
Lista de Abreviaturas e Siglas	x
Resumo	xiv
Abstract	xv
<b>1. Introdução</b>	<b>2</b>
1.1 Aspectos morfológicos e patológicos da paracoccidiodomicose (PBM)	2
1.2 Sintomatologia da Paracoccidiodomicose	3
1.2.1. Quadros clínicos da doença	3
1.3 Aspectos Imunológicos do hospedeiro com paracoccidiodomicose	5
1.4 Proteína Beta-2 Integrina	12
<b>2. Objetivos</b>	<b>17</b>
<b>3. Material e Métodos</b>	<b>19</b>
3.1 Cultivo do fungo	19
3.2 Animais experimentais e infecção	18
3.3 Coleta do sangue, pulmões e baço dos camundongos	20
3.4 Cultura de macrófagos recuperados de camundongos infectados	20
3.5 Análise <i>in vitro</i> da capacidade fagocítica de macrófagos murinos com leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	21
3.6 Recuperação e quantificação do fungo no pulmão	22
3.7 Análise histológica do fígado e pulmão	22
3.8 Análise morfométrica do fígado e pulmão	23
3.9 Ensaio de proliferação dos esplenócitos	23
3.10 Dosagem da concentração de Óxido Nítrico	24
3.11 Dosagem de anticorpos	25
3.12 Quantificação de citocinas	25
3.13 Análise Estatística	26
<b>4. Resultados</b>	<b>28</b>
<b>5. Discussão</b>	<b>42</b>
<b>6. Conclusão</b>	<b>48</b>
<b>7. Referências Bibliográficas</b>	<b>50</b>
<b>8. Anexo</b>	<b>71</b>

## Lista de Abreviaturas e Siglas

aa	Aminoácido
$\beta$ 2	Beta 2
BHI	Brain Heart Infusion
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiopterina
°C	Graus Centígrados
CD	Cluster of Differentiation
CFU	Unidades Formadoras de Colônias
cm <sup>2</sup>	Centímetros quadrados
CO <sub>2</sub>	Gás Carbônico
ConA	Concanavalina-A
CPM	Contagem de Pulsos por Minuto
CR	Receptor do Complemento
CXCL	Citocina pertencente à Família das Quimiocinas CXC
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
D.O.	Densidade Óptica
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FII	Fração FII de <i>P. brasiliensis</i>
FMN	Flavina Monocucleotídeo
FO	Fração FO (zero) de <i>P. brasiliensis</i>
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
h	Horas
H&E	Hematoxilina e Eosina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio

H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ácido fosfórico
IFN-γ	Interferon gamma
gp 43	Glicoproteína de 43.000 daltons
gp70	Glicoproteína de 70.000 daltons
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
IL	Interleucina (IL-1, IL-2...)
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzida
IP	Proteína de 10kD induzida por Interferon gamma
KD	Kilodaltons
Kg	Kilogramas
KO	Knockout
LAD-1	Deficiência da adesão de Leucócito tipo 1
LFA-1	Função de Linfócito associado ao Antígeno 1
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MCP	Proteína Quimotática de Monócitos
MIG	Monocina Induzida por Interferon gamma
MIP	Proteína Inflamatória de Macrófago
mg	Miligramas
mL	Mililitros
min.	Minutos
M.O.	Microscopia Óptica
nm	Nanometros
NADPH	Fosfato de Nicotinamida Adenina

NEED	N-1 (1- Naphthyl)Ethyl-Enedinamine
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NO <sub>2</sub>	Nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
ONOO-	Peróxonitrito
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido
O <sub>2</sub>	Gás Oxigênio
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS	Tampão Salina Fosfato
PCM	Paracoccidioidomicose
pH	Potencial de Hidrogênio
PMN	Leucócitos Polimorfonucleares
%	Porcentagem
RIN	Reativos Intermediários de Nitrogênio
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (meio de cultura)
SBF	Soro Bovino Fetal
Th1	Subconjunto de células T auxiliares do tipo I
Th2	Subconjunto de células T auxiliares do tipo II
TGF-β	Fator de Crescimento e Transformação Beta (β)
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa (α)
WT	Wild Type
α-1,3-glucana	Alfa 1,3-glucana

$\beta$ -1,3 glucana	Beta 1,3 glucana
$\mu$ Ci	MicroCurie
$\mu$ g	Microgramas
$\mu$ L	Microlitros
$\mu$ m	Micrometros
$\mu$ M	Micromolar
$\mu$ L	Microlitros

## Resumo

*Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo intracelular facultativo causador da Paracoccidioidomicose (PCM), doença crônica e granulomatosa, frequente na América Latina. O principal mecanismo de defesa do hospedeiro contra a PCM é a imunidade celular mediada principalmente por macrófagos ativados por IFN- $\gamma$ . A interação inicial entre macrófago-fungo é mediada pelas interações entre proteínas de superfície, tais como as moléculas de adesão  $\beta_2$  integrinas. Os mecanismos pelos quais as integrinas interferem no curso da PCM são desconhecidos até o momento. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a participação da  $\beta_2$  integrina na evolução da PCM. Para isso, foram utilizados camundongos C57BL/6 selvagens (WT) e geneticamente deficientes para a produção dessa proteína ( $\beta_2^{-/-}$ ), ambos infectados com  $1 \times 10^6$  células do isolado virulento *P. brasiliensis* (Pb18) por via endovenosa. Após 15, 30 e 60 dias de infecção os animais foram sacrificados e a análise histológica e histocitométrica de tecidos do fígado e pulmão foi realizada. A carga fúngica, os níveis de NO<sub>3</sub>, a concentração de anticorpos no soro e de citocinas em sobrenadante de culturas também foram determinados. Os resultados encontrados mostraram que nos camundongos  $\beta_2^{-/-}$  a carga fúngica foi menor quando comparada aos animais WT. No 15º dia após a infecção, tecidos do fígado de ambos os grupos de animais analisados apresentaram lesões granulomatosas bem caracterizadas; além disso, nesse mesmo período, o tamanho da área granulomatosa de tecido pulmonar foi significativamente maior nos camundongos  $\beta_2^{-/-}$  do que nos WT. No 60º dia após infecção, camundongos  $\beta_2^{-/-}$  apresentaram lesões granulomatosas mais compactas, bem formadas no tecido pulmonar, caracterizada por pouco espaço alveolar e presença de muito fungo nas lesões. Os níveis de NO<sub>3</sub> detectados nos períodos de 15 e 60 dias após infecção foram significativamente menores em camundongos  $\beta_2^{-/-}$ . Os níveis de anticorpos IgG1 foram significativamente maiores em animais  $\beta_2^{-/-}$ . A produção de IL-12 e IL-10 foi semelhante em ambos os grupos, mas o estímulo específico com antígenos protéicos da parede celular de Pb18 induziu um leve aumento da produção apenas de IL-10. A capacidade de proliferação celular avaliada em linfócitos do baço estimulados com extrato protéico da parede celular do fungo foi mais significativa em animais  $\beta_2^{-/-}$ , quando comparados aos animais WT. Finalmente, foi observado que macrófagos de ambos os grupos de animais estudados, infectados *in vitro* com *P. brasiliensis* aumentaram o número de leveduras internalizadas após o tempo de 24 horas de co-cultivo. Nossos dados sugerem que as  $\beta_2$  integrinas participam do processo de internalização de leveduras de *P. brasiliensis*, contribuindo para a permanência do fungo no interior dos macrófagos e conseqüente sobrevivência do fungo.

**Palavras chave:** *P. brasiliensis*, paracoccidioidomicose experimental,  $\beta_2$  integrina, macrófagos, fagocitose, camundongos  $\beta_2^{-/-}$ .

## Abstract

*Paracoccidioides brasiliensis* is a facultative intracellular fungus that causes paracoccidioidomycosis (PCM), a chronic and granulomatous disease, frequently diagnosed in Latin America. As in other systemic mycoses, the host's principal defense mechanism against PCM is the cellular immunity mediated mainly by IFN-gamma activation of macrophages. Macrophages appear to play a fundamental role in this infection acting as the first line of defense for organism. The first interaction between macrophages-fungi is very important in this mycosis progression and this interaction is mediated by surface proteins, like  $\beta_2$  integrin. The role of  $\beta_2$  integrin in the course of PCM is still unclear, then in the present study the importance of  $\beta_2$  integrin to progression of the disease was investigated. We used  $\beta_2$  - deficient ( $\beta_2^{-/-}$ ) and wild-type (WT) C57BL/6 mice both endovenous infected with  $1 \times 10^6$  the virulent *P. brasiliensis* strain (Pb18). After 15, 30 and 60 days post infection the mice were killed and we evaluated the disease progression by histology and histocytometry of liver and lung sections and also the fungal burden. Besides we analyzed the  $\text{NO}_3$  levels, antibodies in the serum and the production of cytokines. Our data showed that in the  $\beta_2^{-/-}$  mice there was less fungal burden when compared with the WT mice. After 15 days of infection, liver sections from both mouse groups presented granulomatous lesions well characterized with organized cells. Conversely, 60 days post infection we observed less alveolar space and many fungi inside the lesions in lung tissue from  $\beta_2^{-/-}$  mice. The size of granulomas from lung sections was significantly higher in  $\beta_2^{-/-}$  mice than in the WT only 15 days after infection, and this result was inverted in the 60° day post infection. Analysis of the  $\text{NO}_3$  levels from WT mice showed increase after 8 weeks post infection; moreover IgG1a and IgG2 levels were higher in  $\beta_2^{-/-}$  mice. IL-12 and IL-10 production was similar in both groups, but the specific stimulus with the fungi antigens increased the IL-10 production. The spleen cell proliferation stimulated by protein extract from fungus (Pb 1:500) was more significant in  $\beta_2^{-/-}$  mice, while WT mice presented less efficient lymphoproliferative response. We also observed that macrophages infected with *P. brasiliensis* in vitro from the two mouse strains had increased in internalized yeasts after 24h of co-culture. Our data suggest that  $\beta_2$  integrins that are probably involved with the fungi internalization contribute with the survival of the fungi inside macrophages and this phagocytosis may serve as a protected environment for the *P. brasiliensis*.

**Keywords:** *Paracoccidioides brasiliensis*, experimental paracoccidioidomycosis,  $\beta_2$  integrin, macrophages, fagocytosis,  $\beta_2^{-/-}$ .

# *I - Introdução*

## INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos morfológicos e patológicos da paracoccidioidomicose (PCM)

A paracoccidioidomicose é uma doença endêmica, restrita geograficamente às Américas Central e do Sul, com exceção do Chile, El Salvador, e ilhas do Caribe, sendo que a maioria dos casos se concentra no Brasil, Venezuela e Colômbia (Tobon *et al.*, 1998; Garcia-Bustinduy *et al.*, 2000; Borgia *et al.*, 2000; Paniago *et al.*, 2005). No território brasileiro, as áreas de maior endemicidade se encontram na região Sudeste (Blotta *et al.*, 1999; Gonçalves *et al.*, 1998; Silva-Vergar *et al.*, 2001; Bicalho *et al.*, 2001) Sul (Verli *et al.*, 2005) e Centro-Oeste (Hahn *et al.*, 2003; Paniago *et al.*, 2003). A maior prevalência de casos descritos está no meio rural, embora a incidência da doença também foi descrita no meio urbano (Nunes Texeira, 1981).

O agente etiológico da paracoccidioidomicose é o fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, que foi descrito primeiramente por Adolfo Lutz em 1908 (Fagundes-Preyra *et al.*, 2006; Van Damme *et al.*, 2006). Na América Latina existem aproximadamente 10 milhões de indivíduos infectados com este fungo e acredita-se que aproximadamente 2% desenvolvem a doença (Restrepo *et al.*, 2001). O *P. brasiliensis* é um fungo dimórfico, crescendo como micélio no meio ambiente, em temperaturas inferiores a 28°C, e como levedura em tecidos infectados (San-Blas, 1993). A fase leveduriforme é caracterizada por múltiplos brotamentos de uma única célula (Andrade *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2006). A transição de micélio para levedura pode ser induzida *in vitro*, pela elevação da temperatura de 25°C para 37°C (Felipe *et al.*, 2005). O período de incubação da doença varia entre 10 a 20 anos ou mais (Horre *et al.*, 2002; Van Damme *et al.*, 2006).

A determinação de hipersensibilidade tardia utilizando testes cutâneos indica uma distribuição igual entre homens e mulheres. Entretanto, quando são analisados dados de desenvolvimento da doença, há um número desproporcional de homens afetados (aproximadamente 90% de homens comparados a 10% de mulheres). Esta diferença foi atribuída a fatores que colocam os homens em maior risco, como as doenças subjacentes (tabagismo e alcoolismo), a desnutrição, e as diferenças hormonais (Blotta *et al.*, 1999; Borges-Walmsley *et al.*, 2002; Dos Santos *et al.*, 2004). Outros estudos comprovam que a paracoccidioidomicose ocorre principalmente em indivíduos imunocomprometidos (Borges- Walmsley *et al.*, 2002).

A PCM pode estar associada a outras doenças infecciosas como a disenteria amebiana (Haberfed, 1915), verminoses (Del Negro, 1982; Shikanai-Yasuda *et al.*, 1995), tuberculose pulmonar (Do Valle *et al.*, 1992; Tresoldi *et al.*, 2005), hanseníase (Del Negro, 1982), cromoblastomicose (Ferreira, 2002), candidíase (Goldman *et al.*, 2003; Wheat, 2006), leishmaniose (Ramos-e-Silva, 2004) e doença de Chagas (Levi, 1998). Além disso, pode ocorrer em pacientes transplantados (Kurita *et al.*, 2005), em casos de pessoas subnutridas (Pereira *et al.*, 2004), em pacientes portadores do vírus HIV (Paniago *et al.*, 2005; Godoy *et al.*, 2003) e nos pacientes em quimioterapia antitumoral (Kaminagakura *et al.*, 2004). Como também ser associada com diferentes tipos de câncer e doenças, como por exemplo, a doença de Hodgkin (Del Negro, 1982; Pedro *et al.*, 1989; Ferreira, 2002); carcinoma de pulmão (Meneses-Garcia *et al.*, 2002); carcinoma de paratireóide (Ferreira, 2002), esporotricose (Del Negro, 1982; Ferreira, 2002), cancro broncogênico e poliarterite nodosa (Ferreira, 2002). Assim, o aparecimento da doença no indivíduo e a modulação do quadro clínico parecem estar dependentes de fatores ambientais, hormonais, imunológicos e patológicos de natureza diversa.

## **1.2 Sintomatologia da Paracoccidioidomicose**

### **1.2.1. Quadros clínicos da doença**

Existem duas formas clínicas daPCM: as formas aguda ou sub-aguda (também chamada de tipo juvenil) e a forma crônica (ou adulta).

#### **❖ PCM na forma aguda**

A forma aguda ou tipo juvenil da PCM se caracteriza por apresentar um quadro clínico que evolui rapidamente, dentro de poucas semanas, e é uma forma muito grave da doença, com altas taxas de mortalidade relacionadas, principalmente, à hipertrofia do sistema reticuloendotelial (Brummer *et al.*, 1993; Franco, 1994). Nesta fase da doença não é comum o comprometimento das mucosas nem do tecido pulmonar e acomete principalmente jovens e de ambos os sexos. Nestes pacientes observam-se ainda altos títulos de anticorpos e uma resposta imune celular suprimida (Mendes *et al.*, 1990; Brummer *et al.*, 1993;).

O quadro mórbido caracteriza-se por acentuado polimorfismo clínico, tanto lesional como evolutivo. Existem estados inaparentes ou subclínicos da doença. É possível observar lesões em determinado setor do corpo com caráter localizado, real ou aparente, as quais precedem formas patológicas com alterações múltiplas em diversos órgãos ou estados de generalização da doença (Benard & Duarte, 2000).

A partir de lesões de inoculação ocorre propagação pelas vias linfáticas, originando adenopatia regional (Tani *et al.*, 1987). Da lesão de inoculação produz-se por via linfática ou por contigüidade a disseminação da doença (Bedoya *et al.*, 1986). Desta maneira, observam-se esplenomegalia, lesões pulmonares, cutâneas, hepáticas, intestinais, supra-renais, ósseas e cerebrais (Cock *et al.*, 2000). Entretanto, as lesões no sistema nervoso central e no coração são raras (Singer-Vermes *et al.*, 1993; Do Valle *et al.*, 1998).

#### ❖ PCM na forma crônica

A forma crônica acomete 90% dos casos de pacientes com PCM, afetando principalmente homens adultos. A progressão da doença acontece de forma lenta, podendo levar meses a anos para se tornar completamente estabelecida (Brummer *et al.*, 1993; Svidzinski *et al.*, 1999). Esta forma atinge primeiramente os pulmões, podendo se disseminar para outros órgãos e tecidos, formando lesões secundárias nas mucosas, pele, linfonodos e glândulas adrenais (Brummer *et al.*, 1993; Franco, 1994).

As manifestações clínicas da forma crônica da PCM são classificadas em duas formas polares: positiva e negativa (Franco *et al.*, 1994). A polar positiva é caracterizada pela presença de lesões generalizadas, pelo elevado título de anticorpos específicos aos antígenos de *P. brasiliensis*, imunidade celular enfraquecida e presença de reação inflamatória granulomatosa, contendo muitos fungos viáveis. Na forma polar negativa, as lesões são localizadas, o título de anticorpos específicos ao *P. brasiliensis* é baixo ou ausente, a imunidade celular é preservada e as lesões granulomatosas são compactas e com baixo número de fungos. Ambas as formas clínicas da doença estão associadas com extensas seqüelas nos órgãos do hospedeiro que incluem lesões ocasionadas por uma resposta anormal de células do sistema imune (Lacaz *et al.*, 1982). A confirmação da doença é dada quando o paciente com manifestações clínicas compatíveis com PCM em cuja secreção, fluido corporal ou material de lesão foi observado a presença de *P. brasiliensis*, por exame micológico direto, cultura ou exame histopatológico (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

### 1.3. Aspectos Imunológicos do hospedeiro com paracoccidioidomicose

A imunidade celular e a participação dos anticorpos, citocinas, quimiocinas e outros componentes da resposta imunológica na PCM tem sido explorada tanto no homem como em animais experimentais. Os mecanismos imunes não-específicos eficientes e que participam da defesa dos hospedeiros com PCM são vários dentre eles: células NK (Jimenez-Finkel & Murphy 1988; Peraçoli *et al.*, 1989 e 1995), polimorfonucleares (Goihman-Yahr *et al.*, 1980 e 1989; Calich *et al.*, 1985; Mcewen *et al.*, 1987) e o sistema complemento com participação das vias alternativa e da clássica (Restrepo & Velez, 1975; Calich *et al.*, 1979 e 1985; Munk & Da Silva, 1992; Crott *et al.*, 1997; Shikanai-Yasuda, 1997; Jimenez, *et al.*, 2006).

Com relação ao papel dos anticorpos na PCM, embora possa facilitar a opsonização de fungos (Restrepo & Velez, 1975; Verronesi & Focaccia, 2005) é controverso o seu papel na proteção. Nogueira e colaboradores (2006) descreveram anticorpos capazes de mediar a lise do fungo pela via do sistema complemento em soros de pacientes com doença ativa. Carvalhaes e colaboradores (1986) observaram menor mortalidade em camundongos que produziam altos níveis de anticorpos para antígeno flagelar de *Salmonella* e com maiores níveis de anticorpos anti-*P. brasiliensis*. No entanto, não notaram relação entre os níveis de anticorpos e a proteção em camundongos.

A hiperprodução de anticorpos na PCM, nem sempre específicos, documentada por níveis aumentados principalmente das imunoglobulinas IgA, IgE, IgG, IgG4 e IgM (Bueno *et al.*, 1997; Mamoni *et al.*, 2001 e 2002) e por aumento do número de linfócitos B (Benard *et al.*, 1997), estaria refletindo uma desregulação do sistema imune, possivelmente devido a maior ativação de células Th2. Em trabalhos realizados com *Cryptococcus neoformans*, Taborda e colaboradores (2002) concluíram que IgM e IgA promovem fagocitose de *C. neoformans* por macrófagos peritoneais, e que IgG1 funcionou como opsonina em todos os tipos de macrófagos analisados.

Relatos da literatura tanto em humanos como em modelos experimentais têm demonstrado a importância da imunidade celular na proteção anti-*P. brasiliensis* (Peraçoli *et al.*, 1991; Bozzi *et al.*, 2004). Na doença humana, vários estudos têm demonstrado depressão de imunidade celular nas formas mais graves dessa doença (Mendes & Raphael, 1971; Mota *et al.*, 1985; Mendes-Giannini *et al.*, 1989). Mota e colaboradores (1985) e Da Costa e colaboradores (1986), descreveram maior depressão

de imunidade celular, avaliada por contagem de linfócitos T, provas intradérmicas a antígenos microbianos e à paracoccidoidina, transformação blástica e inibição da migração a fito-hemaglutinina e por antígenos de *P. brasiliensis* em pacientes com a forma aguda da doença, como também em pacientes com a forma crônica disseminada e/ou localizada.

Resultados obtidos na PCM murina tornaram possível caracterizar dados relativos à importância da virulência do isolado e às características do hospedeiro (Andre *et al.*, 2004; Borba *et al.*, 2005). Assim, em animais susceptíveis, ao serem inoculados com isolado virulento, apresentaram evolução letal, disseminação de fungos nos tecidos, granulomas não organizados, resposta de hipersensibilidade tardia pobre, anergia, ativação pobre e precoce de macrófago, diminuição da resposta de IgM a hemácias de carneiro, ativação policlonal de linfócitos B e altos títulos de anticorpos IgG3 proeminentes de *P. brasiliensis*. Enquanto que a inoculação dos animais com isolados não virulentos mostra curso lento e não letal da doença, granuloma organizado, ausência de fungos nos órgãos, ativação pobre e precoce de macrófago, resposta de hipersensibilidade tardia discreta, resposta IgM normal a hemácias de carneiro e baixos níveis de anticorpos IgG3 contra bandas proeminentes do fungo (Andre *et al.*, 2004; Pina *et al.*, 2006).

A importância do macrófago em infecções causadas por *P. brasiliensis* é sugerida não só pela reação entre granulomas bem formados e presença de poucos fungos, mas também por demonstração de maior atividade desta célula e pela maior gravidade da doença em ratos depletados de macrófagos por sílica e carbono coloidal (Kerr *et al.*, 1983). A ativação de macrófagos peritoneais e alveolares *in vivo* e *in vitro* por citocinas como o IFN- $\gamma$  tem sido consistentemente demonstrado pelo aumento da capacidade de destruição das leveduras e conídios (Brummer *et al.*, 1988; Calvi *et al.*, 2003). Esta destruição é mediada por altas concentrações de hidrocortisona e não é dependente de mecanismos oxidativos (Brummer *et al.*, 1988 e 1991). As observações em macrófagos peritoneais não ativados sugerem que a ingestão de conídios favorece a sua transformação em levedura, sendo o meio intracelular propício à multiplicação do fungo (Cano *et al.*, 1992).

Outra molécula chave antimicrobiana envolvida na morte de patógenos intracelulares é o NO (Bocca *et al.*, 1998; Cano *et al.*, 2000). A síntese de NO resulta da conversão de L-arginina em L-citrulina, mediada pela enzima NO sintase (NOS) através da oxidação do nitrogênio guanidínico da primeira, usando tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>),

flavina-adenina dinucleotídico (FAD) e flavina monocucleotídeo (FMN) como cofatores, além de fosfato de nicotinamida adenina (NADPH) e O<sub>2</sub> como co-substratos (Michel & Feron, 1997).

Estudos realizados por Allison e colaboradores (1978) demonstraram que o NO está relacionado com a imunossupressão mediada por macrófagos, uma vez que os macrófagos não só estimulam linfócitos T e B, mas podem também inibir as respostas imunes. Embora a produção de NO esteja envolvida na morte de *P. brasiliensis*, também está envolvida na imunossupressão, pois NO inibe a produção de TNF- $\alpha$ , e a expressão de moléculas do MHC de classe II (Bocca *et al.*, 1998; Nascimento *et al.*, 2002). Modelos experimentais de infecção por diversos patógenos sugerem que a imunossupressão observada tem a participação do NO derivado de iNOS como na listeriose (Gregory *et al.*, 1993), histoplasmose (Wu-Hsieh *et al.*, 1998), toxoplasmose (Candolfi *et al.*, 1994), tuberculose (Nabeshima *et al.*, 1999) e em infecções por *Salmonella typhimurium* (Schwacha *et al.*, 1998) e *P. brasiliensis* (Bocca *et al.*, 1998). A ativação dos macrófagos pode ser suprimida pela glicoproteína 70 (gp70) produzida pelo fungo, uma vez que a gp70 purificada foi hábil em inibir a atividade de macrófagos através de receptores de mannose e por receptores Fc, inibindo NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esses resultados indicam que gp70 pode atuar como um mecanismo de escape do fungo no estabelecimento da infecção (De Mattos Grosso *et al.*, 2003).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina pró-inflamatória crucial na defesa contra micróbios intracelulares. TNF- $\alpha$  juntamente com outra citocina, interferon gama (IFN- $\gamma$ ), aparentemente confere resistência ao fungo *P. brasiliensis*, estimulando a formação do granuloma e a produção de NO, controlando conseqüentemente a infecção (Souto *et al.*, 2000). O TNF- $\alpha$  produzido principalmente pelos macrófagos foi detectado em 25 de 30 pacientes com paracoccidiodomicose, indicando tanto a ativação de monócitos, como também, a função do TNF como imunomodulador da resposta imune, possivelmente regulando a síntese de IFN- $\gamma$  e a atividade microbicida de macrófagos (Silva & Figueiredo, 1994). Outras células imunes do hospedeiro (células dendríticas) usam o receptor do complemento tipo 3 (CR3) para regular o excesso da produção de TNF- $\alpha$  durante a remoção fisiológica de células apoptóticas, além de outras citocinas pró-inflamatórias (Morelli *et al.*, 2003). Estudos realizados por Brandhorst e colaboradores (2004) revelaram que a ligação do fator de virulência BDA1 de *Blastomyces dermatitides* ao CR3 similarmente suprime a produção de TNF- $\alpha$ , onde o fungo pode explorar o interior da célula do hospedeiro e

usar esta estratégia como meio de sobrevivência durante a interação patógeno-hospedeiro.

O papel das citocinas e quimiocinas nos últimos anos tem sido objeto de muitos estudos, tanto no homem como em animais experimentais. Em pacientes com infecções por *P. brasiliensis* foram observadas diminuição da expressão de receptores para IL-2 e produção diminuída de TNF e IFN- $\gamma$  em sobrenadantes de cultura de células mononucleares (Bava *et al.*, 1991). Considerando as observações advindas do estudo em camundongos (Hostleter *et al.*, 1993; Pina *et al.*, 2006), e mesmo na doença humana (Oliveira *et al.*, 2002) tem sido sugerido a existência de dois padrões distintos de secreção de citocinas por subpopulações Th1 e Th2 de linfócitos T e teriam relação com a evolução da doença (Benard *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2002).

Em pacientes com PCM Kurita e colaboradores (2000) revelaram a presença de IFN- $\gamma$ , GM-CSF e/ou IL-1 $\beta$  no soro dos pacientes. Estas citocinas seriam capazes de ativar os leucócitos polimorfonucleares (PMN) na infecção aguda da PCM, aumentando a atividade antifúngica destas células. Em estudos posteriores, Bernard e colaboradores (2001) demonstraram *in vitro* que as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos saudáveis quando estimuladas com gp43 de *P. brasiliensis* produziram IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-10, porém PBMC de indivíduos com PCM na forma aguda ou crônica produziram níveis baixos de IL-2 e IFN- $\gamma$ , e aumentado nível de IL-10. Esses resultados mostram uma correlação entre a síntese de IL-10 e a gravidade da PCM. Estas citocinas também são importantes na formação do granuloma. Em outros estudos Pagliari & Sotto, (2003) mostraram a participação de células Langherans na formação de granulomas de pele humana em infecção com *P. brasiliensis*. Estes autores demonstraram ainda a participação de dendrócitos dérmicos CD34<sup>+</sup> nestes granulomas. Também observaram que quanto mais organizado o granuloma maior a expressão de IFN- $\gamma$  e quanto menos organizado, maior é a expressão de IL-5 e IL-10. Assim, estes autores concluem que existe uma correlação entre granulomas bem formados e resposta imune celular, sendo que quanto mais organizado o granuloma, melhor é a resposta imune celular. Por outro lado, granulomas mal formados caracterizam uma resposta imune celular menos eficiente.

Romano e colaboradores (2003) mostraram que a cultura de células mononucleares do sangue periférico estimulados com gp43 mais IL-12 e a neutralização de IL-10 induz a síntese de IFN- $\gamma$  e a proliferação celular. Moraes-Vasconcelos *et al.*,

(2005) mostraram que IL-12, IL-23 e IFN- $\gamma$  apresentam uma importante função na imunidade protetora contra PCM. Assim, pacientes com infecção grave podem apresentar deficiência genética na síntese de IL-12/IL-23 e IFN- $\gamma$ . Por outro lado, Ramos e colaboradores (2005) mostraram a função da IL-10 na expressão diferencial de IL-12p70 e seu receptor  $\beta$ 2 em pacientes com PCM ativa ou tratada e em indivíduos infectados saudáveis. O antígeno gp43 de *P. brasiliensis* diminuiu a produção de IL-12p70 e expressão de IL-12p70R $\beta$ 2 em pacientes na fase aguda e crônica quando comparados com indivíduo saudáveis curados de PCM ou infectados e saudáveis de áreas endêmicas.

No modelo experimental com camundongos, os resultados obtidos por Kurita e colaboradores (1999) sugerem que PMN se ativados ou não com IFN- $\gamma$ , mas não por TNF- $\alpha$ , podem desempenhar função crítica na resistência do hospedeiro à infecção aguda por *P. brasiliensis*, sendo tempo dependente para desenvolver uma resposta imunológica efetiva. Godoy e colaboradores (2003) mostraram que a gp43 de *P. brasiliensis* exibe característica comum em animais susceptíveis (B10.A) e resistentes (A/Sn). Ambas as linhagens de camundongos evocaram resposta de hipersensibilidade imediata típica 24 h após a infecção. Porém, IL-4 somente foi detectada em cultura de células de linfonodos de camundongos susceptíveis duas semanas após infecção. Animais C57BL/6 deficientes em IL-4 ou depletados infectados com PCM mostraram maior resistência ao *P. brasiliensis*, com aumento na produção de TNF- $\alpha$ , IL-12 no pulmão e fígado, aumento de IgG2a e diminuição de IgG1 no soro que estão relacionados com formação de granuloma de menor tamanho e bem mais organizados (Arruda *et al.*, 2004). Esses autores sugerem que a IL-4 é dependente da genética e do *background* do hospedeiro, podendo ser protetora ou promover a doença. Assim, os resultados encontrados em humanos e em modelos animais mostram que na forma aguda da PCM, o fungo induz a uma resposta celular proliferativa aumentada com síntese elevada de IL-4, IL-5 e IL-10, e conseqüente menor resistência à infecção. Porém, na forma crônica há uma proteção contra a disseminação da doença por décadas, por meio da diminuição da resposta proliferativa, baixa concentração de IL-4, IL-5 e IL-10 e aumento da resistência à doença (Oliveira *et al.*, 2002).

Com relação às quimiocinas, vários autores têm procurado verificar em suas pesquisas a relação destes mediadores com PCM. Em pacientes infectados com *P. brasiliensis*, Fornazin e colaboradores (2003) demonstraram aumento de MIP-1,

neutrófilos e linfócitos CD8<sup>+</sup> nos lavados broncoalveolares de pacientes com PCM pulmonar. Esses autores sugerem que tanto macrófagos como as células TCD8<sup>+</sup> desempenham função importante na patogênese pulmonar na PCM. Ainda em humanos (Mamoni & Blotta, 2005) observaram que pacientes recém infectados com *P. brasiliensis* apresentavam níveis aumentados de MIG/CXCL9 e IP-10/CXCL10 quando comparados com a forma juvenil, enquanto que indivíduos com a forma crônica apresentaram IL-10/CXCL10 semelhantes aos recém infectados, porém os níveis de MIG/CXCL9 estavam significativamente aumentados.

Em camundongos infectados com *P. brasiliensis* Souto e colaboradores (2003) verificaram que IFN- $\gamma$  modula a síntese de quimiocinas e o recrutamento de leucócitos para os pulmões destes animais. Na fase aguda da infecção observaram associação entre produção de IL-8 (KC) e MIP-1 $\alpha$ /CCL3 com infiltração de neutrófilos nos pulmões e aumento simultâneo de RANTES, MCP-1, IP-10 e MIG com infiltrado de células mononucleares. Porém, na ausência de IFN- $\gamma$  foi observado aumento na produção de IL-8 e MCP-1 $\alpha$  e neutrofilia crônica. Ainda em camundongos infectados com *P. brasiliensis*, experimentos realizados por Gonzalez e colaboradores (2003) mostraram um aumento significativo de leucócitos nos pulmões no 4<sup>o</sup> dia da infecção com pico no 2<sup>o</sup> dia após o inóculo, sendo os neutrófilos as células predominantes no infiltrado. As citocinas pró-inflamatórias detectadas significativamente nesses tempos analisados foram TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e MIP-2.

Outro fator importante estudado na PCM está relacionado com a imunossupressão induzida pela doença. Assim, existe além de uma possível diminuição de população linfocitária, ao nível dos gânglios linfáticos, vários outros mecanismos que poderiam deprimir a resposta imune celular na PCM (Bava *et al.*, 1991). Jimenez-Finkel & Murphy (1988) observaram redução de células Langerhans na pele de pacientes com a doença crônica.

Outros pesquisadores encontraram, também, as seguintes alterações de subpopulações linfocitárias, que poderiam ter implicações na gênese da doença (Mota *et al.*, 1988) em pacientes não tratados como: diminuição de subpopulação CD4<sup>+</sup>, naqueles com forma crônica; aumento da subpopulação CD8<sup>+</sup> e linfócitos B (CD19<sup>+</sup>), naqueles com forma aguda, e um número maior de células CD11b em ambas as formas. Por outro lado, Teixeira e colaboradores (2001) demonstram que a redução da expressão do receptor tipo 1 do complemento em eritrócitos (CR1/E) em pacientes com PCM na

forma aguda e crônica favorece a formação de imunocomplexos e redução de células T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T.

A correlação entre antigenemia de *P. brasiliensis* circulantes, presentes na fase ativada da doença têm sido relatados na literatura (Sugizaki *et al.*, 1999) como responsáveis pela depressão da resposta imune celular, e tem sido sugerida, inclusive como possibilidade da indução de tolerância das células T.

Estudos realizados por San-Blas e colaboradores (2002) revelaram que os componentes  $\alpha$ -1,3-glicana, presentes na parede celular de *P. brasiliensis* exercem importante papel na virulência do fungo, uma vez que protege esse patógeno contra a ação de enzimas digestivas de macrófagos e neutrófilos presentes no hospedeiro. Assim, o envolvimento de glucanas presentes nas células da parede do *P. brasiliensis* parece estar relacionado com a gênese e persistência da reação inflamatória causada em infecções por este fungo (Silva *et al.*, 1994). Ainda com relação aos compostos antigênicos do fungo, Diniz e colaboradores (2004) em estudos realizados em camundongos demonstram que antígenos purificados da fração O (FO) e fração II (FII) de *P. brasiliensis* induzem resposta imune protetora caracterizada por significativa proteção por IFN- $\gamma$ , além de altos níveis de IgG1, IgG2a e IgG3, com conseqüente diminuição da formação de colônias no pulmão ou disseminação de fungo para o baço e fígado. Em cães jovens com PCM experimental houve indução de uma resposta imune humoral com síntese de IgM e IgG detectáveis nos dois primeiros meses da infecção contra a gp43 do fungo (Eisele *et al.*, 2004). Porém em *Dasyus novencinctus* naturalmente infectado com *P. brasiliensis*, a resposta imune humoral foi caracterizada por síntese de IgM e IgG contra os antígenos gp43 e gp70 deste fungo.

Devido à complexa relação entre *P. brasiliensis* – hospedeiro e a necessidade de estabelecer parâmetros imunológicos possíveis de serem usados no entendimento da imunopatogênese em PCM, várias pesquisas foram desenvolvidas para compreender os mecanismos de defesa do hospedeiro contra a infecção por *P. brasiliensis* nas últimas décadas. Atualmente, vários pesquisadores têm direcionado suas linhas de pesquisas no sentido de compreenderem as bases moleculares presentes neste fungo e encontrar concomitantemente os receptores específicos expressos na superfície de células envolvidas na PCM e as quais são críticas para iniciar de uma resposta imune. Recentemente, Silva e colaboradores (2007) avaliaram o perfil transcricional da expressão gênica de macrófagos murinos durante a infecção por *P. brasiliensis* e revelaram a expressão diferencial de genes extremamente relevantes durante a interação

patógeno-hospedeiro, especialmente aqueles que são relacionados à resposta pró-inflamatória, fagocitose, apoptose e transdução de sinais.

#### 1.4 Proteína Beta-2 Integrina

A resposta imune inata é crítica para a proteção contra infecções fúngicas, uma vez que permite uma reação imediata e reconhece uma grande variedade de microrganismos (Fogaça, 2007). Macrófagos e neutrófilos participam nessa resposta, produzindo e liberando citocinas e quimiocinas. Além disso, estas células apresentam antígenos microbianos aos linfócitos, levando ao desenvolvimento de uma resposta imune altamente específica. Para tanto, receptores são expressos na membrana celular do hospedeiro para detectar os componentes microbianos e desencadear uma via de sinalização que irá ativar a resposta imune no hospedeiro (Fernandes *et al.*, 2008).

O recrutamento de fagócitos ativados aos locais de infecção é uma das funções mais importantes da imunidade inata. Este recrutamento ocorre como parte da resposta inflamatória e é mediado pelas moléculas de adesão célula-célula que são induzidas na superfície do endotélio de vasos sanguíneos locais. Três famílias de moléculas de adesão exercem um papel central na interação leucócito-endotélio: as selectinas, as integrinas e as superfamílias de imunoglobulinas (Igs) (Jagels *et al.*, 2000; Muller & Randolph, 1999; Thompson *et al.*, 2000).

A aderência e fagocitose de células fúngicas em mecanismos de opsonização podem ser mediadas por vários receptores do complemento (CRs) dentre eles CR3 (Receptor do complemento 3), como descrito por Jiménez e colaboradores (2006). O CR3, também denominado CD11b/CD18, é uma proteína de leucócitos pertencente à família  $\beta$ 2-integrina, e compartilha a mesma subunidade beta CD18 como ocorre com outras proteínas do sistema complemento: LFA-1 (CD11a/Cd18) e CR4 (CD11c/CD18) (Melo *et al.*, 2000). Como membros típicos da família integrina, essas moléculas são glicoproteínas transmembrânicas heterodiméricas consistindo de duas sub-unidades  $\alpha$  (150 a 180 KD) e  $\beta$  (~90 KD), associadas não-covalentemente (Albelda *et al.*, 1990) (Esquema 1). Atualmente, são conhecidos dezoito tipos de subunidades  $\alpha$  e oito tipos de subunidades  $\beta$  que, combinadas, constituem pelo menos 24 integrinas já descritas (Xiong *et al.*, 2001; Tucker, 2002). O contato entre as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  envolve suas metades amino-terminais que, juntas, formam uma "cabeça" globular e as porções remanescentes formam duas caudas em formato cilíndrico que atravessam a membrana

plasmática. As duas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  apresentam um pequeno domínio transmembrânico (20 a 30 resíduos de aminoácidos) e uma região intracelular (20 a 50 resíduos de aminoácidos) (Haubner, *et al.*, 1997).

A propriedade intrínseca de vários fungos patogênicos em ativar o sistema complemento é um importante pré-requisito para uma efetiva resposta imune antifúngica. O espectro de reações imunes associadas ao complemento inclui a produção de moléculas quimiotáticas para células inflamatórias e a facilitação da fagocitose por opsonização do patógeno, que potencializam os mecanismos de defesa do hospedeiro (Morelli & Rosenberg, 1971; Speth *et al.*, 2004; Yamamura & Valdimarsson, 1977).

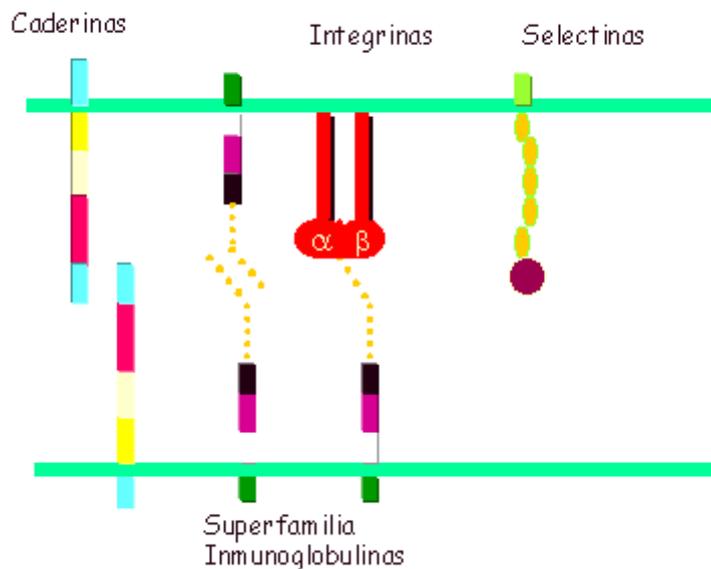
A interação inicial entre os macrófagos do hospedeiro e o fungo *P. brasiliensis* é um importante passo na patogênese da paracoccidiodomicose e é mediada por receptores e ligantes presentes na superfície do patógeno e por receptores de células do hospedeiro. Células leveduriformes de *P. brasiliensis* ativam o complemento tanto pela via clássica como pela via alternativa *in vitro* como demonstrado por Munk e colaboradores (1992), resultando na opsonização e fagocitose do fungo por macrófagos (Calich *et al.*, 1979). Munk & Da Silva (1992) mostraram que diferentes componentes do sistema complemento e seus produtos de clivagem se depositam sobre a superfície do isolado *P. brasiliensis* Pb18. A incubação de células leveduriformes de Pb18 opsonizadas com soro humano normal mostrou que este isolado ativa o complemento *in vitro* e liga C3, iC3b, C4 e C5b-9 em sua superfície. A análise microscópica mostrou padrão de distribuição uniforme desses componentes em mais de 80% das células de Pb18 pré-incubadas com soro humano normal. Assim, a deposição de produtos de clivagem do sistema complemento pode desempenhar papel importante na fagocitose do fungo (Calich *et al.*, 1979).

Estudos feitos com *Mycobacterium tuberculosis* revelam que os receptores importantes presentes nos macrófagos e que interferem na adesão da bactéria incluem os receptores do complemento (CR1, CR3 e CR4). A adesão da célula bacteriana nas células do hospedeiro envolve, no entanto, ambas as interações de opsonização e não-opsonização (Melo *et al.*, 2000). CR3 e CR4 são principalmente expressas em células de origem mielóide e participam no reconhecimento e fagocitose de uma série de patógenos dentre eles *Candida albicans*, *Bordetella pertussis*, *Francisella tularensis*, *Cryptococcus neoformans* e *Escherichia coli* (Jones *et al.*, 2008).

A importância das  $\beta 2$  integrinas em infecções resistentes é ilustrada em pacientes com deficiência de adesão de leucócitos (LAD-1), síndrome caracterizada por

infecções recorrentes, difícil processo de cicatrização e defeito na fagocitose. Mutações na subunidade  $\beta 2$ (CD18) nesses pacientes resultaram na ausência ou diminuição da expressão de LFA-1, CR3 e CR4 (Hogg *et al.*, 1999).

Outros resultados da literatura mostram que o receptor CR3 da família das  $\beta$  integrinas pode participar tanto na fagocitose dependente de opsonização como na independente desse fenômeno (Ofek *et al.*, 1995). Existem evidências de que este receptor pode se ligar a 1-3 $\beta$  glicana e mediar à fagocitose de microrganismos que possuam esse componente na parede celular (Fogaça, 2007). Além disso, estudos recentes realizados por Jimenez e colaboradores (2006) documentam, pela primeira vez, a importância dos receptores do complemento (CR3) e de manose na fagocitose de *P.brasiliensis* por macrófagos murinos e, contribuem significativamente para a compreensão de mecanismos de suscetibilidade ao fungo.



**Esquema 1:** Receptores de adesão celular. Moléculas de adesão representadas pelas caderinas, integrinas, selectinas e superfamília das imunoglobulinas. As integrinas são proteínas transmembrânicas heterodiméricas compostas de duas sub-unidades  $\alpha$  e  $\beta$ , associadas não-covalentemente (Hynes R.O, 1994).

Algumas doenças fúngicas invasivas tem sido consideradas como um sério e crescente problema de saúde, além de serem as principais causas de morte em todo o mundo. A maioria dos fungos causadores de micoses sistêmicas apresenta estreita relação com monócitos ou macrófagos nas fases iniciais da infecção ou no decorrer da doença (Fromtling & Shadomy, 1986), e esta interação é importante no processo de reconhecimento e ligação do fungo à superfície dessas células (Deepe & Bullock, 1990). Entretanto, até o momento ainda não foi descrita na literatura a importância da  $\beta 2$  integrina no curso da PCM experimental induzida, nem está bem elucidado o mecanismo de interação entre o fungo e receptor de fagócitos ( $\beta$ -2 integrina) como mediador do processo de fagocitose de *P. brasiliensis*. Assim, este estudo utilizando modelos murinos para a PCM experimental permitiu o conhecimento da importância desses receptores no desenvolvimento da infecção.

## *II – Objetivos*

## OBJETIVO

Investigar a participação das  $\beta$ -2 integrinas no processo inflamatório durante o curso da PCM.

**Metas:** Utilizar camundongos C57BL/6 (WT) e geneticamente modificados para a  $\beta$ -2 integrina ( $\beta 2^{-/-}$ ) infectados ou não com *P. brasiliensis* para determinar os seguintes fatores:

1. Capacidade dos macrófagos peritoneais dos animais WT e  $\beta 2^{-/-}$  em fagocitose *in vitro* de leveduras *P. brasiliensis* opsonizados com soro fresco ou inativo.
2. Unidades Formadoras de Colônias (CFU) no tecido pulmonar;
3. A análise histopatológica e a histocitometria de tecidos como fígado e pulmão;
4. A capacidade proliferativa de linfócitos do baço dos animais WT e  $\beta 2^{-/-}$  estimulados com Concanavalina A (ConA) e extrato protéico da parede celular do fungo *P. brasiliensis*.
5. Os níveis de óxido nítrico (no soro).
6. Os níveis de anticorpos no soro.
7. Os níveis de citocinas produzidas em sobrenadantes de linfócitos (IFN- $\gamma$ ) e macrófagos (TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12), mensurados por ELISA.

### *III - Material e Métodos*

## MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Cultivo do fungo

Foram utilizadas leveduras do isolado virulento 18 de *P. brasiliensis* (Pb 18), provenientes do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB). Para a manutenção da virulência dos fungos utilizou-se o protocolo descrito por Nascimento e colaboradores (2002), com adaptações. Assim, preparou-se uma solução de  $5 \times 10^6$  células/mL de leveduras, que foi inoculada no peritônio de camundongos da linhagem C57BL/6. Após 2 semanas da infecção, os animais foram sacrificados e os fungos obtidos foram cultivados e usados na infecção dos animais de experimentação.

O fungo foi então cultivado em meio líquido BHI (Brain Heart Infusion: 3,7% de BHI e 0,8% de dextrose) por 5 dias a 36° C, sob agitação (220 rotações por minuto-rpm). Após agitação mecânica na presença de pérolas de vidro, os grumos das leveduras foram separados e posteriormente lavados com tampão salina fosfato estéril (PBS) 0,1M, pH 7,2. Em seguida, foram realizadas as contagens das células fúngicas usando câmara Neubauer e verificado a viabilidade do fungo através da utilização do corante vital Verde Janus 0,05% (Merck, Germany) como descrito na literatura (Dias *et al*, 2004). A concentração das células foram ajustadas para  $1 \times 10^7$  leveduras viáveis/mL em PBS estéril, e as células fúngicas utilizadas para infecção.

### 3.2 Animais experimentais e infecção

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas, com idade de 6 a 12 semanas, da linhagem C57BL/6, os quais apresentam uma susceptibilidade intermediária à infecção por *P. brasiliensis* (Vaz *et al*, 1992) e também animais dessa mesma linhagem geneticamente deficientes da  $\beta_2$ -integrina, produzidos por *Jackson Laboratories* (Bar Harbor, ME). Ambos os grupos experimentais foram obtidos do Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

Para a realização dos ensaios, camundongos foram separados em três grupos experimentais: 1. camundongos não infectados (grupo controle); 2. camundongos C57BL/6 (WT) infectados com o isolado Pb18 do fungo *P. brasiliensis*; 3. camundongos *knockout* para  $\beta_2$ -integrina ( $\beta_2^{-/-}$ ), infectados com Pb18 de *P. brasiliensis*.

Após a infecção, os camundongos foram mantidos no Biotério da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília (UnB), em condições apropriadas de fornecimento de água e ração *ad libitum*. Os procedimentos experimentais adotados foram aprovados pelo Comitê de Ética no uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (Anexo I).

### **3.3. Coleta do sangue, pulmões, fígado e o baço dos camundongos**

Após 15, 30 e 60 dias de infecção, quatro camundongos de cada grupo foram aleatoriamente selecionados, anestesiados com Ketamina (Agener União, Guaçu, São Paulo, Brasil) e Xilazina (Coopers Brasil Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) nas concentrações 80 mg/Kg de Ketamina para 10 mg/Kg de Xilazina, e administrado via intraperitoneal. O sangue dos animais dos grupos experimentais foi coletado pela via plexo venoso retro-orbital e estocado em eppendorfs de 1,5 mL, deixado em repouso por 3 h e em seguida centrifugado a 2000 rpm por 5 min. Os soros foram colhidos, transferidos para novos eppendorfs e armazenados a -20°C até o momento das dosagens de NO<sub>3</sub> e anticorpos.

Os animais foram sacrificados por meio de uma overdose de anestésico para a retirada dos órgãos como o pulmão e o fígado para realização das análises histopatológicas, morfométricas e Unidade Formadora de Colônia (CFU). O baço foi utilizado para realização dos ensaios de proliferação de esplenócitos totais.

### **3.4. Cultura de macrófagos recuperados de camundongos infectados**

Camundongos infectados de ambos os grupos experimentais e do grupo controle foram injetados intraperitonealmente com 1,5 mL de tioglicolato a 3% estéril (BioBás, Brasil) nos dias 15, 30 e 60 após infecção. Após 72 h do tratamento, os animais foram sacrificados conforme descrito anteriormente e feita a lavagem intraperitoneal com 10 mL de PBS estéril para obtenção dos macrófagos peritoneais. As células foram centrifugadas a 2500 rpm, por 5 min., com temperatura entre 8 e 10°C e suspensas em meio RPMI 1640 (Sigma) incompleto. As células viáveis foram contadas na câmara de Neubauer e diluídas a uma concentração de  $3 \times 10^6$  células/mL em meio RPMI incompleto; posteriormente as células foram distribuídas em uma placa de 24 orifícios (Corning 3524) em uma quantidade de 500 µL/poço e incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37°C por 45 min. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado para remover as células

não aderentes e as culturas foram novamente incubadas com meio RPMI 1640 suplementado com 4% soro bovino fetal, 2 mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina/estreptomicina e 1 mM HEPES em volume de 1,5 mL/poço. As culturas de células foram estimuladas com interferon-gama/lipopolissacarídeo de *E. coli* (IFN- $\gamma$ /LPS) na concentração de 100 U/mL de IFN- $\gamma$  (Sigma) + 1  $\mu$ g/mL de LPS (Sigma, USA.) por um período de 48 h. O extrato protéico da parede celular do isolado Pb 18 obtido de *P. brasiliensis* diluído em 1000 vezes também foi usado como estímulo para as culturas em igual período. Os sobrenadantes foram estocados a -20°C até o momento da quantificação das citocinas.

### **3.5. Análise *in vitro* da capacidade fagocítica de macrófagos murinos com leveduras de *P. brasiliensis***

Macrófagos peritoneais obtidos de camundongos normais através da lavagem com PBS foram mantidos em gelo até o momento de serem infectadas. As leveduras de *P. brasiliensis* utilizadas na infecção dos macrófagos foram ressuspensas em meio RPMI suplementado com HEPES 20 mM, bicarbonato de sódio 1,5 g/L contendo 20% de soro fresco de camundongos Balb/c e incubadas por 30 min. para opsonização. Em seguida, os macrófagos estocados foram co-cultivados com as leveduras de Pb 18 nos tempos de 24, 48 e 72 h de duas maneiras: 1) os macrófagos ( $5 \times 10^5$ /poço) foram colocados em microplacas de 24 poços na presença de  $1 \times 10^5$  células do fungo/mL; 2) os macrófagos ( $2 \times 10^7$  células/frasco) foram colocados em frascos de cultura de células de 150 cm<sup>2</sup> e infectados com  $4 \times 10^6$  leveduras do fungo/mL. Em ambos os casos, a proporção de levedura por macrófago foi de 1:5. As co-culturas foram então incubadas a 37°C em atmosfera de ar umidificada contendo 5% CO<sub>2</sub>.

Após 24, 48 e 72 h da infecção dos macrófagos com as leveduras de *P. brasiliensis*, as células foram lavadas com meio RPMI pré-aquecido a 37°C a fim de retirar as leveduras presentes no meio extracelular ou fracamente aderidas aos macrófagos. Após cada período citado anteriormente, as células foram submetidas a diversas lavagens com água destilada estéril. Este processo permitiu que os macrófagos fossem removidos da placa e lisados, com consequente liberação dos fungos eventualmente fagocitados (Fogaça, 2007). O material obtido a partir das lavagens com água destilada foi centrifugado e ressuspensso novamente em água destilada. Em seguida, 100  $\mu$ L das suspensões fúngicas em água destilada foram semeados em três

placas contendo meio de cultura (BHI - Brain Heart Infusion, Difco, Detroit, MI), suplementado com 5% do filtrado de sobrenadante de cultura do isolado Pb 192 de *P. brasiliensis* em meio líquido suplementado com glicose (dextrose); 4% de soro de cavalo e 40 mg/L de gentamicina. A suspensão foi semeada com auxílio de bastões de vidro em forma de L, por toda a superfície do meio de cultura. A seguir, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 14 dias, e as unidades formadoras de colônias foram contadas. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada tempo.

### **3.6. Recuperação e quantificação do fungo no pulmão**

A evolução da doença nos animais foi analisada por meio dos ensaios histopatológicos e pela recuperação de carga fúngica dos pulmões. Fragmentos de pulmão foram obtidos de cada camundongo dos grupos experimentais (4 animais por grupo), pesados e dilacerados em maceradores de vidro (homogenizadores de tecidos) contendo 1 mL de PBS estéril. 100 µl destes tecidos macerados foram semeados em placas de Petri contendo meio BHI estéril (Brain Heart Infusion, Difco, Detroit, MI), enriquecido com 5% do filtrado de sobrenadante de cultura do isolado Pb 192 de *P. brasiliensis* em meio líquido suplementado com glicose (dextrose); 4% de soro de cavalo e 40 mg/L de gentamicina. As placas com os macerados foram incubadas a 37°C por 21 dias, em seguida as unidades formadoras de colônias (CFU) foram contadas (Cano *et al.*, 1995; Pina *et al.*, 2006). Os resultados foram expressos em CFU/g de pulmão.

### **3.7. Análise histológica do fígado e pulmão**

Fragmentos de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup> de um dos lobos dos pulmões e de tecidos do fígado foram coletados e fixados em solução de tampão fosfato com formol a 10% durante 6 h e, em seguida foram desidratados em álcool 70% e clarificados em xilol. Os órgãos foram inclusos em blocos de parafina e realizados cortes de 5 µm de espessuras, utilizando um micrótomo. Os cortes foram dispostos em lâminas e incubados a 58-60°C para fixação. Em seguida, foram lavados em xilol para retirar o excesso de parafina e reidratados com concentrações decrescentes de álcool (do absoluto ao 80%). Os cortes fixados foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E), desidratados com álcool em concentrações crescentes (80% ao absoluto), lavados com

xilol e cobertos com lamínula. As lâminas coradas com H&E foram analisadas através de Microscopia Óptica (M.O) para observação das lesões granulomatosas e presença de fungo.

### **3.8. Análise morfométrica do fígado e pulmão**

Para a análise morfométrica, foram utilizados os cortes mencionados no item 3.7 corados com H&E. Foram utilizados 4 cortes com escalonamento de 50  $\mu\text{m}$  entre si. Todas as lâminas analisadas foram usadas na avaliação do tamanho da lesão granulomatosa, número de granulomas e de fungos por  $\text{mm}^2$ . As análises foram feitas utilizando-se o sistema analisador de imagens (Image-Pro Plus Versão 5.1.0.20 Copyright 1993-2004 - Media Cybernetics, Inc.) na magnitude de 100  $\mu\text{m}$ .

### **3.9. Ensaio de proliferação dos esplenócitos**

Após o sacrifício dos animais, os baços foram coletados e divulsionados com auxílio de pinças, tipo dente de rato, para obtenção de esplenócitos totais. Os baços foram divulsionados em placas de Petri contendo 2 mL de meio RPMI 1640 (Life Technologies Inc., Bethesda, MD) suplementado com 2 mM de L-glutamina, 1mM de piruvato de sódio, 1% de aminoácidos não essenciais (Sigma, USA), 2mM de 2-mercaptoethanol, 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de gentamicina e 5% de soro bovino fetal (SBF) inativado. A suspensão celular de todos os animais de cada grupo foi colocada em tubos plásticos para a sedimentação das estruturas do baço durante 5 min. Os sobrenadantes com as células foram centrifugados a 3000 rpm por 10 min a 4°C e posteriormente os esplenócitos foram lavados mais 2 x e foram ressuspensos em meio RPMI simples (volume de 1 mL/animal) e as células contadas na câmara de Neubauer. A concentração celular de cada grupo de animais foi acertada para  $3,6 \times 10^6$  células/mL em RPMI suplementado como descrito anteriormente e 100  $\mu\text{L}$  das suspensões celulares foram colocadas em triplicatas em poços de placa de 96 orifícios de fundo chato (Corning Glass Work, Corning, NY). Às células de cada grupo de animal foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de RPMI contendo o estímulo positivo Concanavalina-A na concentração de 0,4  $\mu\text{g}/\text{poço}$  (Sigma) ou extrato protéico da parede celular de *P. brasiliensis* (antígeno específico) numa proporção de diluição de 500 e 1000 x . Como controle negativo foi

usado meio RPMI. As células foram em seguida incubadas por 60 h em estufa umidificada a 37°C em atmosfera de ar de 5% CO<sub>2</sub>.

Doze horas antes do término da incubação, 0,5 µCi/poço (1 mCi/mL) de timidina tritiada [<sup>3</sup>H]TdR (Amersham, Arlington Heights), conforme descrito na literatura (Omarsdottir *et al.*, 2005) foi adicionada às culturas. Após 60 h de incubação, as células foram coletadas em uma membrana de filtro (Whatman, England) e a quantidade de radiação incorporada ao DNA das células em proliferação determinada por um contador de cintilação β líquida (Beckman, Packard LS Analyzer 6500), o qual expressa os resultados em contagem de pulsos por min. (cpm). Os resultados foram expressos na forma de índice de proliferação que consiste na seguinte fórmula:

$$\text{Índice proliferação} = \frac{\text{cpm linfócitos obtidos animais infectados}}{\text{cpm linfócitos obtidos dos animais normais}}$$

### 3.10. Dosagem da concentração de Óxido Nítrico

A dosagem de NO presente no soro dos camundongos infectados e não infectados foi realizada por meio da redução enzimática de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) em nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) pela enzima nitrato redutase (Schmidt *et al.*, 1989). Os soros foram diluídos na proporção de 1:5 em água destilada, aliqüotados em volumes de 50 µL e incubados, em triplicatas usando placas de 96 orifícios (Corning, USA) com o mesmo volume de tampão redutase (fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5 contendo 1 mM NADPH, 10 mM FAD e 4 U/mL de nitrato redutase) por 12 h a 37°C. A concentração de nitrito foi determinada pela reação colorimétrica de Griess - reagente de Griess composto por: NEED 0,1% [N-(1-Naphthyl)ethylenediamine - Sigma, USA] e diluído em água destilada, e sulfanilamida a 1% diluída em 5% de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) como descrito na literatura (Nascimento *et al.*, 2002). 50 µL da amostra foi misturada com 50 µL do reagente de Griess, e mantidas por 10 min, à temperatura ambiente. As amostras foram lidas em leitor de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) com filtro de 540 nm. Os resultados expressos em µM de NO<sub>3</sub> foram determinados pela comparação da D.O. (Densidade Ótica) das amostras do experimentos com a D.O. da curva padrão obtida pelo uso de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) em concentração de 100 a 0,9 de µM (Bocca *et al.*, 1999; Nascimento *et al.*, 2002).

### 3.11. Dosagem de anticorpos

Anticorpos IgG1 e IgG2a específicos anti- *P. brasiliensis* foram quantificados por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) realizados no laboratório do prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Célio Lopes Silva (USP-Ribeirão Preto, SP, Brasil). O soro dos animais, obtidos conforme descrito anteriormente foram utilizados para a dosagem dos anticorpos. Placas de 96 poços de poliestireno (Maxisorp Nunc-Immuno Plates, USA) foram sensibilizadas com 100 µL/poço do extrato protéico da parede do fungo *P. brasiliensis* na diluição de 1:50, e incubadas a 4°C por 12 h. Posteriormente as placas foram lavadas com PBS 1X contendo 0,05% de Tween-20 e bloqueadas com 200 µL/poço de uma solução PBS 1x + 10% SBF e 0,05% Tween-20. Após incubação por 1 h, a 37°C, as placas foram novamente lavadas e adicionou-se 100 µL/poço dos soros, nas diluições 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000, em solução de bloqueio. As placas foram incubadas por 2 h a 37°C, e após lavagem das mesmas, foi realizada incubação por 1 h, a 37°C, com anticorpo monoclonal anti-IgG1 (A85-1) ou anti-IgG2a (R19-15) conjugados com biotina (BD PharMingen), adicionando-se 100 µL/poço do anticorpo diluído 1:1000 em solução de bloqueio. Após procedimento de lavagem, foi adicionada 100 µL/poço da solução de avidina biotina peroxidase StrepAB kit<sup>TM</sup> (Dako) sendo incubada por 30 min a temperatura ambiente. As placas foram reveladas pela adição da solução de OPD (Sigma) e a reação foi interrompida pela adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico 16%. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro de placa (µQuant Bio-Tek Instruments Inc.) a 490 nm.

### 3.12. Quantificação de citocinas

Após o sacrifício dos animais, os sobrenadantes de esplenócitos do baço ou de macrófagos peritoneais estocados a -20°C foram utilizados para dosagem das citocinas secretadas. As dosagens foram realizadas pelo método imunoenzimático (ELISA), utilizando kits comerciais padronizados para cada grupo de citocinas (BD Biosciences, San Diego, CA). Os sobrenadantes de esplenócitos foram utilizados para quantificar os níveis de interferon gama (IFN- $\gamma$ ). As citocinas fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 10 (IL-10), interleucina 12 (IL-12) foram dosadas em sobrenadante de

macrófagos da cavidade peritoneal. As concentrações para cada citocina foram calculadas com base em uma curva padrão específica para cada uma e realizadas conforme instruções fornecidas pelo fabricante (BD Biosciences, San Diego, CA).

### **3.13. 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 significantes quando  $p < 0,05$ .

## *IV- Resultados*

## RESULTADOS

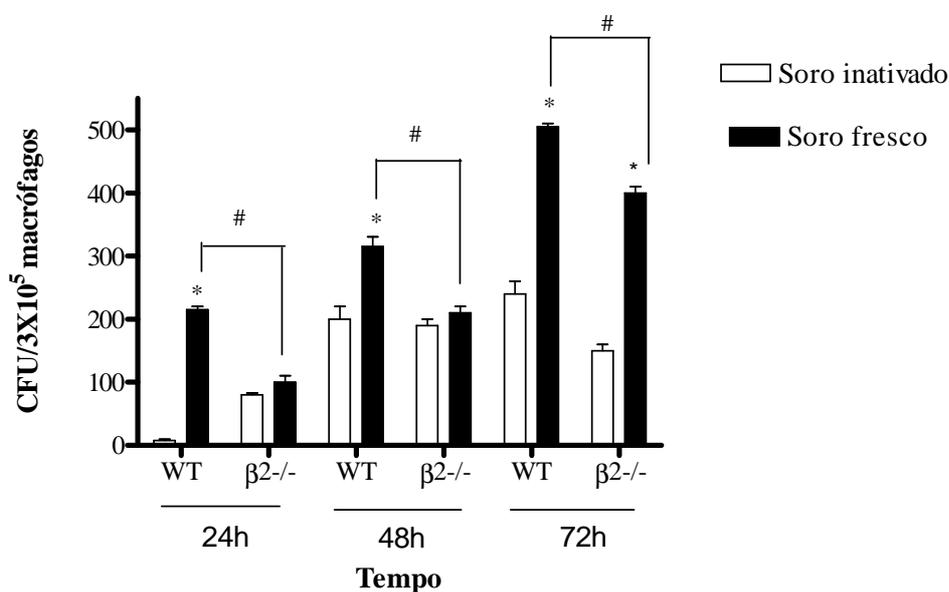
### 4.1. Macrófagos obtidos de camundongos $\beta 2^{-/-}$ , *in vitro*, apresentaram menor atividade fagocítica de leveduras de *P. brasiliensis* quando comparados com macrófagos de camundongos selvagens

A cinética de fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis* por macrófagos foi avaliada em camundongos WT e  $\beta 2^{-/-}$ , respectivamente. Os resultados encontrados demonstraram que macrófagos tanto dos camundongos WT como dos  $\beta 2^{-/-}$  apresentaram fagocitose eficiente, porém a fagocitose foi melhor quando as leveduras de Pb18 foram previamente opsonizadas com soro fresco do que com soro inativado. Macrófagos obtidos de camundongos WT apresentaram maior capacidade de internalização do que macrófagos obtidos de camundongos  $\beta 2^{-/-}$  em todos os tempos analisados (dados não mostrados). A viabilidade dos fungos fagocitados em ambas as linhagens de macrófagos foi avaliada pela determinação das unidades formadoras de colônias (CFUs). Os resultados obtidos (Fig. 1) demonstraram que as CFUs resultantes dos camundongos WT aumentaram significativamente após 24 h, quando os macrófagos foram co-cultivados com leveduras opsonizadas com soro inativado e soro fresco; porém, foi significativamente maior quando as leveduras foram opsonizadas com soro fresco em todos os tempos avaliados. CFUs também foram observadas em lisados de macrófagos obtidos de camundongos  $\beta 2^{-/-}$ . Nos camundongos  $\beta 2^{-/-}$  o número de CFUs observadas foram maiores nos lisados de macrófagos co-cultivados com leveduras opsonizadas tanto com soro fresco quanto com soro inativado, exceto 72h, onde o número de CFUs obtidos de macrófagos com leveduras opsonizados com soro fresco foi significativamente maior quando comparadas com leveduras opsonizados com soro inativado.

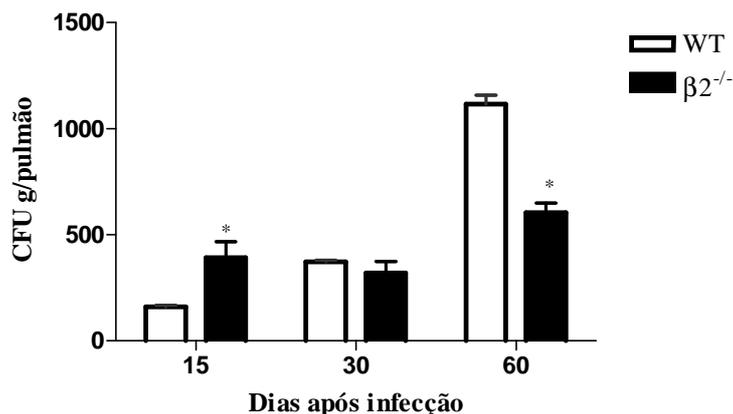
O aumento das CFUs obtidas nos animais WT podem refletir tanto uma maior internalização dos fungos como uma maior viabilidade das células no interior dos macrófagos, porém não podemos avaliar com estes experimentos qual o mecanismos que gerou esta diminuição da CFU nos animais  $\beta 2^{-/-}$ .

#### 4.2. Camundongos $\beta 2^{-/-}$ são mais resistentes às infecções por *P. brasiliensis* à medida que a doença evolui para a fase crônica

Os camundongos WT apresentaram aumento progressivo de unidades de colônias fúngicas de modo tempo dependente (Fig. 2). Os resultados demonstram que camundongos  $\beta 2^{-/-}$  são mais susceptíveis ao *P. brasiliensis* nos primeiros 15 dias após infecção, durante a fase aguda da PCM murina. Porém, à medida que o processo inflamatório se torna crônico os camundongos  $\beta 2^{-/-}$  tornam-se mais resistentes à PCM como demonstrado nos 30 e 60 dias após a infecção. A maior resistência foi significativamente demonstrada quando a carga fúngica recuperada dos camundongos  $\beta 2^{-/-}$  foi comparada com aquela dos camundongos WT. A análise das CFUs também foi realizada nos tecidos dos fígados dos camundongos WT e  $\beta 2^{-/-}$  nos 15, 30 e 60 dias após a infecção (dados não mostrados), porém somente foram recuperados fungos nos tecidos nesse órgão até o 30º dia após infecção.



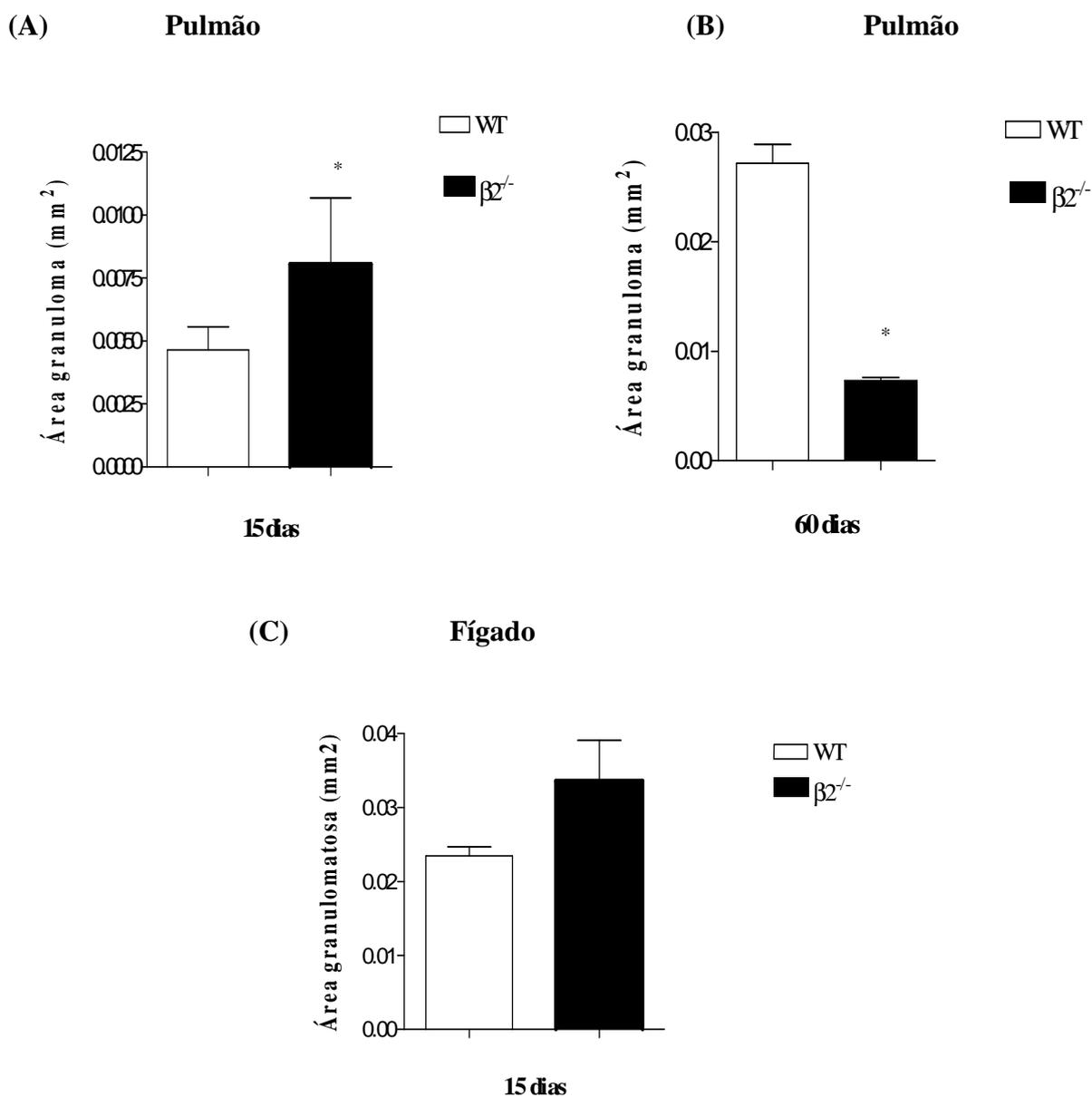
**Figura 1:** Análise da capacidade fagocítica de macrófagos *in vitro* e recuperação de carga fúngica, pelas unidades formadoras de colônias (CFUs) a partir de macrófagos peritoneais de camundongos WT e  $\beta 2^{-/-}$ . Os macrófagos foram co-cultivados com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18) opsonizados com soros inativados e soro fresco de camundongo Balb/c, na proporção de 1:5. Os ensaios foram realizados em duplicata para um grupo de quatro animais por ponto. Os dados foram expressos em média e erro padrão (n = 8). Resultados são representativos de dois experimentos independentes. \*p<0,05, representa diferença estatística significativa entre capacidade fagocítica de macrófagos obtidos de camundongos WT e  $\beta 2^{-/-}$  usando leveduras de Pb18 opsonizados com soro fresco e soro inativado; #p<0,05 entre CFUs obtidos de lisados de macrófagos com leveduras de Pb18 fagocitados.



**Figura 2:** Carga fúngica recuperadas de pulmões de camundongos WT e  $\beta 2^{-/-}$  infectados com  $1 \times 10^6$  leveduras de *P. brasiliensis* por via endovenosa. Os animais foram sacrificados 15, 30 e 60 dias após infecção e determinado o número de unidades formadoras de colônias (CFU) no tecido pulmonar. Os ensaios foram realizados em duplicata para um grupo de quatro animais por ponto. Os dados foram expressos como média e erro padrão ( $n = 8$ ). Resultados são representativos de dois experimentos independentes. \* $p < 0,05$  representa diferença estatística significativa entre WT x  $\beta 2^{-/-}$ .

#### 4.3. Infecções com *P. brasiliensis* induziram formação de lesões granulomatosas maiores no início da infecção em camundongos $\beta 2^{-/-}$ nos pulmões e no fígado

A extensão das áreas pulmonares e do fígado comprometidas por lesões granulomatosas foi analisada em cortes de tecidos dos pulmões obtidas dos camundongos WT e  $\beta 2^{-/-}$  após 15 e 60 dias de infecção com *P. brasiliensis* (Fig. 3 A e B) e em cortes de tecido do fígado (Fig. 3 C) 15 dias após infecção. Os resultados mostram que camundongos  $\beta 2^{-/-}$  apresentaram área granulomatosa significativamente maior no 15º dia analisado, quando comparados com camundongos WT. No 60º dia após infecção esses resultados se invertem, e a área granulomatosa observada em pulmões de animais  $\beta 2^{-/-}$  foi reduzida para menos da metade na fase crônica se comparados aos camundongos WT. As áreas granulomatosas no fígado não apresentaram diferença estatística entre os camundongos  $\beta 2^{-/-}$  e os camundongos WT (Fig. 3C).

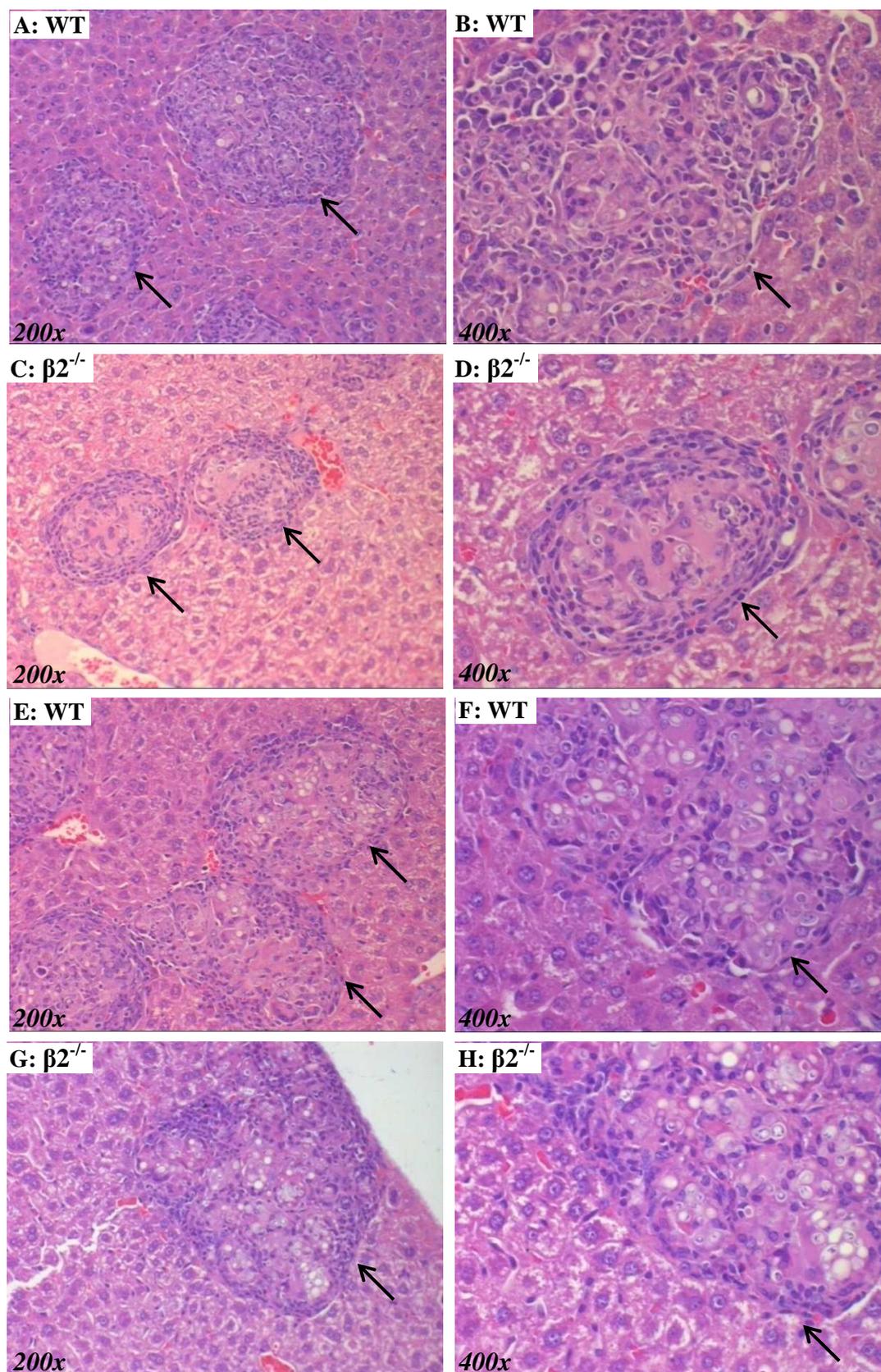


**Figura 3:** Análise morfométrica dos granulomas induzidos pelo *P. brasiliensis*. Fragmentos de tecidos dos fígados e dos pulmões com lesões granulomatosas foram obtidos de camundongos WT e  $\beta 2^{-/-}$  infectados com *P. brasiliensis* nos 15 e 60 dias após infecção. Cortes de 4  $\mu$ m, coradas pela Hematoxilina & Eosina (H&E) foram usados para a análise morfométrica. As medidas foram obtidas usando o software *Image Pro-Plus*. Os ensaios foram realizados em duplicata para um grupo de quatro animais por ponto. Os dados foram expressos como média e erro padrão (n = 8). Resultados são representativos de dois experimentos independentes. \*p < 0,05 representa diferença estatística significativa entre WT x  $\beta 2^{-/-}$ .

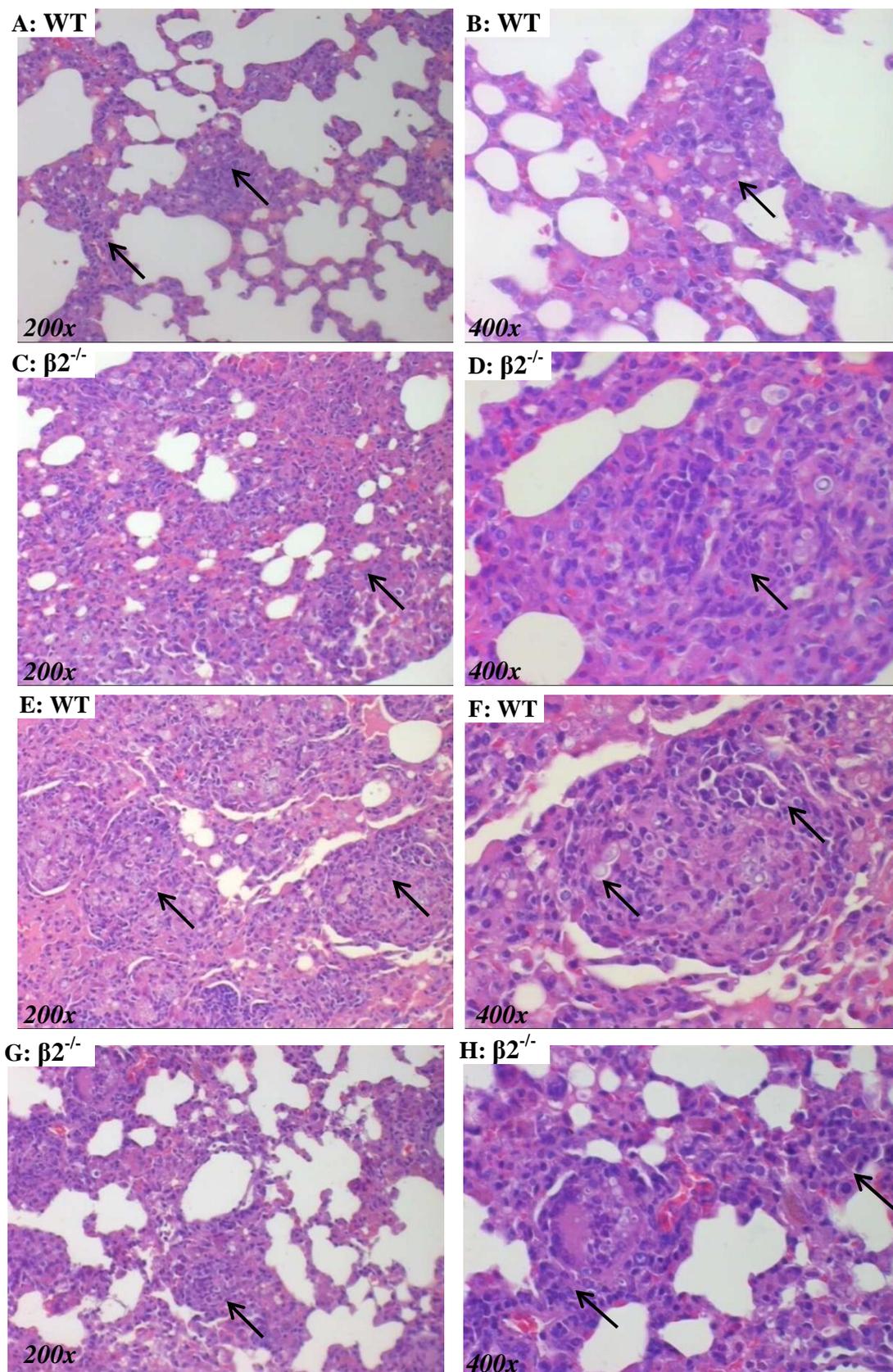
**4.4. *P. brasiliensis* induziu a formação de granulomas no fígado de camundongos  $\beta 2^{-/-}$  de menor tamanho (na fase aguda e crônica) do que no fígado de camundongos WT. Nos pulmões, os tamanhos das lesões granulomatosas aumentaram com a evolução da infecção de aguda para crônica**

A análise histopatológica do fígado e pulmões dos camundongos WT e  $\beta 2^{-/-}$  infectados via endovenosa com leveduras de *P. brasiliensis*, resultou na formação de granulomas que aumentaram progressivamente (Fig.4 e Fig. 5). Em ambos os órgãos analisados foram demonstradas múltiplas lesões com tamanhos variados, compostas por células do sistema mononuclear fagocitário, com a presença de células gigantes e um intenso infiltrado linfocitário. No tempo de 15 dias após infecção, os camundongos WT apresentaram granulomas bem formados e com presença de células gigantes no tecido do fígado (Fig. 4 A e B). Em camundongos  $\beta 2^{-/-}$ , os granulomas encontrados foram menores quando comparados com camundongos WT (Fig. 4 C e D). À medida que a infecção evoluiu para a fase crônica, as lesões granulomatosas aumentam de tamanho, tornando-se mais compactas e com maior organização celular tanto nos camundongos WT como nos  $\beta 2^{-/-}$ , porém, de maior tamanho nos animais WT (Fig. 4 E, F, G e H).

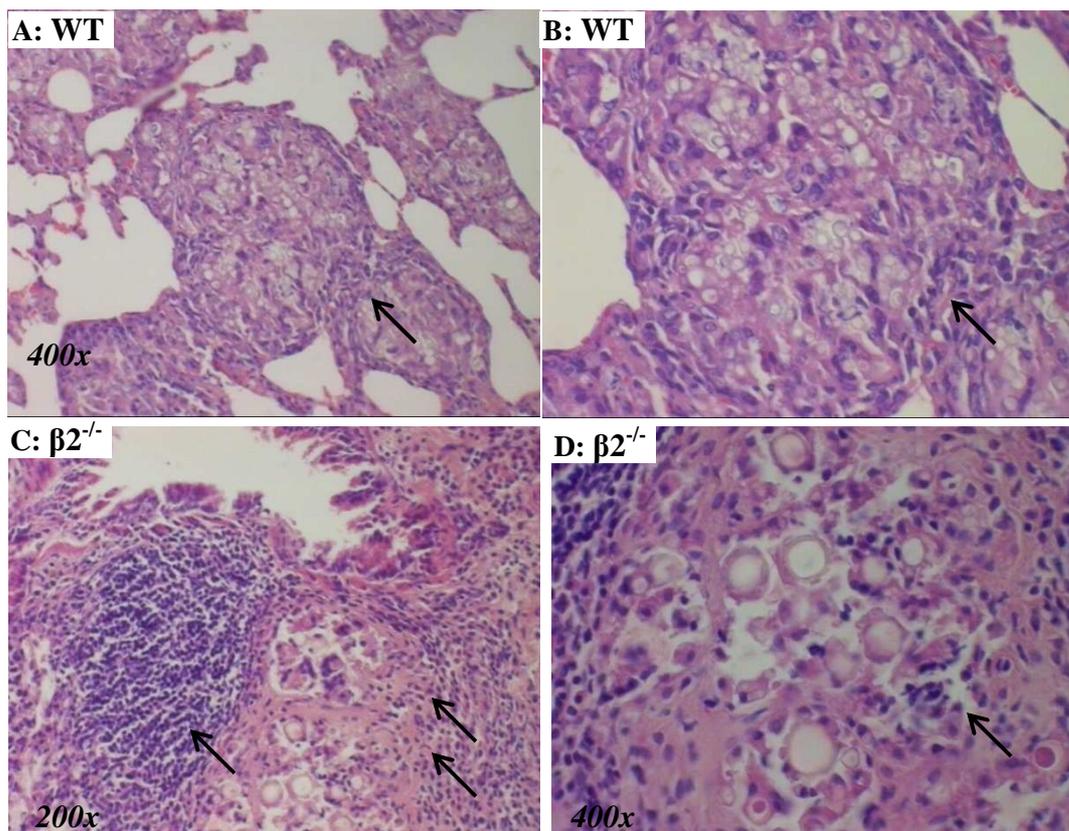
Nos pulmões dos camundongos  $\beta 2^{-/-}$  (Fig. 5) no 15º dia após infecção, a lesão granulomatosa foi intensa e caracterizada por redução dos espaços alveolares, com infiltrado linfocitário acentuado e grande quantidade de fungos nas lesões. Entretanto, nos camundongos WT os granulomas foram menores, pouco organizados, com intenso infiltrado linfocitário e com grande quantidade de fungos no interior de células gigantes (Fig. 5 A, B, C e D). Com a cronificação da doença as lesões granulomatosas tornaram-se mais compactas e bem formadas tanto nos camundongos WT como nos  $\beta 2^{-/-}$  como observado no 30º dia após infecção (Fig. 5 E, F, G e H). No 60º dia após infecção, as lesões eram compactas e completamente formadas com tecido organizado e caracterizadas por pouco espaço alveolar e presença de muito fungo nas lesões nos camundongos WT (Fig. 6 A e B). Nos camundongos  $\beta 2^{-/-}$  foi também observado intenso infiltrado de células mononucleares e um agregado linfocitário (Fig. 6 C e D).



**Figura 4:** Fotomicrografias dos fígados dos camundongos WT (Fig. 4 A, B, E e F) e de camundongos  $\beta 2^{-/-}$  (Fig. 4 C, D, G e H) nos dias 15 (A-D) e 30 (E-H) após infecção via endovenosa com  $1 \times 10^6$  leveduras do *P. brasiliensis*. Nos cortes dos fígados são mostradas lesões granulomatosas de diferentes tamanhos, compactas, com processo inflamatório e presença de fungos. As imagens à esquerda apresentam uma magnitude de 200X e à direita de 400X. Coloração: Hematoxilina e Eosina.



**Figura 5:** Fotomicrografias dos pulmões dos camundongos WT (Fig. 5 A, B, E e F,) e de camundongos  $\beta 2^{-/-}$  (Fig. 5 C, D, G e H) no 15<sup>o</sup> (A-D) e 30<sup>o</sup> (E-H) dia após infecção via endovenosa com  $1 \times 10^6$  leveduras do *P. brasiliensis*. Nos cortes dos pulmões são demonstradas lesões granulomatosas de diferentes tamanhos, compactos, com processo inflamatório e presença de fungos. As imagens à esquerda apresentam uma magnitude de 200X e à direita de 400X. Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E).

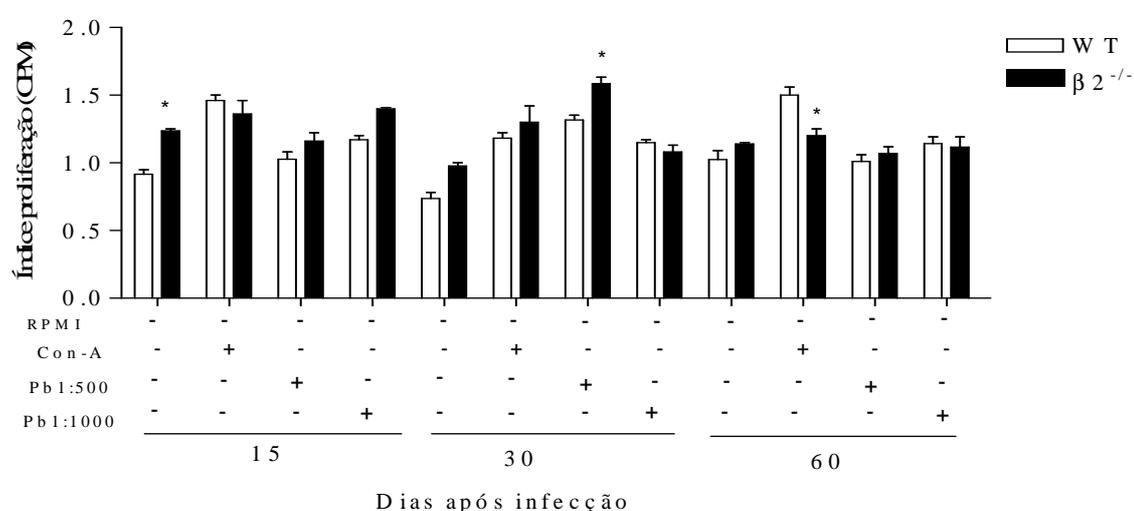


**Figura 6:** Fotomicrografias dos pulmões dos camundongos WT (Fig. 6 A e B) e de camundongos  $\beta 2^{-/-}$  (Fig. 6 C e D) no 60º dia após infecção via endovenosa com  $1 \times 10^6$  leveduras do *P. brasiliensis*. Nos cortes dos pulmões são demonstradas lesões granulomatosas de diferentes tamanhos, compactos, com processo inflamatório e presença de fungos. As imagens à esquerda apresentam uma magnitude de 200X e à direita de 400X. Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E).

#### **6. Esplenócitos obtidos de camundongos $\beta 2^{-/-}$ apresentaram maior capacidade proliferativa quando estimulados com extrato protéico de *P. brasiliensis* na fase aguda da infecção**

A figura 6 mostra o índice de proliferação de linfócitos T obtidos de camundongos WT e  $\beta 2^{-/-}$  infectados com leveduras de *P. brasiliensis* e sacrificados 15, 30 e 60 dias após infecção. Os resultados obtidos mostram que no ponto 60 dias após infecção, os esplenócitos obtidos de camundongos WT após estimulação *in vitro* com Con-A, apresentaram uma resposta proliferativa significativa maior, quando comparado  $\beta 2^{-/-}$ . Porém, os linfócitos obtidos de  $\beta 2^{-/-}$  cultivados e estimulados com o extrato

protéico do fungo *P. brasiliensis* na concentração de 1:500 apresentaram significativa proliferação no 30º dia após infecção, quando comparados com camundongos WT. No entanto, não houve diferença estatística significativa quanto ao índice de linfoproliferação entre os camundongos WT e  $\beta 2^{-/-}$ , quando os esplenócitos foram estimulados com extrato protéico de *P. brasiliensis* na concentração de 1:1000, embora no 15º dia após infecção houvesse uma tendência de maior proliferação dos linfócitos obtidos de camundongos  $\beta 2^{-/-}$ .

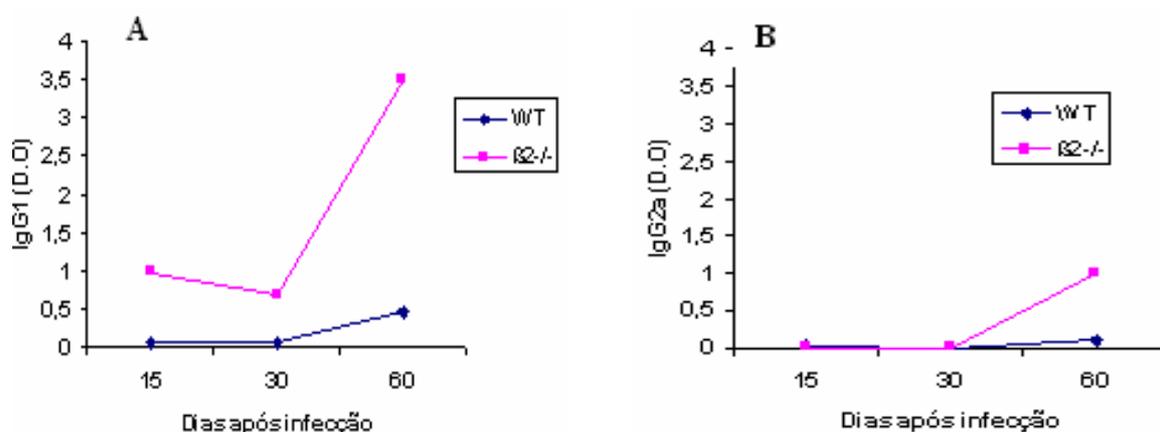


**Figura 6:** Análise proliferativa de esplenócitos obtidos de camundongos WT e  $\beta 2^{-/-}$  infectados via endovenosa de  $1 \times 10^6$  leveduras *P. brasiliensis*. As culturas de linfócitos foram estimuladas *in vitro* com RPMI, Con-A, Pb18 na diluição de 1:500 e Pb18 e 1:1000 após 15, 30 e 60 dias de infecção. Os ensaios foram realizados em duplicata para um grupo de quatro animais por ponto. Os dados foram expressos em média e erro padrão (n = 8). Resultados são representativos de dois experimentos independentes. \* $p < 0,05$  representa diferença estatística significativa entre WT x  $\beta 2^{-/-}$ .

## 7. Camundongos $\beta 2^{-/-}$ sintetizaram níveis significativos de IgG1 e IgG2a específicos em resposta à infecção por *P. brasiliensis* com máximo de produção detectado na fase crônica da infecção

Para avaliar a produção de anticorpos das classes IgG1 e IgG2a específicos contra *P. brasiliensis*, estas imunoglobulinas foram quantificadas (através do ensaio de ELISA) no soros de animais WT e  $\beta 2^{-/-}$  infectados com leveduras de *P. brasiliensis*, os

quais foram analisados e comparados com animais não infectados. Níveis de anticorpos do isotipo IgG1 (figura 7A) foram significativamente maiores nos soros dos camundongos  $\beta 2^{-/-}$  quando comparados com camundongos WT nos pontos analisados, com um pico no dia 60 após infecção. Os níveis de IgG2a anti-*P. brasiliensis* aumentaram significativamente no soro dos camundongos  $\beta 2^{-/-}$  somente no dia 60 após infecção, quando comparados com camundongos WT (figura 7B). Em ambos os tempos de 15 e 30 dias da infecção os resultados obtidos foram similares e semelhantes aos valores encontrados nos animais controles (dados não mostrados).

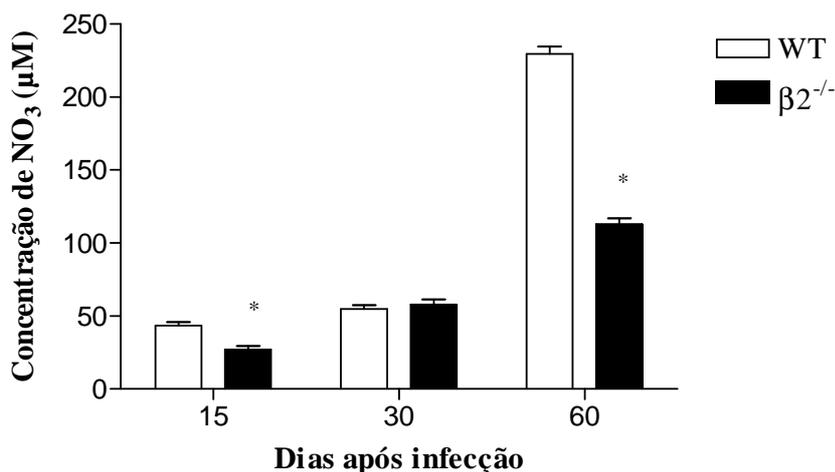


**Figura 7:** Níveis de IgG1 (Fig. 7 A) e de IgG2a (Fig. 7 B) específicos anti-*P. brasiliensis* detectados nos soros de camundongos WT e de  $\beta 2^{-/-}$  nos 15, 30 e 60 dias após infecção com  $1 \times 10^6$  leveduras de *P. brasiliensis*. Títulos de anticorpos foram expressos em densidade óptica (D.O.). Os ensaios foram realizados em duplicata para um grupo de quatro animais por ponto. Os dados foram expressos em média e erro padrão ( $n = 8$ ). Resultados são representativos de dois experimentos independentes. \* $p < 0,05$  representa diferença estatística significativa entre WT x  $\beta 2^{-/-}$ .

### 8. Camundongos $\beta 2^{-/-}$ sintetizaram menos óxido nítrico em resposta a infecção com *P. brasiliensis* quando comparadas com camundongos WT

Através da reação colorimétrica de Griess, os níveis de nitrato ( $\text{NO}_3$ ) no soro dos camundongos foram mensurados como indicadores da produção de óxido nítrico. A infecção experimental pelo *P. brasiliensis* induz produção crescente de  $\text{NO}_3$ , observados nos dias 15, 30 e 60 após a infecção tanto em camundongos WT com nos  $\beta 2^{-/-}$  (figura 8).

Os níveis de  $\text{NO}_3$  encontrados nos camundongos WT e  $\beta 2^{-/-}$  mostraram diferença significativa em 15 e 60 dias após a infecção, onde foi observada maior produção de  $\text{NO}_3$  por animais WT nestes tempos. No 30º dia após infecção, os resultados encontrados foram similares entre os dois grupos experimentais.

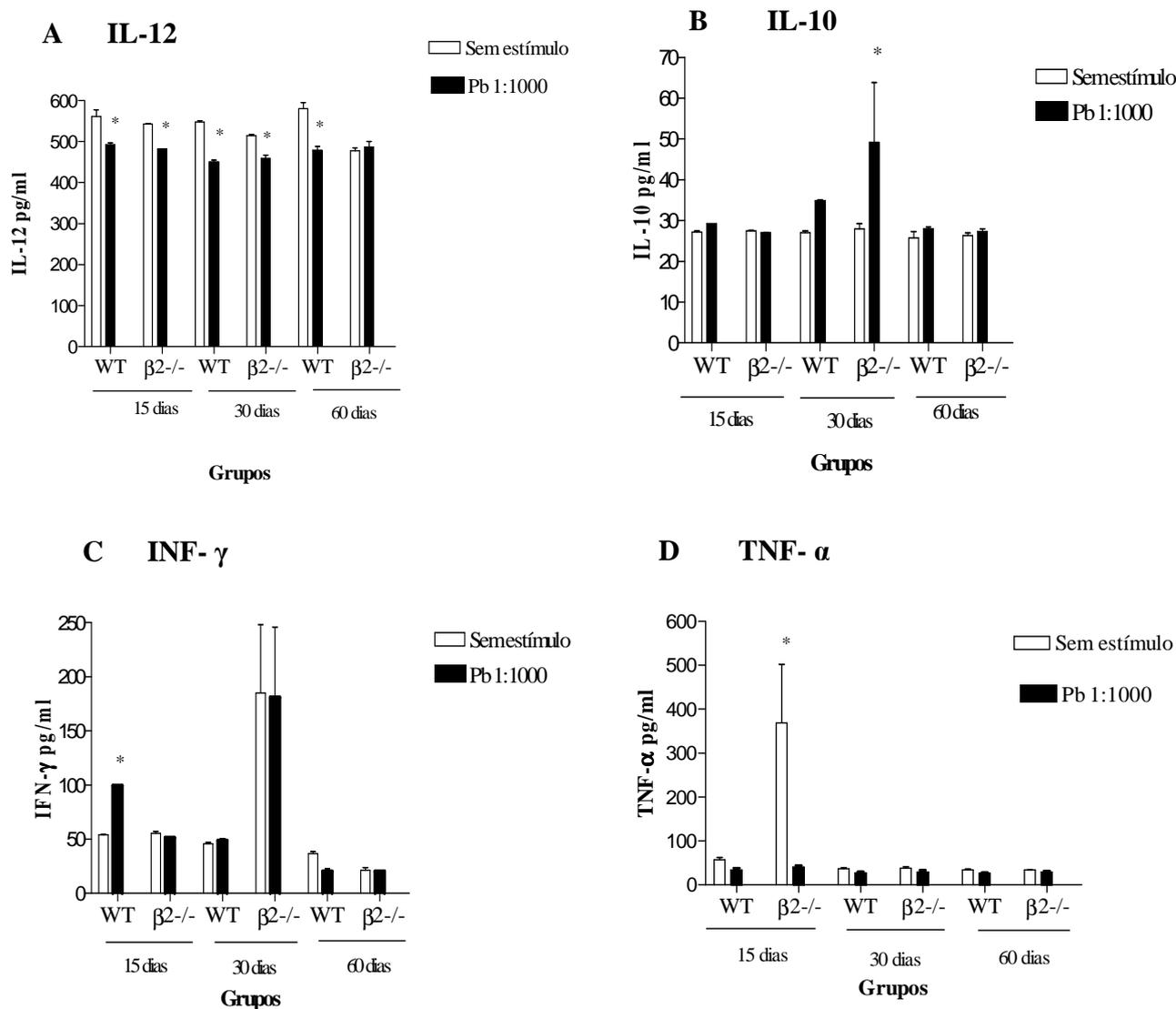


**Figura 8:** Níveis de  $\text{NO}_3$  no soro de camundongos WT e  $\beta 2^{-/-}$  inoculados por via endovenosa com  $1 \times 10^6$  leveduras de *P. brasiliensis* nos 15, 30 e 60 dias após infecção. As concentrações de  $\text{NO}$  foram mensuradas através da reação de Griess. Os ensaios foram realizados em duplicata para um grupo de quatro animais por ponto. Os dados foram expressos em média e erro padrão ( $n = 8$ ). Resultados são representativos de dois experimentos independentes. \* $p < 0,05$  representa diferença estatística significativa entre WT x  $\beta 2^{-/-}$ .

## 9. Produção de citocinas

A quantidade de citocinas produzidas no sobrenadante de cultura de células do baço ( $\text{IFN-}\gamma$ ) e de culturas de macrófagos ( $\text{TNF-}\alpha$ , IL-10 e IL-12) foi avaliada através dos ensaios de ELISA. Como demonstrado na figura 9A, houve uma produção elevada de IL-12 em ambos os grupos experimentais analisados, e o estímulo específico com antígenos de *P. brasiliensis* não aumentou esta produção. Em contrapartida, quanto a produção de IL-10 verificou-se que os níveis desta citocina foram semelhantes tanto em

animais  $\beta 2^{-/-}$  quanto nos WT, e o estímulo específico com antígenos do fungo induziu um leve aumento desta produção (figura 9B). Os animais  $\beta 2^{-/-}$  apresentaram níveis aumentados de INF- $\gamma$  30 dias após a infecção (figura 9C), porém o mesmo não ocorreu com a produção de TNF- $\alpha$ , onde a produção desta citocina manteve-se em níveis basais sem nenhum aumento ao longo da infecção (figura 9D).



**Figura 9:** Níveis de IL-12 (A), IL-10 (B), INF- $\gamma$  (C) e TNF- $\alpha$  (D) detectados por ELISA em sobrenadantes de culturas de macrófagos (Fig. 9 A, B e D) e linfócitos (Fig. 9 C) de camundongos WT e  $\beta 2^{-/-}$  inoculados por via endovenosa com  $1 \times 10^6$  leveduras de *P. brasiliensis*. Os ensaios foram realizados em duplicata para um grupo de quatro animais por ponto. Os dados foram expressos em média e erro padrão ( $n = 8$ ). Resultados são representativos de dois experimentos independentes. \* $p < 0,05$  representa diferença estatística significativa entre controles negativos vs. estímulo específico com antígenos de *P. brasiliensis* dos grupos WT e  $\beta 2^{-/-}$ .

*V - Discussão*

## DISCUSSÃO

Neste trabalho avaliamos a importância e a participação das moléculas de superfície  $\beta 2$  integrinas na PCM experimental induzida. Analisando-se a cinética de fagocitose *in vitro* de leveduras de *P. brasiliensis* opsonizados com soro inativado ou soro fresco por macrófagos murinos de camundongos  $\beta 2^{-/-}$  e WT (figura 1), nossos resultados demonstraram que os macrófagos de ambos os grupos experimentais fagocitaram melhor as leveduras opsonizadas com soro fresco. Estudos têm demonstrado que a fagocitose de células leveduriformes de *P. brasiliensis* é dependente do sistema complemento (Calish, 1979) e que a fagocitose de conídeos é mediada por mecanismos que envolvem ou não a opsonização.

A ativação do sistema complemento por fungos, tanto pela via clássica como pela alternativa, resulta na deposição de opsoninas sobre a superfície da célula fúngica, facilitando a fagocitose e a atividade fungicida das células fagocíticas. Vários trabalhos têm mostrado que a fagocitose de microrganismos como *Cryptococcus neoformans* (Kozel *et al.*, 1996, Kely *et al.*, 2005), *Candida albicans* (Gruber *et al.*, 1998; Triebel *et al.*, 2003), *Mycobacterium tuberculosis* (Hirsch *et al.*, 1994) e *Listeria monocytogenes* (Drevets *et al.*, 1996) na presença de soro humano fresco é mais eficiente do que com soro inativado, enfatizando a importância dos receptores para complemento para as células fagocitárias. 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).

Embora fosse esperado que em camundongos  $\beta 2^{-/-}$  a fagocitose por macrófagos estivesse significativamente reduzida, observamos que após o tempo de 24 h a capacidade fagocítica aumentou progressivamente. Isso nos leva a crer que o receptor CR3 do complemento pertencente à família das  $\beta$  integrinas, apesar de ser provavelmente um receptor importante, não é o único envolvido na fagocitose do fungo *P. brasiliensis*. Estudos feitos com *Mycobacterium tuberculosis* revelaram que os receptores importantes presentes nos macrófagos e que interferem na adesão da bactéria incluem os receptores do complemento (CR1, CR3 e CR4). Os receptores CR3 e CR4 participam do reconhecimento e fagocitose de vários patógenos, dentre eles *Candida albicans*, *Bordetella pertussis*, *Francisella tularensis*, *Cryptococcus neoformans* e *Escherichia coli* (Jones *et al.*, 2008). A adesão da célula bacteriana às células do hospedeiro, envolve, no entanto, ambas as interações, mediadas ou não pela

opsonização (Melo *et al*, 2000) Em *P. brasiliensis* a alta expressão do receptor de manose é importante na capacidade fagocítica de macrófagos (Jimenez *et al.*, 2006). Estes autores demonstraram que a fagocitose de conídeos de *P. brasiliensis* por macrófagos de medula óssea de camundongos ocorre por mecanismos envolvendo ou não a opsonização. A aderência e fagocitose dependentes de opsonização são mediadas pelo sistema complemento e receptores CR, enquanto a fagocitose independente de opsonização envolve receptores de manose na célula fagocitária. Entretanto, até o momento, não se conhece o papel da opsonização do fungo por componentes do complemento sobre a atividade fungicida de macrófagos contra o *P. brasiliensis*. Outros estudos realizados por Cabec e colaboradores (2000) confirmaram que o receptor CR3 da família das  $\beta$  integrinas pode participar tanto na fagocitose dependente de opsonização como na independente desse fenômeno, evidenciando que tais receptores se ligam aos componentes 1-3 $\beta$  glucana da parede de células fúngicas.

Após a internalização dos fungos pelos macrófagos, são desenvolvidos diversos mecanismos microbicidas, como a produção de óxido nítrico. Os resultados encontrados neste estudo demonstraram que camundongos  $\beta 2^{-/-}$  sintetizaram menos óxido nítrico em resposta a infecção com *P. brasiliensis* quando comparado com camundongos WT (figura 8). A ativação do sistema de produção do óxido nítrico e seu envolvimento no controle das infecções fúngicas pulmonares e em mecanismos imunossupressores vêm sendo estudados durante o curso da infecção de *P. brasiliensis* em camundongos (Bocca *et al*, 1998). Tais estudos revelam que embora o NO seja um importante mecanismo microbicida para macrófagos infectados por *P. brasiliensis*, a ativação da produção de NO na PCM contribui para a ocorrência da imunossupressão observada durante o curso da infecção (Bocca *et al*, 1998). A importância do óxido nítrico também foi ilustrada em trabalhos realizados por Bogdan e colaboradores (2000), onde foi demonstrado que o NO afeta diretamente a produção de citocinas como IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , expressa em células como macrófagos e células T. Em outros estudos, Xie e colaboradores (1992) relataram que iNOS também é expressa em resposta a citocinas de perfil Th1 (TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) e/ou a produtos microbianos, como polissacarídeos da parede celular, resultando em uma produção prolongada de grandes quantidades de NO. A menor síntese de NO observada em camundongos  $\beta 2^{-/-}$  pode estar relacionada a uma destruição dos fungos mais eficiente e uma menor imunossupressão, ou ainda com uma menor estimulação dos macrófagos uma vez que a internalização é um evento importante na fagocitose, que leva a ativação celular. Em modelos

experimentais murinos de PCM, a atividade fungicida de macrófagos contra o *P. brasiliensis*, decorrente da ativação com IFN- $\gamma$  foi atribuída à produção de óxido nítrico (NO), induzida pela enzima NO sintase. A indução dessa enzima depende do sinergismo de ação de citocinas de perfil Th1, como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e, de produtos liberados pelo próprio agente patogênico (Boccca *et al.*, 1998). No decorrer da infecção experimental por *P. brasiliensis*, há intensa produção de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e NO, que se correlaciona com a capacidade fungicida dos macrófagos (Nascimento *et al.*, 2002). Portanto, a atividade fungicida da célula fagocitária parece depender do balanço entre citocinas estimuladoras e supressoras produzidas pela célula, durante a interação com o fungo. Nossos dados referentes à produção de NO (figura 8) revelaram que os níveis de NO<sub>3</sub> no soro dos animais  $\beta 2^{-/-}$  foram significativamente menores em relação aos animais selvagens nos períodos de 15 e 60 dias. Estudos realizados por Rooyakkers & Stokes (2005) com *Mycobacterium tuberculosis* revelaram que a ausência de CR3 em macrófagos de camundongos C57BL/6 reduz a adesão e internalização da micobactéria pelos macrófagos, mas não interfere na sobrevivência do patógeno nem nos mecanismos reatores de oxigênio, que levam à produção de NO.

Nossos resultados obtidos a partir da produção de citocinas revelaram que os animais  $\beta 2^{-/-}$  apresentaram níveis consideráveis de IFN- $\gamma$  produzidos no tempo de 30 dias após infecção e níveis relativamente iguais de produção de IL-12 (figuras 9A e 9C), o que sugere que outros mecanismos de ativação podem estar contribuindo para um aumento dessas citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo outros receptores do complemento (CR4) ou receptores de manose.

Analisando-se a evolução da PCM nos modelos experimentais murinos, observamos que camundongos  $\beta 2^{-/-}$  apresentaram uma carga fúngica pulmonar significativamente menor quando comparado ao animal WT no 60º dia de infecção. Entretanto, estes animais geneticamente modificados mostraram-se mais susceptíveis na fase inicial da doença, já que houve mais CFU nos primeiros 15 dias de infecção (figura 2). A resistência dos camundongos  $\beta 2^{-/-}$  foi confirmada com a baixa recuperação de carga fúngica pulmonar quando comparados aos camundongos WT. Estudos realizados por Pina e colaboradores (2008) em macrófagos alveolares de camundongos susceptíveis (B10.A) e resistentes (A/J) à infecção por *P. brasiliensis* revelaram que camundongos susceptíveis apresentaram melhor atividade fungicida do que camundongos resistentes. Esses dados foram confirmados pela pouca quantidade de CFU recuperada desses animais susceptíveis. Nossos resultados de recuperação de carga

fúngica pulmonar demonstraram que animais  $\beta 2^{-/-}$  apresentaram menor carga fúngica quando comparados aos animais WT em 60 dias e mostraram-se mais resistentes à medida que a PCM evoluiu para a fase crônica. Nossos dados estão de acordo com os achados em trabalhos realizados por Melo e colaboradores (2000) em estudos com *Mycobacterium tuberculosis*. Tais autores sugerem que *M. tuberculosis*, assim como outros patógenos intracelulares exploram receptores específicos para terem acesso ao interior de macrófagos sem elicitarem os mecanismos de ativação microbicida. Os receptores CR3, portanto, pode ser um receptor candidato para tal estratégia, visto que pode se ligar a diversos patógenos intracelulares.

Na análise histopatológica de fragmentos de tecido pulmonar observamos que houve uma resposta inflamatória progressiva na formação de granulomas no pulmão com a sucessão do tempo de infecção. Em camundongos  $\beta 2^{-/-}$  o processo inflamatório foi mais intenso se comparado aos animais selvagens. As lesões granulomatosas foram mais intensas e caracterizadas por redução dos espaços alveolares. Esses dados obtidos da histopatologia foram confirmados pelo estudo da morfometria de extensão das áreas dos órgãos como pulmão e fígado, as quais estavam comprometidas por lesões granulomatosas. Nos pulmões dos camundongos  $\beta 2^{-/-}$ , no 15º dia após infecção, a lesão granulomatosa foi intensa e caracterizada por redução dos espaços alveolares; em contrapartida nos camundongos WT os granulomas foram menores, pouco organizados e com grande infiltrado linfocitário. Os resultados da análise morfométrica mostraram que camundongos  $\beta 2^{-/-}$  apresentaram área granulomatosa significativamente maior apenas no início da infecção, e esse resultado mostrou-se invertido na fase crônica, onde houve diminuição do tamanho do granuloma em comparação aos animais WT. Esses dados corroboram com os achados de Nascimento e colaboradores (2002) no estudo do tratamento de aminoguanidina (um inibidor de NOS2) em camundongos susceptíveis (B10.A) e resistentes (A/Sn) ao fungo *P. brasiliensis*. Esses autores verificaram que após tratamento com aminoguanidina em camundongos susceptíveis houve aumento no número e no tamanho de lesões granulomatosas no fígado, enquanto em animais com expressão normal de NO foram encontradas pequenas lesões granulomatosas. Esses resultados sugerem que NO pode estar relacionado com o tamanho da lesão granulomatosa.

Os linfócitos do tipo Th1 são vitais para uma resposta imune celular efetiva contra patógenos intracelulares, devido à secreção de IFN- $\gamma$  que ativa os macrófagos e IL-2 que estimula a proliferação de células T CD8<sup>+</sup> (citotóxicas). Em modelos murinos,

o IFN- $\gamma$  também induz a produção de subclasses de imunoglobulinas G (IgG2a e IgG3), as quais contribuem para imunidade antimicrobiana através de suas atividades acentuadas de fixação de complemento e opsonização. A produção de anticorpos específicos das classes IgG, IgM e IgA é induzida na infecção por *P. brasiliensis* (Vaz et al, 1992; Blotta & Camargo, 1993). Nossos dados obtidos após avaliação da produção de anticorpos nos camundongos revelaram que animais  $\beta 2^{-/-}$  apresentaram aumento significativo dos níveis de IgG1 e IgG2 com a cronificação da infecção em relação aos animais WT (figura 7). Devido à baixa internalização do fungo pelos macrófagos, houve um aumento na produção, das duas classes analisadas, nos camundongos  $\beta 2^{-/-}$ . Em estudos realizados por Taborda e colaboradores (2002) foi demonstrado que a eficácia da fagocitose de *Cryptococcus neoformans* mediada por anticorpos IgM e IgA está correlacionada com a expressão de receptores da família das  $\beta$  integrinas (CR3). Em contrapartida, nesse mesmo estudo foi demonstrado que a fagocitose mediada por IgG1 foi apenas parcialmente inibida com anticorpos anti-CR3. Esses dados levam a crer que a fagocitose mediada por IgG1 não é dependente de receptores da família  $\beta$  integrina.

Estudos realizados por Benard e colaboradores (2000) com células do sangue periférico (PBMC) de indivíduos saudáveis estimuladas com gp43 de *P. brasiliensis* revelaram aumento na produção de IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-10, porém pessoas com PCM na forma aguda ou crônica apresentaram baixos níveis de IL-2 e IFN- $\gamma$  (perfil Th1) e aumentado nível de IL-10 produzida, sugerindo, portanto, o envolvimento da citocina IL-10 e a gravidade da PCM. Nossos resultados demonstraram que o estímulo específico com antígenos do fungo não aumentou a produção de IL-12, mas induziu a uma leve alteração na produção de IL-10 (figura 9B).

Estudos experimentais e em pacientes com paracoccidiodomicose sugerem que a resistência ao fungo parece ser dependente das atividades de células T e macrófagos, mediadas IFN- $\gamma$  e outras citocinas de perfil Th1, destacando-se o papel do TNF- $\alpha$ . O efeito sinérgico entre essas duas citocinas é essencial para a resistência do hospedeiro contra infecções por microrganismos intracelulares (Martin-Orozco *et al.*, 2001) e para uma eficiente atividade fungicida contra o *P. brasiliensis* (Calvi *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2001).

## *VI – Conclusão*

## CONCLUSÃO

A participação da proteína de receptor do sistema complemento pertencente à família das  $\beta 2$  integrinas na infecção induzida por *P. brasiliensis* em modelo murino não é obrigatória na internalização do fungo. Nossos dados sugerem que outras vias de sinalização e receptores de reconhecimento de patógenos podem ser usados pelo hospedeiro para interação com o fungo *P. brasiliensis*, resultando em uma apresentação diferente de resposta imune e diferentes formas de desenvolvimento da infecção. No entanto, a diminuição da internalização do fungo é um fator positivo no curso da infecção, permitindo uma resposta imunológica mais efetiva contra o fungo. Este trabalho abre possibilidades para mais estudos sobre o papel destas proteínas no curso da PCM e de outras infecções por parasitas intracelulares.

*VII-Referências*

*Bibliográficas*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas A.K., Lichtman A.H. Innate Immunity. In: Editors. Cellular and Molecular Immunology 5<sup>th</sup>ed; cap 12, 275-97. 2003.

Albelda, S.M., Buck C.A. Integrins and other cell adhesion molecules. FASEB J. 4: 2868-2880, 1990.

Almeida A.J., Martins M., Carmona J.A., Cano L.E., Restrepo A., Leao C., Rodrigues F. New insights into the cell cycle profile of *Paracoccidioides brasiliensis*. Fungal Genet Biol.,43(6):401-9, Jun. 2006.

Andrade R.V., Da Silva S.P., Torres F.A., Pocas-Fonseca M.J., Silva-Pereira I., Maranhao A.Q., Campos E.G., Moraes L.M., Jesuino R.S., Pereira M., Soares C.M., Walter M.E., Carvalho M.J., Almeida N.F., Brigido M.M., Felipe M.S. Overview and perspectives the transcriptome of *Paracoccidioides brasiliensis*. Rev. Iberoam Micol., 22(4):203-212, Dec. 2005.

Andre D.C., Lopes J.D., Franco M.F., Vaz C.A., Calich V.L. Binding of laminin to *Paracoccidioides brasiliensis* induces a less severe pulmonary paracoccidioidomycosis caused by virulent and low-virulence isolates. Microbes Infect.,6(6):549-58, May 2004.

Arruda C., Valente-Ferreira R.C., Pina A., Kashino S.S., Fazioli R.A., Vaz C.A., Franco M.F., Keller A.C., Calich V.L. Dual role of interleukin-4 (IL-4) in pulmonary paracoccidioidomycosis: endogenous IL-4 can induce protection or exacerbation of disease depending on the host genetic pattern. Infect Immun., 72(7):3932-40, Jul. 2004.

Bava A.J., Mistchenko A.S., Palacios M.F., Estevez M.E., Tiraboschi N.I., Sen L, Negróni R., Diez R.A. Lymphocyte subpopulations and cytokine production in paracoccidioidomycosis patients. Microbiol Immunol., 35(3):167-174, 1991.

Bedoya V., McEwen J.G., Tabares A.M., Jaramillo F.U., Restrepo A. Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a histopathological study of the experimental murine infection. Mycopathologia, 94(3):133-144, Jun.1986.

Benard G., Duarte A.J. Paracoccidioidomycosis: a model for evaluation of the effects of human immunodeficiency virus infection on the natural history of endemic tropical diseases. *Clin Infect Dis.*, 31(4):1032-9, Oct .2000.

Benard G., Orii N.M., Marques H.H., Mendonca M., Aquino M.Z., Campeas A.E., del Negro G.B., Durandy A., Duarte A.J. Severe acute paracoccidioidomycosis in children. *Pediatr Infect Dis J.*, 13(6):510-5, Jun. 1997.

Bicalho R.N., Santo M.F., de Aguiar M.C., Santos V.R. Oral paracoccidioidomycosis: a retrospective study of 62 Brazilian patients. *Oral Dis.*, 7(1):56-60, Jan. 2001.

Blotta M.H., Camargo Z.P. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.* , 31: 671-676, 1993.

Blotta M.H., Mamoni R.L., Oliveira S.J., Nouer S.A., Papaiordanou P.M., Goveia A., Camargo Z.P. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am J Trop Med Hyg.*, 61(3):390-394, Sep. 1999.

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.

Bocca A.L., Silva M.F., Silva C.L., Cunha F.Q., Figueiredo F. Macrophage Expression of Class II Major Histocompatibility Complex Gene Products in *Paracoccidioides brasiliensis*-infected Mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61: (2) 280-287, 1999.

Bogdan C., Rollinghoff M., Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 12:64-76. 2000.

Borba C.M., Vinhas E.A., Lopes-Bezerra L.M., Lucena-Silva N. Morphological, biochemical and molecular approaches for comparing typical and atypical *Paracoccidioides brasiliensis* strains. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 8(3-4):257-256, Oct-Nov. 2005.

Borges-Walmsley M.I., Chen D., Shu X., Walmsley A.R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol.*, 10(2):80-87, Feb. 2002.

Borgia G., Reynaud L., Cerini R., Ciampi R., Schioppa O., Dello Russo M., Gentile I., Piazza M. A case of paracoccidioidomycosis: experience with long-term therapy. *Infection.*, 28(2):119-120, Mar-Apr. 2000.

Bozzi A., Reis B.S., Prado F.L., Pedroso E.P., Leite M.F., Goes A.M. Modulation of CD28 and CD86 expression in patients with paracoccidioidomycosis in different periods of treatment. *Scand J Immunol.*, 60(5):500-5, Nov. 2004.

Brandhorst T.T., Wüthrich M., Jimenez B.F., Warner T., Klein B.S. Exploiting type 3 complement receptor for TNF- $\alpha$  suppression, immune evasion, and progressive pulmonary fungal infection. *The Journal of Immunology*, 173:7444-7453, 2004.

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

Brummer E., Hanson L.H., Stevens D.A. Kinetics and requirements for activation of macrophages for fungicidal activity: effect of protein synthesis inhibitors and immunosuppressants on activation and fungicidal mechanism. *Cell Immunol.*, 132(1):236-45, Jan. 1991.

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.*, 10(8):945-52, 1988.

Brummer E., Hanson L.H., Restrepo A., Stevesns D.A. In vivo and in vitro activation of pulmonary macrophage by IFN-g for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. *J. Immunolog.*, 140(1):2786-2789, May- Jun. 1988.

Bueno J.P., Mendes-Giannini M.J., Del Negro G.M., Assis C.M., Takiguti C.K., Shikanai-Yasuda M.A. IgG, IgM and IgA antibody response for the diagnosis and follow-up of paracoccidioidomycosis: comparison of counterimmunoelectrophoresis and complement fixation. *J. Med. Vet. Mycol.*, 35(3):213-217, May-Jun. 1997.

Calle D., Rosero D.S., Orozco L.C., Camargo D., Castaneda E., Restrepo A. Paracoccidioidomycosis in Colombia: an ecological study. *Epidemiol Infect.*, 126(2):309-315, Apr.2001.

Calich V.L., Coppi Vaz C.A., Burger E. PMN chemotactic factor produced by glass-adherent cells in the acute inflammation caused by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Br J Exp Pathol.*, 66(1):57-56, Feb. 1985

Calich V.L.G., Kipnis T.L., Mariano M. The activation of the complement system by *P. brasiliensis* in vitro: its opsonic effect and possible significance for an in vivo model of infection. *Clin Immunol Immunopathol*, v. 12, p. 20-30, 1979.

Calich V.L., Singer-Vermes L.M., Siqueira A.M., Burger E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Br J Exp Pathol.*, 66(5):585-94, Oct .1985.

Calvi S.A., Soares A.M., Peracoli M.T., Franco M., Ruiz R.L. Jr., Marcondes-Machado J., Fecchio D., Mattos M.C., Mendes R.P. Study of bronchoalveolar lavage fluid in paracoccidioidomycosis: cytopathology and *Microbes Infect.*, 5(15):1373-1379, Dec. 2003.

Cano L.E., Arango R., Salazar M.E., Brummer E., Stevens D.A., Restrepo A. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. *J. Med. Vet. Mycol.*, 30(2):161-8, 1992.

Cano L.E., Singer-Vermes L.M., Vaz C.A.C., Russo M., Calich V.L.G. Pulmonary Paracoccidioidomycosis in Resistant and Susceptible Mice: Relationship among Progression of Infection, Bronchoalveolar Cell Activation, Cellular Immune Response, and Specific Isotype Patterns. *Infection and Immunity*, 63: (5) 1777-1783, 1995.

Carvalhoes M.S., da Silva W.D., Birman E.G., Sant'Anna O.A., Abrahamsohn P., Kipnis T.L. Experimental paracoccidioidomycosis in high and low antibody-producer mice. I.--Evolution of the disease, its correlation with the humoral immune response and the patterns of tissue lesions. *Ann Inst Pasteur Immunol.*, 137C(2):127-41, Mar-Apr. 1986.

Cock A.M., Cano L.E., Velez D., Aristizabal B.H., Trujillo J., Restrepo A. Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non-viable *Paracoccidioides brasiliensis* propagules. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 42(2):59-66, Mar-Apr. 2000.

Crott L.S., Lucisano-Valim Y.M., Silva C.L., Barbosa J.E. Interactions of F1 fractions from different strains of *Paracoccidioides brasiliensis* with human complement and with human neutrophils. *Mycopathologia*, 140(1):19-27, 1997.

Da Costa J.C., Concalves R.P., Pagnano P.M., Bechelli L.M. Ultrastructure of lymphocytes from patients with paracoccidioidomycosis in the lymphocyte transformation test by phytohemagglutinin. *Mycopathologia*, 93(3):155-161, Mar. 1986.

Deepe G.S., Bullock W.E. Immunological aspects of fungal pathogenesis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 9: 567-79, 1990.

Del negro G. Outras lesões. Formas de ocorrência rara e associação com outros processos. In: Del Negro G.; Lacaz C.S.; Fiorillo A.M.; (eds) *Paracoccidioidomicose (blastomicose sul-americana)*. São Paulo: Sarvier-Edusp, p. 229-243, 1982.

De Mattos Grosso D., de Almeida S.R., Mariano M., Lopes J.D. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. *Infect Immun.*, 71(11):6534-42, Nov. 2003.

Dias M.F.R.G., Filgueira A.L., de Souza W. A Morphological and Cytochemical Study of the Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and Neutrophils. *Microscopy and Microanalysis*, 10: 215-223, 2004.

- Diez-Fraile A., Meyer E., Burvenich C. Regulation of adhesion molecules on circulating neutrophils during coliform mastitis and their possible immunomodulation with drugs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 86:1-10, 2002.
- Diniz S.N, Reis B.S., Goes T.S., Zouain C.S., Leite M.F., Goes A.M. Protective immunity induced in mice by F0 and FII antigens purified from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine*, 22(3-4):485-92, Jan. 2004.
- Do Valle A.C., Skacel M., Costa R.L., Ribeiro C.T., Montagna N.A., da Cruz L.C. A case report of intraspinal paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 40(3):203-207, May-Jun. 1998.
- Dos Santos R.P., Maia A.L., Goldani L.Z. Paracoccidioidomycosis in a woman with idiopathic hirsutism. *Mycopathologia*, 158(1):57-59, Jul. 2004.
- Drevets D.A., Leenen P.J., Campbell P.A. Complement receptor type 3 mediates phagocytosis and killing of *Listeria monocytogenes* by a TNF-alpha- and IFN-gammastimulated macrophage precursor hybrid. *Cell Immunol.*, 169: 1-6, 1996.
- Eisele R.C., Juliani L.C., Belitardo D.R., Itano E.N., Estevao D., Bracarense A.P., Camargo Z.P., Ono M.A. Immune response in dogs experimentally infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.*, 42(6):549-53, Dec. 2004.
- Fagundes-Pereyra W.J., Carvalho G.T., de Miranda Goes A., das Chagas Lima e Silva F., de Sousa. A.A. Central nervous system paracoccidioidomycosis: analysis of 13 cases]. *Arq Neuropsiquiatr*, Jun. 64(2A):269-76, 2006.
- Felipe M.S., Andrade R.V., Arraes F.B., Nicola A.M., Maranhao A.Q., Torres F.A., Silva-Pereira I., Pocas-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., Carvalho M.J., Brigido M.M. PbGenome Network. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus

*Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. J Biol Chem., 280(26):24706-24714, Jul. 2005.

Fernandes L., Bocca A.L., Ribeiro A.M., Silva S.S., Paes H.C., Amaral A.C., Polez V.L.P., Martins N.F., Soares C.M.A., Felipe M.S.S. Regulatory Networks in the Host-Fungal Pathogen Interactions. In: San Blas G., Calderone R.A. Pathogenic Fungi: Insights in Molecular Biology. 1ª Edição. Venezulela, Editora . *Caister Academic Press*, 2008; pág. 77-110.

Ferreira M.S., Imunopatogênese e Patologia. IN: Tratado de Infectologia. Veronesi R e Foccacia R. 2º ed. Ed. Atheneu. v. 2, p. 1091- 1131, 2002.

Fogaça S.S. Efeito do sistema complemento sobre a atividade fungicida e reprodução de fator de necrose tumoral alfa por monócitos humanos infectados com *Paracoccidioides brasiliensis*. 2007. 70f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, São Paulo, Brasil.

Fornazim M.C., Balthazar A., Quagliato R. Jr., Mamoni R.L., Garcia C., Blotta M.H. Evaluation of bronchoalveolar cells in pulmonary paracoccidioidomycosis. Eur Respir J., 22(6):895-9, Dec. 2003.

Franco M., Lacaz C.L.S., Restrepo A.M., Del Negro G. In Paracoccidoimycosis. Boca Ratón, C.R.C. Press., 1994.

Fromtling R.A., Shadomy H.J. An overview of macrophages fungal interactions. Mycopathologia; 93:77-93, 1986.

Garcia Bustinduy M., Guimera F.J., Arevalo P., Castro C., Saez M., Dorta Alom S., Noda A., Diaz-Flores L., Garcia Montelongo R.. Cutaneous primary paracoccidioidomycosis. J Eur Acad Dermatol Venereol., 14(2):113-117, Mar. 2000.

Godoy L.C., Mariano M., Lopes J.D. Immunity and hypersensitivity to gp43 antigen in susceptible and resistant mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. Med Mycol., 41(5):427-36, Oct. 2003.

Goihman-Yahr M., Essenfel E., Albornoz M., Yarzabal L. Defect of in vitro digestive ability of polymorphonuclear leukocytes in paracoccidioidomycosis. *Infect Immun*, v. 28, p. 557-566, 1980.

Goihman-Yahr M., Rothenberg A., Bretana A., Isturiz G., Rosquete R., Avila-Millan E., Vilorio N., Saavedra de Borges N., Carrasquero M., Perez de Fernandez B., *et al.* Digestion of killed *Paracoccidioides brasiliensis* by neutrophils. *Mycopathologia*, 106(1):53-58, Apr. 1989.

Goldman G.H., dos Reis Marques E., Duarte Ribeiro D.C., de Souza Bernardes L.A., Quiapin A.C., Vitorelli P.M., Savoldi 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., Tekaiia F., Nobrega M.P., Nobrega F.G., Goldman M.H. 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(1):34-48, Feb. 2003.

Goncalves A.J., Londero A.T., Terra G.M., Rozenbaum R., Abreu T.F., Nogueira S.A. Paracoccidioidomycosis in children in the state of Rio de Janeiro (Brazil). Geographic distribution and the study of a "reservarea". *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 40(1):11-13, Jan-Feb. 1998.

Gonzalez A., Sahaza J.H., Ortiz B.L., Restrepo A., Cano L.E. Production of pro-inflammatory cytokines during the early stages of experimental Paracoccidioides. *Medical Mycology*, 2003.

Gruber A., Lukasser-Vogl E., Von Zepelin M.B., Dierich M.P., Wurzner R. Human immunodeficiency virus type1 gp160/gp41 binding to *Candida albicans* selectively enhances candidal virulence in vitro. *J Infect Dis.*, 177: 1057–1063, 1998.

Haberfeld W. Blastomycose de localização abdominal e um caso desta moléstia combinado com dysenteria amoebiana. **Arch Bras Med.** v. 5, p.107-144, 1915.

Hahn R.C., Macedo A.M., Fontes C.J., Batista R.D., Santos N.L., Hamdan J.S. Randomly amplified polymorphic DNA as a valuable tool for epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Clin Microbiol., 41(7):2849-2854, Jul. 2003.

Haubner R.; Finsinger D.; Kessler H. Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the an3 integrin for a new cancer therapy. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, 36: 1374-1389, 1997.

Hirsch C.S., Ellner J.J., Russell D.G., Rich E.A. Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor-alpha-mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages. J Immunol., 152: 743-753, 1994.

Hynes R.O. Receptores de adhesión celular HYNES, R.O. BioEssays, 16(9):664, 1994. Disponível em: <http://www.scielo.org/scielo.htm> > Acesso em: 18 Mai. 2008.

Hogg, N., Stewart, M.P., Scarth, S.L., Newton, R., Shaw, J.M., Law, S.K., Klein, N. A novel leukocyte adhesion deficiency caused by expressed but nonfunctional beta2 integrins Mac-1 and LFA-1. J Clin Invest., 103: 97-106, 1999.

Horre R., Schumacher G., Alpers K., Seitz H.M., Adler S., Lemmer K., De Hoog G.S., Schaal K.P., Tintelno K. A case of imported paracoccidioidomycosis in a German legionnaire. Med Mycol., 40(2):213-6, 2002.

Hostetler J.S., Brummer E., Coffman R.L., Stevens D.A. Effect of anti-IL-4, interferon-gamma and an antifungal triazole (SCH 42427) in paracoccidioidomycosis: correlation of IgE levels with outcome. Clin Exp Immunol., 94(1):11-16, Oct.1993.

Jagels M.A., Daffern P.J., Hugli T.E. C3a and C5a enhance granulocyte adhesion to endothelial cell monolayers: epithelial and endothelial priming is required for C3a-induced eosinophil adhesion. Immunopharmacology, 46:209-222, 2000.

Jimenez Mdel P., Restrepo A., Radzioch D., Cano L.E., Garcia L.F. Importance of complement 3 and mannose receptors in phagocytosis of *Paracoccidioides brasiliensis*

conidia by Nramp1 congenic macrophages lines. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 47(1):56-66, Jun. 2006.

Jimenez-Finkel B.E., Murphy J.W. Induction of antigen-specific T suppressor cells by soluble *Paracoccidioides brasiliensis* antigen. *Infect Immun.*, 56(4):734-743, Apr. 1988.

Jones H.E., Strid J., Osman M., Uronen-Hansson H., Dixon G., Klein N., Wong S.Y.C., Callard R.E. The role of  $\beta_2$  integrins and lipopolysaccharide-binding protein in the phagocytosis of dead *Neisseria meningitides*. *Cellular Microbiology.*, 10:1634-1645, 2008.

Kelly R.M, Chen J, Yauch Le, Levitz S.M.. Opsonic requirements for dendritic cell-mediated responses to *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*; 73: 592-8, 2005.

Kerr I.B., Da Costa S.C., Schaffer G.V., Lagrange P.H. Paracoccidioidomycosis in silica-treated rats. *Immunol Lett.*, 7(3):129-133, 1983.

Kozel T.R. Activation of the complement system by pathogenic fungi. *Clin Microbiol Rev.*, 9: 34-46, 1996.

Kurita N., Oarada M., Ito E., Miyaji M. Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.*, 37(4):261-7, Aug. 1999.

Kurita N., Oarada M., Miyaji M., Ito E. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med mycol.*, 38(2):177-82, Apr. 2000.

Kurita N., Oarada M., Brummer E. Fungicidal activity of human peripheral blood leukocytes against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. *Med Mycol.*, 43(5):417-22, Aug. 2005.

Lacaz C.S., Zamith V.A., Del Negro G., Siqueire A.M. Aspectos clínicos gerais. Formas polares da paracoccidioidomicose. Particularidades clínicas, infanto-juvenil. *In*: Del Negro G., Lacaz C.S., Fiorillo A.M. (eds). Paracoccidioidomicose, São Paulo, Savier; Edusp, p. 141-147, 1982.

Lacaz C.S., Porto E., Martins J.E.C. Paracoccidioidomicose. *Micologia Médica*, 248-292, 1991.

Le Cabec V. , Cols C. , Maridonneau-Parini I. Nonopsonic Phagocytosis of Zymosan and *Mycobacterium kansasii* by CR3 (CD11b/CD18) Involves Distinct Molecular Determinants and Is or Is Not Coupled with NADPH Oxidase Activation. *Infect Immun.*, 68(8): 4736–4745, 2000.

Levi G.C. Management of Opportunistic Infections in HIV(+) Patients: Contrasts Between Europe and South America. *Braz J Infect Dis* v. 2, p.118-127, 1998.

Linares L.I., Friedman L. Experimental Paracoccidioidomycosis in Mice. *Infection and Immunity*, 5: (5) 681-687, 1972.

MacMicking J.D., North, R.J., LaCourse R., Mudgett J.S., Shah S.K., Nathan C.F. (). Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 94: 5243-5248, 1997.

Mamoni R.L., Blotta M.H. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. *Cytokine*, 32(1):20-9, Oct . 2005.

Mamoni R.L., Rossi C.L, Camargo Z.P., Blotta M.H.. Capture enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific immunoglobulin E in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg.*, 65(3):237-241, Sep. 2001.

Mamoni R.L., Nouer S.A., Oliveira S.J., Musatti C.C., Rossi C.L., Camargo Z.P., Blotta M.H. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from

patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med. Mycol.*, 40(2):153-9. Apr. 2002.

Martin-Orozco N., Isibasi A., ortiz-Navarrete V. Macrophages present exogenous antigens by class I major histocompatibility complex molecules via a secretory pathway as a consequence of interferon-gamma activation. *Immunology*, 103: 41- 8, 2001.

Matute D.R., Sepulveda V.E., Quesada L.M., Goldman G.H., Taylor J.W., Restrepo A., McEwen J.G. Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol.*, 44(6):2153-7, Jun. 2006.

Mcewen J.G., Brummer E., Stevens D.A., Restrepo A. Effect of murine polymorphonuclear leukocytes on the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis* [corrected. *Am J Trop Med Hyg.*, 36(3):603-8, May 1987.

Melo M.D., Catchpole I.R., Haggart G., Stokes R.W. Utilization of CD11b knockout mice to characterize the role of complement receptor 3 (CR3, CD11b/CD18) in the growth of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages. *Cellular Immunology*, 205: 13-23, 2000.

Mendes-Giannini M.J., Bueno J.P., Shikanai-Yasuda M.A., Ferreira A.W., Masuda A. Detection of the 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.*, 27(12):2842-2845, Dec. 1989.

Mendes E., Raphael A. Impaired delayed hypersensitivity in patients with South American blastomycosis. *J Allergy.*, 47(1):17-22 , Jan. 1971.

Mendes-Giannini M.J., Moraes R.A., Ricci T.A. Proteolytic activity of the 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.*, 32(5):384-385, Sep-Oct. 1990.

Meneses-Garcia A., Mosqueda-Taylor A., Morales-de la Luz R., Rivera L.M. Paracoccidioidomycosis: report of 2 cases mimicking squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* , 94(5):609-13, Nov. 2002.

Michel T., Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *Clin Invest.*, 1; 100(9): 2146–2152, November, 1997.

Miura C.S., Estevao D., Lopes J.D., Itano E.N. Levels of specific antigen (gp43), specific antibodies, and antigen-antibody complexes in saliva and serum of paracoccidioidomycosis patients. *Med. Mycol.*, 39(5): 423-8, Oct. 2001.

Moraes-Vasconcelos D., Grumach A. S., Yamaguti A., Andrade M. E. B., Fieschi C., Beaucoudrey L. de, Casanova J. L., Duarte A. J. da S. *Paracoccidioides brasiliensis* disseminated disease in a patient with inherited Interleukin-12/23 receptor b1 deficiency. *Clinical Infectious Diseases*, 41(4): 31-37, 2005.

Moreira A.P., Dias-Melicio L.A., Peraçoli M.T., Calvi S.A., Victoriano de Campos Soares A.M.. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells by IFN-gamma and TNF-alpha activated murine peritoneal macrophages: evidence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO effector mechanisms. *Mycopathologia*, 166(1): 17-23, Jul. 2008.

Morelli R, Rosenberg L.T. The role of complement in the phagocytosis of *Candida albicans* by mouse peripheral blood leukocytes. *J Immunol.*, 107: 476–80, 1971.

Morelli A.E., Larregina A.T., Shufesky W.J., Zahorchak A.F., Logar A.J., Papworth G.D., Wang Z., Watkins S.C., Falo L.D.Jr, Thomson A.W. Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood*, 601-611, 2003.

Mota N.G., Rezkallah-Iwasso M.T., Peracoli M.T., Audi R.C., Mendes R.P., Marcondes J., Marques S.A., Dillon N.L., Franco M.F. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 79(6):765-72, 1985.

Muller W.A., Randolph G.J. Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 66: 698-704, 1999.

Munk M.E., Da Silva W.D. Activation of human complement system *Paracoccidioides brasiliensis* and its deposition on the yeast form cell surface. J Med Vet Mycol., 30(6):481-4, 1992.

Munk M.E., Kajdacsy-Balla A., Del negro G., Cuce L.C., Da Silva W.D. Activation of human complement system in paracoccidioidomycosis. J Med Vet Mycol., 30: 317–21, 1992.

Nascimento F.R.F., Calich V.L.G., Rodriguez 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.

Nogueira M.G., Andrade G.M., Tonelli E. Clinical evolution of paracoccidioidomycosis in 38 children and teenagers. Mycopathologia.; 161(2):73-81, Feb. 2006.

Nunes Texeira L.A. Intradermal tests and epidemiologic survey of South American blastomycosis. Med Cutan Ibero Lat Am., 9(4):259-274, 1981.

Oliveira S.J., Mamoni R.L., Musatti C.C., Papaiordanou P.M., Blotta M.H. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. Microbes Infect., 4(2):139-144. Feb. 2002.

Omarsdottir S., Freysdottir J., Barsett H., Smestad Paulsen B., Olafsdottir E.S. Effects of lichen heteroglycans on proliferation and IL10 secretion by rat spleen cells and IL10 TNF- $\alpha$  secretion by rat peritoneal macrophages *in vitro*. Phytomedicine, 12: 461-467, 2005.

Pagliari C., Sotto M.N. Dendritic cells and pattern of cytokines in paracoccidioidomycosis skin lesions. Am J Dermatopathol., 25(2):107-12, Apr. 2003.

Paniago A.M., de Freitas A.C., Aguiar E.S., Aguiar J.I., da Cunha R.V., Castro A.R., Wanke B. Paracoccidioidomycosis in patients with human immunodeficiency virus: review of 12 cases observed in an endemic region in Brazil. J Infect., 51(3):248-252, Oct .2005.

Paniago A.M., Aguiar J.I., Aguiar E.S., da Cunha R.V., Pereira G.R., Londero A.T., Wanke B. Paracoccidioidomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.*, 36(4):455-459, Jul-Aug. 2003.

Pedro Rde J., Aoki F.H., Boccato R.S., Branchini M.L., Goncales Junior F.L., Papaiordanou P.M., Ramos M.de C. Paracoccidioidomycosis and infection by the human immunodeficiency virus. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 31(2):119-25, Mar-Apr. 1989.

Peracoli M.T., Fortes M.R., Da Silva M.F., Montenegro M.R.. Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 37(2):129-36, Mar-Apr. 1995.

Peracoli M.T., Soares A.M.V., Marques S.A. Enumeração and activity of natural killer cells in Paracoccidioidomycosis. *Encontro Inter Paracoccidioidomycosis. Programa Libro de Resumenes. Caracas. Venezuela*, p. 117, 1989.

Peracoli M.T., Soares A.M.V., Mendes R.P., Marques S.A., Pereira P.C., Rezkallah-Iwasso M.T. Studies of natural killer cells in patients with paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol.*, 29(6):373-80, 1991.

Pereira R.M., Bucarechi F., Barison E.de M., Hessel G., Tresoldi A.T. Paracoccidioidomycosis in children: clinical presentation, follow-up and outcome. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 46(3):127-31, May-Jun .2004.

Pina A., Saldiva P.H.N., Restrepo L.E.C., Calich V.L.G. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. *Journal of Leukocyte Biology*, 79:1202-1213, Jun. 2006.

Pina A., Bernardino S., Calish V.L.G. Alveolar macrophages from susceptible mice are more competent than those of resistant mice to control initial *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Journal of Leukocyte Biology*, 83, 2008.

Ramos S.P., Sano A., Ono M.A., Camargo Z.P., Esteveao D., Miyaji M., Nishimura K., Itano E.N. Antigenuria and antigenaemia in experimental murine paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.*, 43(7):631-6, Nov. 2005.

Ramos-E-Silva M. Facial and oral aspects of some venereal and tropical diseases. *Acta Dermatovenerol Croat.*;12(3):173-80, 2004.

Restrepo A., McEwen J.G., Castaneda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med. Mycol.*, 39:233–241. 2001.

Restrepo A., Velez H. Effect of phagocytosis in vitro on *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia*, 13 Pt 1:10-21, Mar. 1975.

Romano C.C. Modulação da resposta imune celular anti-gp43 de paracoccidioides brasiliensis em pacientes com paracoccidioidomicose. 2003. 104 f. Tese (Doutorado em Imunologia Celular. Universidade de São Paulo, USP, 2003.

Rooyackers A.W.J., Stokes R.W. Absence of complement receptor 3 results in reduced binding and ingestion of *Mycobacterium tuberculosis* but has no significant effect on the induction of reactive oxygen and nitrogen intermediates or on the survival of the bacteria in resident and interferon-gamma activated macrophages. *Microbial Pathogenesis*, 39: 57-67, 2005.

San-Blas G. Biochemical and physiological aspects in the dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch Med Res.*, 24(3):267-8, Autumn, 1993.

San-Blas G., Nino-Vega G., Iturriaga T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med. Mycol.* , 40: 225-242, 2002.

Schmidt S., Weber M., Schuster C., Mohr H. Factors involved in the coordinate appearance of nitrite reductase and glutamine synthetase in the mustard (*Sinapis alba* L.) seedling. *Planta*, 180: 429-434, Oct. 1989.

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.

Shikanai-Yasuda M.A., Telles Filho F.de Q., Mendes R.P., Colombo A.L., Moretti M.L. Guidelines in paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop.*, 39(3):297-310, May-Jun. 2006.

Silva C.L., Alves L.M., Figueiredo F. Involvement of cell wall glucans in the genesis and persistence of the inflammatory reaction caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiology*, 140 (Pt 5):1189-94, May.1994.

Silva-Vergara M.L., Martinez R, Malta M.E., Ramirez L.E., Franco F.A. The marsupial *Didelphis albiventris* is an improbable host of *Paracoccidioides brasiliensis* in an endemic area of paracoccidioidomycosis in Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Aug. 96(6):771-2, 2001.

Silva S.S. Análise da expressão gênica de macrófagos murinos infectados por fungos patogênicos (*Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*). 2007. 110f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Biologia Molecular). Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Brasília, Brasil.

Singer-Vermes L.M., Caldeira C.B., Burger E., Calich V.L.G. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. *Clin Exp Immunol.*, 94(1):75-9, Oct. 1993.

Sividzinski T.I., Miranda Neto M.H., Santana R.G., Fischman O., Colombo A.L. *Paracoccidioides brasilienses* isolates obtained from patients with acute and chronic disease exhibit morphological differences after animal passage. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 41(5):279-83, Sep-Oct. 1999.

Soares A.M.V.C., Calvi S.A., Peraçoli M.T.S., Fernandez A.C., Dias L.A., Dos Anjos A.R. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of

high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunology*, 102:480-485, 2001.

Souto, J.T. *et al.* Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am. J. Pathol.* 156: 1811–1820, 2000.

Souto J.T., Aliberti J.C., Campanelli A.P., Livonesi M.C., Maffei C.M., Ferreira B.R., Travassos L.R., Martinez R., Rossi M.A., Silva J.S. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon-gamma. *Am J Pathol.*, 163(2):583-90, Aug. 2003.

Speth C., Rambach G., Lass-Flörl C., Dierich M.P., Würzner R. The role of complement in invasive fungal infections. *Mycoses*, 47: 93-103, 2004.

Sugizaki M.F., Peracoli M.T., Mendes-Giannini M.J., Soares A.M., Kurokawa C.S., Mendes R.P., Marques S.A., Freire-Maia D.V. Correlation between antigenemia of *Paracoccidioides brasiliensis* and inhibiting effects of plasma in patients with paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.*, 37(4):277-284, Aug. 1999.

Taborda C.P., Casadevall A. CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) are involved in complement-independent antibody-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Immunity*, 16(6):791-802, Jun. 2002.

Tani E.M., Franco M., Peracoli M.T., Montenegro M.R. Experimental pulmonary paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster: morphology and correlation of lesions with the immune response. *J Med Vet Mycol.*, 25(5):291-300, Oct. 1987.

Teixeira J.E., Martinez R., Camara L.M., Barbosa J.E. Expression of complement receptor type 1 (CR1) on erythrocytes of paracoccidioidomycosis patients. *Mycopathologia*, 152(3):125-133, 2001.

Thompson R.D., Wakelin M.W., Larbi K.Y. Dewar A., Asimakopoulos G., Horton M.A., Nakada M.T., Nourshargh S. Divergent effects of platelet-endothelial cell

adhesion molecule-11 and beta 3 integrin blockade on leukocyte transmigration *in vivo*. *J. Immunol.*, 165:426-434, 2000.

Tobon A.M., Orozco B., Estrada S., Jaramillo E., de Bedout C., Arango M., Restrepo A. Paracoccidioidomycosis and AIDS: report of the first two Colombian cases. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 40(6):377-381, Nov-Dec. 1998.

Tresoldi A.T., Pereira R.M., Castro L.C., Rigatto S.Z., Belangero V.M. Hypercalcemia and multiple osteolytic lesions in a child with disseminated paracoccidioidomycosis and pulmonary tuberculosis. *J Pediatr.*, 81(4):349-52, 2005.

Triebel T., Grillhosl B., Kacani L., Lell C.P., Fuchs A., Speth C., Lass-Flörl C., Steinmann J., Dierich M.P., Würzner R. Importance of the terminal complement components for immune defence against *Candida*. *Int J Med Microbiol.*, 292: 527-536, 2003.

Tucker, G. C. Inhibitors of integrins. *Curr. Opin. Pharmacol.*, v. 2, n. 4, p. 394-402, 2002.

Underhill D.M.; Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol.*, 20: 825-52, 2002.

Van Damme P.A., Bierenbroodspot F., Telgt D.S., Kwakman J.M., De Wilde P.C., Meis J.F. A case of imported paracoccidioidomycosis: an awkward infection in The Netherlands. *Med Mycol.*, 44(1):13-18, Feb. 2006.

Vaz C.A.C., Mackenzie D.W.R., Hearn V.M., Camargo Z.P., Singer-Vermes L.M., Burger E., Calich V.L.G. Specific recognition pattern of IgM and IgG antibodies produced in the course of experimental paracoccidioidomycosis. *Clin. Exp. Immunol.*, 88: 119-123, 1992.

Verli F.D., Marinho S.A., Souza S.C., Figueiredo M.A., Yurgel L.S. Clinical-epidemiologic profile of paracoccidioidomycosis at the Stomatology Department of Sao Lucas Hospital, Pontificia Universidade Catolica of Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.*, 38(3):234-237, May-Jun. 2005.

Verronesi R., Focaccia R. Tratado de infectologia. 3ª Edição. São Paulo. *In: Doenças parasitárias*. 2005.

Wheat L.J. Antigen detection, serology, and molecular diagnosis of invasive mycoses in the immunocompromised host. *Transpl Infect Dis.*;8(3):128-39, Sep 2006.

Yamamura M., Valdimarsson H.. Participation of C3 in intracellular killing of *Candida albicans*. *Scand J Immunol.*, 6: 591-4, 1977.

Xia Y., Vetvicka V., Van J., Hanikyrova M., Mayadas T., Ross G.D. The  $\alpha$ -glucan-binding lectin site of mouse CR3 (CD11b/CD18) and its function in generating a primed state of the receptor that mediates cytotoxic activation in response to iC3bopsonized target cells. *J Immunol.*, 162: 2281-90, 1999.

Xie, Q.W.; Cho H.J., Calaycay J., Mumford R.A., Swiderek K.M., Lee T.D., Ding A., Troso T., Nathan C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*, 256: 225-228, 1992.

Xiong J. P., Stehle T., Diefenbachh B., Dunker R., Scott D. L.; Joachimiack A. Goodman S. L., Arnaout M. A. Crystal structure of the extracellular segment of integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1. *Science*, 294: 339-345, 2001.

*VIII-Anexo*



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB  
COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

Brasília, 18 de julho de 2006.

### DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "PARTICIPAÇÃO DA PROTEÍNA BETA-2 INTEGRINA NO PROCESSO INFLAMATÓRIO OBSERVADO NO CURSO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL INDUZIDO PELO *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*", foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

  
Prof. Anamélia Lorenzetti Bocca  
Coordenadora do CEUA